

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Nikolina V. Popović Kokar

Upotreba hidrogelova dobijenih modifikacijom
polisaharida fenolnim jedinjenjima za imobilizaciju
ćelija i biokatalizatora

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Nikolina V. Popović Kokar

Use of hydrogels obtained by modification of
polysaccharides with phenolic compounds for
immobilization of cells and biocatalysts

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021

Mentor:

dr Radivoje Prodanović
Redovni profesor
Hemijski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Marija Gavrović-Jakulović
Redovni profesor
Hemijski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Natalija Polović
Vanredni profesor
Hemijski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Olivera Prodanović
Naučni saradnik
Institut za multidisciplinarna istraživanja,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvaljujem se:

Mentoru ove doktorske disertacije, dr Radivoju Prodanović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na velikoj pomoći tokom izradi ove doktorske disertacije, na sugestijama, idejama, korisnim savetima i konstruktivnim kritikama koje su doprinele da moja disertacija danas ima ovakav sadržaj i formu. Takođe, želim da mu se zahvalim na prenesenom znanju, strpljenju, razumevanju, vremenu i ukazanom poverenju.

Redovnoj profesorki Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dr Mariji Gavrović Jankulović na znanju pruženom u toku master studija na Hemijskom fakultetu, kao i na pruženim savetima, sugestijama i pomoći. Takođe, želim da joj se zahvalim što je pristala da bude deo komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Vanrednoj profesorki Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dr Nataliji Polović, na pruženom znanju tokom master studija, ali i korisnim savetima i pomoći tokom izrade doktorske disertacije, kao i što je pristala da bude deo komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Naučnom saradniku dr Oliveri Prodanović na pruženim komentarima i savetima tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije, kao i na tome što je pristala da bude deo komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Svim profesorima i asistentima Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na znanju koje su mi pružili u toku studija, vremenu i podršci. Pre svega svim profesorima i kolegama sa Katedre za biohemiju, ali i sa celog Hemijskog fakulteta na kolegijalnosti, pomoći, podršci i tome što su učinili rad na fakultetu mnogo lakšim i interesantnijim.

Kolegama sa Fakulteta inženjerskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu, profesoru dr Nenadu Filipoviću, dr Marku Živanoviću i Katarini Virijević, na pruženom znanju i pomoći.

Mojim kolegama iz laboratorije 434 prvenstveno na pomoći, podršci, svom podeljenom znanju, ali i na drugarstvu. Hvala za sva ona druženja, šale i mnoge lepe trenutke.

Veliku zahvalnost dugujem i mojima diplomcima Dunji, Mariji, Maji, Dajani i Anamariji, čiji završni radovi su deo ove doktorske disertacije, i koje su svojim radom i trudom doprinele da ova disertacija ima ovakve rezultate. Hvala na pomoći i na ukazanom poverenju da budem vaša mentorka.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, mojoj mami, tati i Seleni, koji su uvek bili tu da me podrže, saslušaju, ohrabre i pruže ljubav. Hvala što ste uvek verovali u mene i uvek bili samo vetar u leđa. Mama, hvala ti što si uvek bila najveći oslonac za sve nas, što si uvek davala sve od sebe da nama bude dobro i da budemo srećni. Hvala ti što si me naučila da je sreća u malim stvarima, da umem da cenim, poštujem, verujem u dobro i nadam se. Hvala na ovolikoj ljubavi, bez nje ništa ne bi bilo moguće.

Volela bih da mogu da se zahvalim mom pokojnom dedi, koji bi danas bio najponosniji od svih. Hvala ti deda, zauvek!

Pored moje porodice, najveću zahvalnost dugujem mom dečku, a sada već i mužu, Nemanji. Hvala ti što si svaki moj pesimizam obojio svojim optimizmom, što si svakom mom problemu našao rešenje i uvek bio tu za mene. Hvala ti za svaki zagrljaj, svaku lekciju, utehu i pomoć koju mi pružaš. Hvala ti što si uvek moj vetar u leđa i moja mirna luka. Hvala za beskrajnu ljubav koju mi daješ!

SAŽETAK

Hidrogelovi predstavljaju polimerne mreže sa hidrofilnim osobinama, sposobne da apsorbuju velike količine vode, uz povećanje svoje zapremine. Geliranje se može izvesti fizičkim ili hemijskim tipovima umrežavanja polimernih lanaca, koji mogu da vode poreklo od prirodnih i sintetičkih polimera. U oblastima biomedicine, najzastupljeniji su hidrogelovi dobijeni od prirodnih polimera, kao što su polisaharidi i njihovi derivati.

Cilj ovog rada je bio modifikovati različite polisaharide (alginat, pektin, karboksimetilceluloza) fenolnim jedinjenjima (tiramín, tirozin, dopamin, L-DOPA), sa ciljem dobijanja polimera sposobnih da grade hidrogelove. Uspešnost modifikacije je okarakterisana UV-Vis, FTIR i ^1H NMR spektroskopskim metodama. Ispitana je njihova sposobnost geliranja, nakon čega su oni sa najpogodnijim karakteristikama primenjeni u različitim oblastima.

Dopaminski derivati alginata su korišćeni za enkapsulaciju ćelijskih zidova sa enzimom lakazom, dobijenih lizom ćelija *Saccharomyces cerevisiae* sa prethodno eksprimiranom lakazom na površini ćelije. Dobijeni ćelijski zidovi sa lakazom su pokazali 300 puta veću enzimsku aktivnost u odnosu na nelizirane ćelije. Uspešno je urađena imobilizacija u kalcijum-dopamin-alginatnim kuglicama, koje su pokazale prednost u odnosu na kuglice sa nativnim alginatom. Ovako dobijeni biokatalizatori su korišćeni za dekolorizaciju tekstilnih boja Amido Black 10B, Reactive Black 5, Evans Blue, i Remazol Brilliant Blue. Nakon 10 ciklusa dekolorizacije od po 48 sati, efikasnost dekolorizacije za boje Evans Blue i Amido Black 10 B je iznosila 90 % i 61 %, navedenim redom.

Lakaza iz *Streptomyces cyaneus* je takođe eksprimirana u *E. coli*, izolovana i prečišćena. Izolovana lakaza je imobilizovana u dopamin-pektinskim mikrokuglicama, metodom enzimske polimerizacije u emulziji. Imobilizovana lakaza je pokazala povećanu termalnu i pH stabilnost u odnosu na slobodan enzim, kao i sposobnost dekolorizacije boja Amido Black 10B, Reactive Black 5 i Evans Blue. U uzastopnim ciklusima dekolorizacije boja je ovaj biokatalizator pokazao najviše potencijala za degradaciju boja Amido Black 10B i Reactive Black 5.

Sintetisani dopaminski derivati karboksimetilceluloze i alginata su korišćeni za proizvodnju nanovlakana elektrospining metodom. Dobijena nanovlakna su dodatno umrežavana i korišćena kao podloga za gajenje ćelija fibroblasta (MRC-5). Dopamin-alginatna nanovlakna su se pokazala kao dobar materijal za gajenje ćelija, što je pokazano snimanjem SEM-a i MTT esejem, iz čega bi moglo da se zaključi da su adhezija i proliferacija ćelija moguće na ovim nanovlaknima i da su ona potencijalno dobar materijal za tkivni inženjering.

Ključne reči:

Hidrogel, imobilizacija, lakaza, degradacija boja, elektrospining, alginat, pektin.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

ABSTRACT

Hydrogels are polymer networks, which have hydrophilic properties and could absorb large amount of water, increasing their volume. They could form gels either by physical or chemical cross-linking of polymer chains and could be derived from natural and synthetic polymers.

The aim of this study was to modificate diverse polysaccharides (alginate, pectin, and carboxymethylcellulose) with phenol compounds (tyramine, tyrosine, dopamine, L-DOPA), in order to obtain polymers which could form hydrogels. The success of modification was confirmed by UV-Vis, FTIR and ¹H NMR spectroscopy. Their gelling ability was investigated, afterward polymers with the most suitable characteristics were applied in different areas.

Dopamine alginate derivatives were used to encapsulate cell walls with the enzyme laccase, obtained by lysing cells of *Saccharomyces cerevisiae*, with previously expressed laccase on the cell surface. The obtained cell wall laccase has shown 300 times higher enzyme activity, compared to the whole cells. Immobilization was successfully performed in calcium-dopamine-alginate beads, which showed an advantage compared to beads with native alginate. Thus obtained biocatalyst were used for decolorization of textile dyes Amido Black 10B, Reactive Black 5, Evans Blue, and Remazol Brilliant Blue. After ten cycles of repeated use, decolourization efficiency for dyes Evans Blue and Amido Black 10B was 90 % and 61 %, respectively.

Laccase from *Streptomyces cyaneus* was also expressed in *E. coli*, isolated and purified. The isolated laccase was immobilized in dopamine-pectin microbeads, using emulsion-based enzymatic crosslinking polymerization. The immobilized laccase showed improved thermal and pH stability in comparison to the free enzyme, and ability of decolorization dyes Amido Black 10B, Reactive Black 5 and Evans Blue. In successive cycles of dyes decolorization, this biocatalyst showed the greatest potential for degradation of Amido Black 10B and Reactive Black 5.

The synthesized dopamine derivatives of carboxymethylcellulose and alginate were used for the production of nanofibers by the method of electrospinning. The obtained nanofibers were additionally crosslinked and used as a scaffold for fibroblast cells (MRC-5) cultivation. Dopamine-alginate nanofibers have been shown as a good material for cell cultivation, as shown by SEM

imaging and MTT assay. It could be concluded that cell adhesion and proliferation are possible on these nanofibers and they are potentially good material for tissue engineering.

Key words:

Hydrogel, immobilization, laccase, dye degradation, electrospinning, alginate, pectin

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Lista skraćenica

AA - akrilamid

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

ADA - hidrazid adipinske kiseline

APS - amonijum persulfat

BBR - Bismark Brown R

BSA - albumin iz goveđeg seruma (od engl. Bovine Serum Albumin)

CBB - od engl. Coomassie Brilliant Blue

CAA – eng. casamino acids

CBB - od engl. Coomassie Brilliant Blue

CMC - karboksimetilceluloza

DMEM - Dulbekov modifikovan "Eagle" medijum

DMSO – dimetilsulfoksid

EDTA – etilendiamin-tetrasirćetna kiselina

FDA - Food and Drug Administration

Gal – galaktoza

Glc – glukoza

HBT - 1-hidroksibenzotriazol

HMDI - heksametilen-diizocijanat

HPLC - tečna hromatografija visokih performansi (od engl. High Performance Liquid Chromatography)

IMAC – afinitetna hromatografija sa imobilizovanim metalom (od engl. Immobilized metal affinity chromatography)

LB – Luria-Bertani

LG - Lanaset Grey G

MTP – mikrotitar ploča sa 96 bunara

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza

PAHs - policiklični aromatični ugljovodonići (od eng. polycyclic aromatic hydrocarbons)

PBS - fosfatom puferisan fiziološki ratsvor (od engl. Phosphate-Buffered Saline)

PEG – polietilenglikol

PEO - polietilenoksid

PGA – poliglikolna kiselina

PLA – polilaktonska kiselina

PVA - polivinil-alkohol

RB5 - Reactive Black 5

RBBR – Remazol Brilliant Blue R

SDS – natrijum-dodecil-sulfat

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija

TEMED – 1,2-bis(dimetilamino)etan

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometan

YNB – eng. yeast nitrogen base

.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski deo	4
2.1. Hidrogelovi.....	4
2.1.1. Podela hidrogelova.....	4
2.1.2. Sinteza hidrogelova.....	4
2.1.2.1. Dobijanje hidrogelova fizičkim umrežavanjem	5
2.1.2.2. Dobijanje hidrogelova hemijskim umrežavanjem.....	6
2.1.3. Polisaharidi kao materijali za dobijanje hidrogelova.....	8
2.1.4. Alginat.....	8
2.1.4.1. Hemijske osobine alginata	10
2.1.4.2. Jonsko umrežavanje alginata	10
2.1.4.3. Biokompatibilnost	11
2.1.4.4. Primene alginata	11
2.1.4.5. Modifikacija alginata	13
2.1.5. Pektin	17
2.1.5.1. Svojstva pektina i njegova sposobnost geliranja	18
2.1.5.2. Primena pektina	19
2.1.5.3. Modifikacije pektina.....	20
2.1.6. Celuloza	23
2.1.6.1. Karboksimetilceluloza	23
2.1.6.2. Modifikacije CMC	24
2.1.6.3. Primena karboksimetilceluloze	25
2.1.7. Primena hidrogelova	26
2.1.7.1. Primena hidrogelova za dostavu lekova	27
2.1.7.2. Primena hidrogelova za pakovanje	29
2.1.7.3. Primena hidrogelova za zarastanje rana.....	29
2.1.7.4. Primena hidrogelova za tkivni inženjering	31
2.1.7.5. Elektrospining.....	32
2.1.7.6. Primena hidrogelova u imobilizaciji biokatalizatora	35
2.2. Imobilizacija biokatalizatora	35
2.2.1. Tehnike imobilizacije enzima	35

2.2.2.	Matriksi za imobilizaciju	37
2.3.	Lakaze	38
2.3.1.	Strukturne karakteristike	38
2.3.2.	Katalitički mehanizam lakaze	39
2.3.3.	Proizvodnja lakaze	41
2.3.4.	Imobilizacija lakaze	42
2.3.5.	Primena lakaza	42
2.3.5.1.	Prehrambena industrija	42
2.3.5.2.	Papirna industrija	43
2.3.5.3.	Organske sinteze	43
2.3.5.4.	Bioremedijacija i biodegradacija	44
2.3.5.5.	Tekstilna industrija	44
2.3.5.6.	Degradacija boja	45
2.4.	Tekstilne boje kao zagađivači životne sredine	45
2.4.1.	Klasifikacija boja	45
2.4.2.	Metode za uklanjanje tekstilnih boja iz životne sredine	47
2.5.	Ekspresija proteina na površini ćelija kvasca	48
3.	Materijal i metode	52
3.1.	Materijal	52
3.1.1.	Oprema	52
3.1.2.	Hemikalije	52
3.1.3.	Izvor genskog konstrukta za lakazu	53
3.1.4.	Vektori i sojevi	53
3.2.	Mikrobiološke metode	53
3.2.1.	Medijumi za rast bakterija	54
3.2.1.1.	Super optimalni tečni medijum za rast bakterija (SOC medijum)	54
3.2.1.2.	Luria–Bertani medijum za rast bakterija (LB medijum)	54
3.2.1.3.	Luria–Bertani medijum za rast bakterija sa rezistencijom na ampicilin (LB – ampicilin) 54	
3.2.1.4.	Luria–Bertani medijum za rast bakterija sa rezistencijom na kanamicin i hloramfenikol (LB–kanamicin, hloramfenikom)	54
3.2.1.5.	Luria–Bertani čvrst medijum za rast bakterija (LA medijum)	54

3.2.1.6.	Luria–Bertani čvrst medijum za rast bakterija sa rezistencijom na ampicilin (LA–ampicilin)	55
3.2.1.7.	Luria–Bertani čvrst medijum za rast bakterija sa rezistencijom na kanamicin i hloramfenikol (LA–kanamicin, horamfenikol)	55
3.2.2.	Medijumi za rast kvasaca	55
3.2.2.1.	YPD tečni medijum za rast kvasaca	55
3.2.2.2.	YPD čvrsti medijum za rast kvasaca	55
3.2.2.3.	2xYPAD tečni medijum za rast kvasaca	55
3.2.2.4.	Tečni selektivni medijum za rast kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A)	56
3.2.2.5.	Tečni selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A)	56
3.2.2.6.	Čvrsti selektivni medijum za rast kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A)	56
3.2.3.	Kompetentne ćelije	56
3.2.3.1.	Pripremanje hemijski kompetentnih ćelija bakterija <i>Escherichia coli</i> DH5α soja	56
3.2.3.2.	Pripremanje hemijski kompetentnih ćelija bakterija <i>Escherichia coli</i> BL21 soja	57
3.2.3.3.	Pripremanje hemijski kompetentnih ćelija kvasaca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100	57
3.3.	Molekularno–biološke metode	58
3.3.1.	Transformacija kompetentnih ćelija <i>Escherichia coli</i>	58
3.3.2.	Transformacija kompetentnih ćelija <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
3.3.3.	Izolovanje plazmida	58
3.3.3.1.	Izolovanje plazmida iz bakterija	58
3.3.4.	Proizvodnja lakaze u <i>Escherichia coli</i> BL21 soju	59
3.3.5.	Proizvodnja lakaze u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soju	59
3.4.	Preparativne metode	60
3.4.1.	Afinitetna hromatografija	60
3.5.	Analitičke metode	60
3.5.1.	Određivanje enzimске aktivnosti	60
3.5.1.1.	Određivanje enzimске aktivnosti slobodne lakaze	60
3.5.1.2.	Određivanje enzimске aktivnosti imobilizovane lakaze u mikrokuglicama	61
3.5.1.3.	Određivanje enzimске aktivnosti lakaze na površini ćelija kvasca	61
3.5.1.4.	Određivanje enzimске aktivnosti lakaze na ćelijskim zidovima	61

3.5.1.5.	Određivanje enzimске aktivnosti imobilizovane lakaze na ćelijskim zidovima	61
3.5.2.	Određivanje koncentracije proteina Bredfordovom metodom	62
3.5.2.1.	Određivanje koncentracije proteina Bredfordovom metodom.....	62
3.5.2.2.	Sprektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina.....	62
3.5.3.	Denaturišuća elektroforeza (SDS–PAGE).....	62
3.5.4.	Nativna elektroforeza.....	63
3.5.5.	Detekcija aktivnosti lakaze u nativnom gelu (zimogram)	64
3.5.6.	Karakterizacija lakaze.....	65
3.5.6.1.	Određivanje pH optimuma lakaze	65
3.5.6.2.	Određivanje pH stabilnosti lakaze.....	65
3.5.6.3.	Određivanje temperaturene stabilnosti lakaze	65
3.5.6.4.	Određivanje kinetičkih parametara lakaze	65
3.6.	Proizvodnja liziranih ćelijskih zidova sa eksprimiranom lakazom.....	65
3.7.	Modifikacija pektina	66
3.7.1.	Perjodatna oksidacija	66
3.7.2.	Reduktivna aminacija natrijum-cijanoborhidridom i dopaminom.....	66
3.8.	Modifikacija alginata.....	67
3.8.1.	Perjodatna oksidacija alginata.....	67
3.8.2.	Reduktivna aminacija natrijum-cijanoborhidridom i dopaminom.....	67
3.8.3.	Reduktivna aminacija natrijum-cijanoborhidridom i L-DOPA-om.....	68
3.9.	Modifikacije karboksimetilceluloze fenolnim jedinjenjima	68
3.9.1.	Perjodatna oksidacija	68
3.9.2.	Reduktivna aminacija natrijum-cijanoborhidridom i tiraminom/tirozinom/dopaminom	69
3.9.2.1.	Modifikacija tiraminom.....	69
3.9.2.2.	Modifikacija tirozinom	69
3.9.2.3.	Modifikacija dopaminom	69
3.10.	Karakterizacija modifikovanih polisaharida.....	70
3.10.1.	Snimanje UV-Vis spektara.....	70
3.10.2.	Snimanje FTIR spektara.....	70
3.10.3.	Snimanje ¹ H NMR spektara	70
3.10.4.	Provera sposobnosti formiranja hidrogelova.....	70
3.10.4.1.	Geliranje u prisustvu vodonik-peroksida i peroksidaze iz rena	70

3.10.4.2.	Geliranje u prisustvu natrijum-perjodata u baznoj sredini	71
3.10.4.3.	Geliranje neorganskim solima.....	71
3.11.	Imobilizacija slobodne lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama.....	71
3.11.1.	Prinos imobilizacije.....	72
3.11.2.	Optimizacija imobilizacije slobodne lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama	72
3.12.	Imobilizacija ćelijskih zidova sa lakazom u alginatne i dopamin-alginatne kuglice .	73
3.12.1.1.	Prinos imobilizacije	73
3.12.1.2.	Optimizacija imobilizacije ćelijskih zidova sa lakazom u alginatne i dopamin-alginatne kuglice	73
3.13.	Karakterizacija imobilizovane lakaze.....	74
3.13.1.	Određivanje pH optimuma	74
3.13.2.	Određivanje pH stabilnosti.....	74
3.13.3.	Određivanje temperaturne stabilnosti.....	74
3.13.4.	Određivanje kinetičkih parametara	74
3.14.	Dekolorizacija tekstilnih boja.....	75
3.14.1.	Dekolorizacija boja imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lakazom u dopamin-alginat kuglicama	75
3.14.2.	Ponovna upotreba kuglica sa imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lakazom ..	76
3.14.3.	Dekolorizacija boja imobilizovanom lakazom u dopamin-pektin mikrokuglicama	76
3.14.4.	Ponovna upotreba mikrokuglica sa imobilizovanom lakazom	76
3.15.	Elektrospining.....	77
3.15.1.	Ispiranje i umrežavanje nanovlakana	78
3.16.	Gajenje ćelija na nanovlaknima.....	78
3.16.1.	Priprema nanovlakana sa ćelijama za skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM)	78
3.16.2.	Esej za određivanje citotoksičnosti (MTT esej).....	79
4.	Rezultati i diskusija.....	80
4.1.	Ekspresija lakaze na površini ćelija kvasca.....	80
4.2.	Ćelijska liza	82
4.3.	Sinteza i karakterizacija dopamin-alginata	83
4.4.	Imobilizacija ćelijskih zidova u alginatnim i dopamin-alginatnim kuglicama	87
4.4.1.	Optimizacija imobilizacije ćelijskih zidova u alginatnim i dopamin-alginatnim kuglicama.....	87

4.4.2.	Prinos imobilizacije	89
4.5.	Karakterizacija slobodnih i imobilizovanih ćelijskih zidova	90
4.5.1.	Određivanje pH optimuma.....	91
4.5.2.	Određivanje pH stabilnosti	91
4.5.3.	Određivanje temperaturne stabilnosti	92
4.5.4.	Određivanje kinetičkih parametara	93
4.6.	Proizvodnja lakaze u <i>Escherichia coli</i> BL21 soju, izolovanje i prečišćavanje	94
4.7.	Sinteza i karakterizacija dopamin-pektina	96
4.8.	Imobilizacija dobijene lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama	101
4.9.	Karakterizacija slobodne i imobilizovane lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama	105
4.9.1.	pH optimum	105
4.9.2.	pH stabilnost	106
4.9.3.	Temperaturna stabilnost.....	107
4.9.4.	Kinetički parametri	109
4.10.	Dekolorizacija boja imobilizovanom lakazom	109
4.10.1.	Dekolorizacija boja imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lakazom u dopamin-alginatnim kuglicama.....	110
4.10.2.	Ponovna upotreba imobilizovanih ćelijskih zidova sa lakazom za dekolozaciju boja	112
4.10.3.	Dekolorizacija boja imobilizovanom lakazom u mikrokuglicama dopamin-pektina	114
4.10.4.	Ponovna upotreba mikrokuglica sa lakazom za dekolozaciju boja	116
4.11.	Sinteza i karakterizacija L-DOPA-alginata	117
4.12.	Sinteza i karakterizacija derivata karboksimetilceluloze i tiramina, tirozina i dopamina	121
4.13.	Geliranje dobijenih derivata CMC-a	131
4.13.1.	Geliranje u prisustvu vodonik-peroksida i peroksidaze iz rena	131
4.13.2.	Geliranje u prisustvu natrijum-perjodata u baznoj sredini	132
4.13.3.	Geliranje modifikata CMC-a u prisustvu neorganskih soli.....	132
4.14.	Elektrospining dopamin-karboksimetilceluloze i dopamin-alginata.....	133
4.14.1.	Umrežavanje nanovlakana	134
4.14.2.	Karakterizacija nanovlakana na SEM	135
4.15.	Gajenje ćelija na nanovlaknima.....	137

4.15.1. MTT esej	138
5. Zaključci	140
6. Literatura.....	145

1. Uvod

Hidrogelovi su trodimenzionalne, hidrofilne, polimerne mreže, kojima je glavna karakteristika da mogu da vežu velike količine vode, povećavajući svoju zapreminu. Od kada su prvi put primenjeni, šezdesetih godina prošlog veka, pa do danas kada su postali važan deo raznih industrijskih primena, hidrogelovi se iznova istražuju, modifikuju, optimizuju i komercijalizuju. [1] Hidrogelovi mogu da imaju poreklo od prirodnih ili sintetičkih polimera, pri čemu i jedni i drugi imaju svoje prednosti i mane, pa se u zavisnosti od željene primene određuje tip materijala za sintetisanje hidrogela. U oblastima biomedicinskih nauka prednost imaju hidrogelovi izgrađeni iz biomaterijala, koji poseduju osobine kao što su biodegradabilnost, biokompatibilnost, netoksičnost, itd. Razni prirodni polisaharidi, kao što su: alginat, hitozan, hijaluronska kiselina, pektin, gumiarabika, ksilan, poseduju navedene karakteristike i čine dobar materijal za sintezu hidrogelova. [2] Sa ciljem optimizacije uslova umrežavanja hidrogelova i njihovih karakteristika, prirodni polimeri se često modifikuju, uvođenjem novih funkcionalnih grupa koje obezbeđuju nove karakteristike ili omogućavaju umrežavanje. [3]

Alginat, pektin i karboksimetilceluloza predstavljaju prirodne polisaharide, dobijene iz obnovljivih izvora, koji danas pronalaze primenu u raznovrsnim oblastima. Alginat je polisaharid algi, koji se sastoji od uronskih kiselina (od β -D-manuronske kiseline i α -L-guluronske kiseline) povezanih 1 \rightarrow 4 glikozidnim vezama, usled čega poseduje sposobnost geliranja u prisustvu dvovalentnih katjona. Zbog sposobnosti građenja gela, alginat se koristi kao sredstvo za zgrušavanje i geliranje, kao stabilizator u prehrambenoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji. [4]

Bitnu primenu u navedenim oblastima imaju i drugi prirodni polimeri, kao što su pektin i karboksimetilceluloza (CMC). Pektin spada u heteropolisaharide koji grade ćelijski zid biljaka i sastoji se u najvećoj meri od homogalakturonana povezanih α (1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama, od kojih je određen broj metil-esterifikovan. [5] Karboksimetilceluloza je jedan od glavnih derivata celuloze, koji ima širu primenu od same celuloze zbog svoje bolje rastvorljivosti. Ona može da se koristi kao stabilizator, za pravljenje suspenzija, zgušnjavanje, formiranje filmova, itd. [6]

Danas se hidrogelovi koriste u raznim granama primene, prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj industriji, itd., ali najveći značaj predstavlja njihova primena u biomedicinskim

oblastima, kao što su tkivni inženjering, dostava lekova, za zarastanje rana, za proizvodnju biosenzora, itd. [1, 7]

Tkivni inženjering predstavlja veoma bitnu granu biomedicine, koja se zasniva na istraživanju različitih materijala sa ulogom skela (“scaffolds”) za gajenje ćelija, pri čemu taj materijal imitira ekstracelularni matriks i omogućava pravilan rast ćelija, kao i njegovu dalju diferencijaciju, proliferaciju i formiranje željenog tkiva. [8] Hidrogelovi su pronašli ulogu u ovoj oblasti zbog svoje biokompatibilnosti, biodegradabilnosti, netoksičnosti, itd. Struktura samog materijala ima veliki uticaj na adheziju ćelije, proliferaciju, biohemijsku aktivnost, itd., i pokazalo se da matriks za gajenje ćelija sa nanostrukturom pruža bolju ćelijsku potporu, adheziju i proliferaciju, u odnosu na matriks sa mikrostrukturom. Zbog toga je u ovoj oblasti primenu pronašla elektrospining metoda, kojom se pod dejstvom visokog električnog napona proizvode nanovlakna polimera, koja omogućavaju rast ćelija i formiranje tkiva u tri dimenzije. [9]

Jedna od glavnih primena polimera u biotehnologiji je imobilizacija enzima i ćelija. Na ovaj način se obezbeđuje strukturna potpora i imobilizovani biokatalizator se štiti od spoljašnjih uticaja, pri čemu može da dođe do poboljšanih katalitičkih osobina u odnosu na slobodan enzim. [10] Pored toga, imobilizovani biokatalizatori se mogu jednostavno ukloniti iz reakcione smeše i ponovo upotrebljavati. Do sada su istražene razne tehnike imobilizacije, a takođe i sintetisani mnogobrojni matriksi za imobilizaciju. [11]

Lakaze su enzimi koji spadaju u grupu oksidoreduktaza i predstavljaju monomerne glikoproteine koji u svom sastavu imaju više atoma bakra. Ovi enzimi mogu da vode poreklo iz različitih bakterija, gljiva, a katalizuju oksidaciju raznovrsnih supstrata, kao što su orto- i para-difenoli, diamini, benzentioli, fenolne komponente lignina, itd. Pošto koriste molekularni kiseonik kao elektron akceptor, jedini sporedni proizvod njihove katalize je voda, što čini lakazu ekološki prihvatljivom. [12] Lakaze su danas veoma primenjive u raznim oblastima jer imaju sposobnost umrežavanja monomera, degradacije polimera, tekstilnih boja, otvaranja aromatičnih prstenova, sinteze organskih komponenti, itd. [13]

Jedna od oblasti gde su lakaze široko pronašle svoju primenu je bioremedijacija, prilikom prečišćavanja otpadnih voda od različitih zagađivača koji imaju negativan uticaj na životnu sredinu. Tekstilna industrija je jedna od najvećih zagađivača današnjice, pa je degradacija boja otpadnih voda ove industrije veliki izazov. Lakaze iz različitih izvora, imobilizovane u

raznovrsnim materijalima, su ispitivane u ove svrhe i pokazale su se kao dobri biokatalizatori. [14-16]

2. Teorijski deo

2.1. Hidrogelovi

Hidrogelovi su trodimenzionalne mreže hidrofilnih polimera, koje imaju sposobnost vezivanja velike količine vode. Mogu još i da se definišu kao polimerni materijali koji poseduju sposobnost vezivanja i zadržavanja velike količine vode, a da se pritom ne rastvaraju u vodi. Njihova sposobnost da vezuju veliku količinu vode potiče od prisustva velikog broja hidrofilnih funkcionalnih grupa, a otpornost na rastvaranje u vodi potiče od umreženja koja postoje između lanaca polimera. [17] Zbog svoje strukture i velikog postotka vode imaju visok stepen fleksibilnost, koji može da se uporedi sa fleksibilnošću tkiva. Već dugi niz godina privlače pažnju naučnika, zbog svog velikog potencijala za biomedicinske svrhe, pa se danas hidrogelovi primenjuju u tkivnom inženjeringu, dostavi lekova, kao materijali za poboljšano zarastanje, biosenzori, itd. [18]

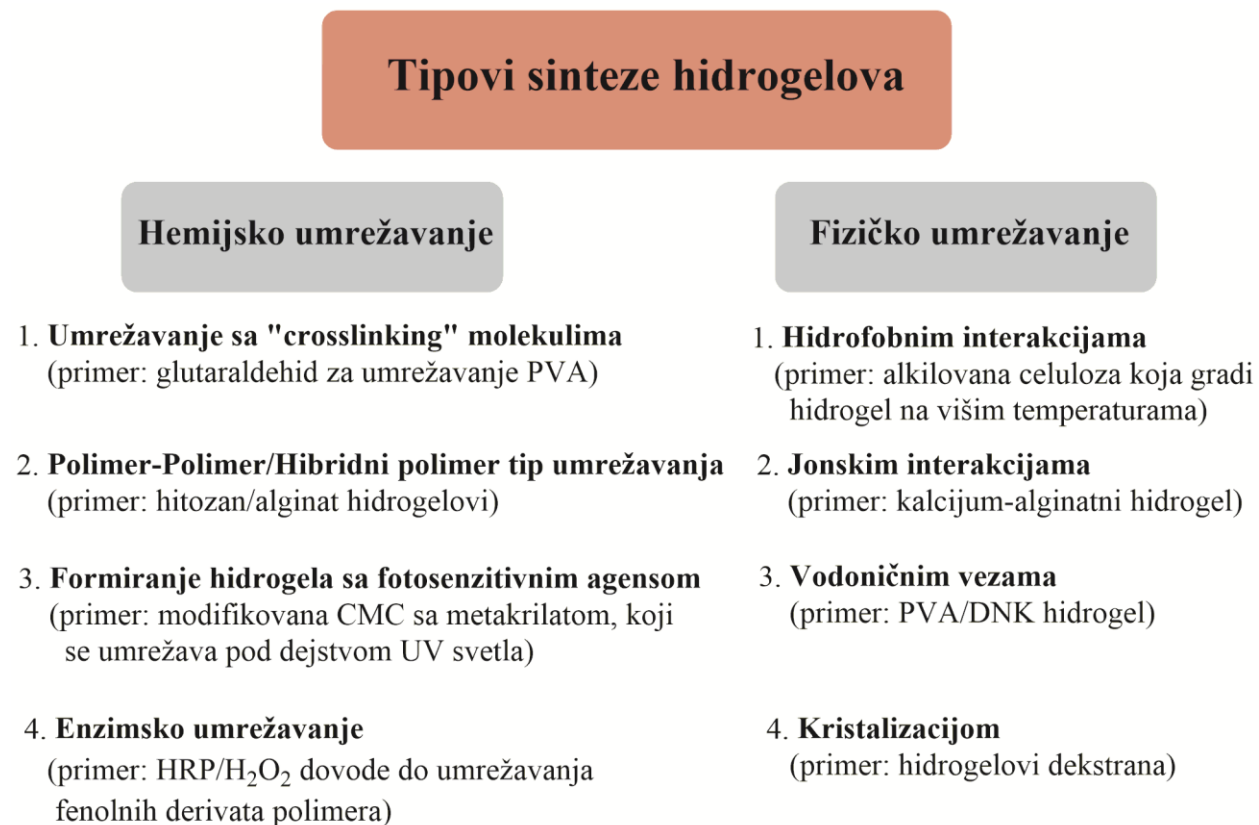
2.1.1. Podela hidrogelova

Hidrogelovi se mogu podeliti na osnovu različitih kategorija, a to su: na osnovu njihovog porekla (prirodni i sintetički), na osnovu sastava polimera koji ih sačinjavaju (homopolimerni, kopolimerni, multipolimer-interpretirajući hidrogelovi), na osnovu fizičke i hemijske strukture (amorfni, semikristalni, kristalni), na osnovu tipa umreženja (hemijski i fizički umreženi hidrogelovi), na osnovu fizičkog izgleda (oblik matriksa, filma ili mikrosfere) i na osnovu naelektrisanja veze (neutralni, jonski, amfoterični, cviter-joni). [17]

2.1.2. Sinteza hidrogelova

Hidrogelovi mogu da budu sačinjeni od prirodnih ili sintetičkih polimera. Hidrogelovi su generalno sačinjeni od hidrofilnih monomera, koji mogu da vezuje veliku količinu vode, ali se često kombinuju sa sintetičkim polimerima, koji su hidrofobni, u cilju regulacije karakteristika samog hidrogela. [17] Sintetički polimeri su hemijski i mehanički stabilniji od prirodnih polimera, a njihova mehanička stabilnost obezbeđuje sporiju brzinu degradacije, pa samim tim i duže trajanje hidrogela. Naravno, hidrogelovi mogu biti izgrađeni samo od prirodnih polimera, ukoliko oni imaju odgovarajuće funkcionalne grupe, ili su optimizovani sa grupama koje mogu da polimerizuju. Zato danas postoji veliki broj modifikacija polimera, sa ciljem uvođenja novih funkcionalnih grupa, pogodnih za umrežavanje, ili kombinovanja sa drugim polimerima, sve u

cilju dobijanja hidrogelova. Mehanizmi građenja hidrogelova mogu biti različiti, a neki od njih su: 1. Fizičko umrežavanje [19], 2. Hemijsko umrežavanje [20], 3. Polimerizacioni grafting [21], 4. Fotopolimerizacija [22-24]. Glavna podela na tipove sinteze hidrogelova je na fizičko umrežavanje i hemijsko umrežavanje, a oni se dalje mogu klasifikovati. (Slika 1)



Slika 1: Tipovi sinteze hidrogelova

2.1.2.1. Dobijanje hidrogelova fizičkim umrežavanjem

Ovaj mehanizam sinteze hidrogelova ima prednost u odnosu na ostale jer ne zahteva upotrebu umreživača, već do stvaranja hidrogela dolazi prilikom menjanja uslova, npr. zagrevanja ili hlađenja rastvora polimera [25, 26], stvaranjem jonskih interakcija [27], vodoničnih veza [28], itd. Ovakvi hidrogelovi često imaju manju stabilnost od hidrogelova koji nastaju kovalentnim umrežavanjem, zbog relativno slabih interakcija koje se stvaraju između polimernih lanaca (vodonične veze, hidrofobne ili jonske interakcije), pa samim tim promenom uslova njihova struktura može da bude narušena. [29]

Umrežavanje zasnovano na hidrofobnim interakcijama je uočeno kod alkilovanih celuloznih derivata (metil, etil, hidroksietil i hidroksipropil metil-celuloze) gde se formiraju hidrogelovi

prilikom zagrevanja iznad određene temperature (koja zavisi od stepena alkilacije). Ovo se objašnjava tim što su celulozni lanci hidratizirani na nižim temperaturama, dok na povećanoj temperaturi dolazi do otpuštanja vode i alkilovane hidroksilne grupe interaguju međusobno hidrofobnim interakcijama, gradeći hidrogel. [18]

Jonsko umrežavanje se vrši dodatkom dvovalentnih ili trovalentnih katjona u rastvor jonizovanih polimera. Najpoznatiji primer ovakve vrste umrežavanja je geliranje alginata u prisustvu dvovalentnih katjona, od kojih se najčešće upotrebljava kalcijum, pri čemu se karboksilne grupe manuronskih i glukuronskih kiselina umrežavaju sa kalcijumovim jonima. Ne moraju samo katjoni da budu umreživači, uočeno je da do jonskog umrežavanja i dolazi između dva prirodna, naelektrisana polisaharida, kao što su hitozan i ksantan. [30] Prednost jonskog umrežavanje je što se ovakvo umrežavanje vrši pri blagim uslovima, kao što su sobna temperatura i fiziološki pH, što je poželjno za biomedicinske primene kao što su zarastanje rana, dostava lekova ili tkivni inženjering.

Neki hidrogelovi nastaju formiranjem vodoničnih veza između hidroksilnih grupa na polimernim lancima. Formiranje hidrogela u ovom slučaju zavisi od koncentracije polimera, molarnog odnosa polimera, tipa rastvarača, temperature, itd. [31] Na ovaj način je dobijen polivinilalkohol (PVA)/dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) hidrogel. [32]

U hidrogelove koji nastaju fizičkim interakcijama spadaju i hidrogelovi koji nastaju kristalizacijom. Tako na primer nastaju hidrogelovi dekstrana, gde dolazi do kristalizacije usled stvaranja vodoničnih veza između lanaca dekstrana, indukovano velikim odnosom polimer/voda. Kristalna struktura je potvrđena IR spektroskopijom i diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC). [33]

2.1.2.2. Dobijanje hidrogelova hemijskim umrežavanjem

Dobijanje hidrogelova se vrši i hemijskim mehanizmima, pri čemu dolazi do stvaranja kovalentnih veza između lanaca polimera. Jedna od metoda je radikalska polimerizacija monomera male molekulske mase u prisustvu umrežavajućeg agensa. Pa je tako jedan od prvih sintetisanih hidrogelova ovom procedurom poli(2-hidroksietil metakrilat) (pHEMA), koji se dobija polimerizacijom HEMA u prisustvu odgovarajućeg umrežavajućeg agensa (npr. etilenglikol metakrilat). [34] Kasnije je sličnim principom sintetisana velika količina hidrogelova.

Stvaranjem hidrogelova pomoću polimerizacije lančanog rasta, stvaraju se heterogene mrežne strukture. Ovaj proces sadrži korake kao što su inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijatori

dovode do proizvodnje aktivnih radikalskih centara, i formiraju se slobodni radikali kao proizvodi homolitičke disocijacije slabih veza ili redoks reakcija. Kada se formiraju aktivna mesta, ona se brzo umnožavaju preko dvostrukih veza između ugljenika monomera i formiraju polimerni lanac. [35] Do formiranja hidrogela dolazi brzim širenjem aktivnih mesta, kada mreža dostigne kritičnu tačku geliranja.

Polimeri koji su rastvorni u vodi sadrže neke od hidrofilnih grupa, najčešće su to hidroksilna, karboksilna i amino grupa, koje mogu da se koriste za formiranje hidrogelova. Reakcijama između odgovarajućih grupa može da dođe do stvaranja kovalentnih veza između lanaca polimera i da se na taj način formira hidrogel. Pa tako npr. u vodi rastvorni polimer sa hidroksilnim grupama (polivinilalkohol, PVA) se umrežava u prisustvu aldehida, glutaraldehida [36], a sa istim ovim umreživačem reaguju i amino-polimeri, gde dolazi do formiranja Šifovih baza. Ova reakcija je primenjivana i na proteine (albumin [37], želatin [38]) i polisaharide koji sadrže amino grupe [39], ali je mana bila korišćenje toksičnog glutaraldehida, što bi bio problem za kasniju biomedicinsku primenu ovih hidrogelova. Kasnije su pronađeni sigurniji načini za formiranje hidrogelova, pa je tako želatin umrežavan sa parcijalno oksidovanim dekstranima, i ovaj hidrogel je korišćen u tretmanima zarastanja rana. [40] U cilju formiranja stabilnijih hidrogelova alginata, u odnosu na one jonske umrežene, alginat je kovalentno umrežavan sa N,N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil karbodiimidom (EDC), metodom kojom se polimeri rastvorni u vodi umrežavaju formiranjem amidnih veza. [41]

Polimerizacija u suspenziji je još jedan način sintetisanja hidrogelova, pri čemu se na ovaj način formiraju porozni, polimerni hidrogelovi. Oni nastaju polimerizacijom u prisustvu inertnih rastvarača koji imaju funkciju porogena, tj. agenasa za formiranje pora. Prvo se formira vodena suspenzija, dispergovanjem mikrokapsula porogena u vodenu fazu koja sadrži monomere i umreživače. Dobijen kompozitni hidrogel sadrži u sebi mikrokapsule nakon što je došlo do geliranja vodene faze, a zatim se vrši razbijanje strukture mikrokapsula u hidrogelu, hemijskim tretmanom. [42] Na ovaj način mogu da se sintetišu makroporozni gelovi sa tačno definisanim veličinama pora, kao i stepenom zastupljenosti pora u gelu. Ovakvi hidrogelovi pronalaze primenu u imobilizaciji biokatalizatora, koji se zarobljavaju u porama hidrogela. [42]

Enzimski katalizovano umrežavanje polimera je metoda najmanje štetna po životnu sredinu, s'obzirom da se vrši pri veoma blagim uslovima, sa biokatalizatorima. [43] Ovom metodom dolazi do formiranja međumolekulskih kovalentnih veza, pri reakciji koja je visoko

selektivna i blagih uslova. Enzimsko umrežavanje može da se vrši preko 2 glavna mehanizma: u prvom dolazi do direktnog formiranja kovaletne veze između molekula (ovakav tip umrežavanja katalizuju hidrolaze i transferaze); dok u drugom enzim diriguje stvaranje reaktivnih vrsta, koje naknadno reaguju sa molekulom i dovode do stvaranja kovaletne veze (ovakav tip umrežavanja katalizuju oksidoreduktaze). [44]

Fotopolimerizacija je jedan od *in situ* načina formiranja hidrogelova i ona je najčešće inicirana ultraljubičastim (100–400 nm), vidljivim (400–700 nm) ili infracrvenim (780–20,000 nm) zračenjem. Na ovaj način se rastvor monomera pretvara u hidrogel, slobodno-radikalskom polimerizacijom, gde formirani slobodni radikali iniciraju reakcije kojima dolazi do umreženja polimera [45]. Do sada je sintetisan veliki broj derivata prirodnih polimera koji imaju sposobnost geliranja pod dejstvom određene svetlosti, pa je tako npr. sintetisana karboksimetilceluloza-metakrilat, koja se fotoumrežava pod dejstvom UV svetlosti i gradi hidrogel. [46]

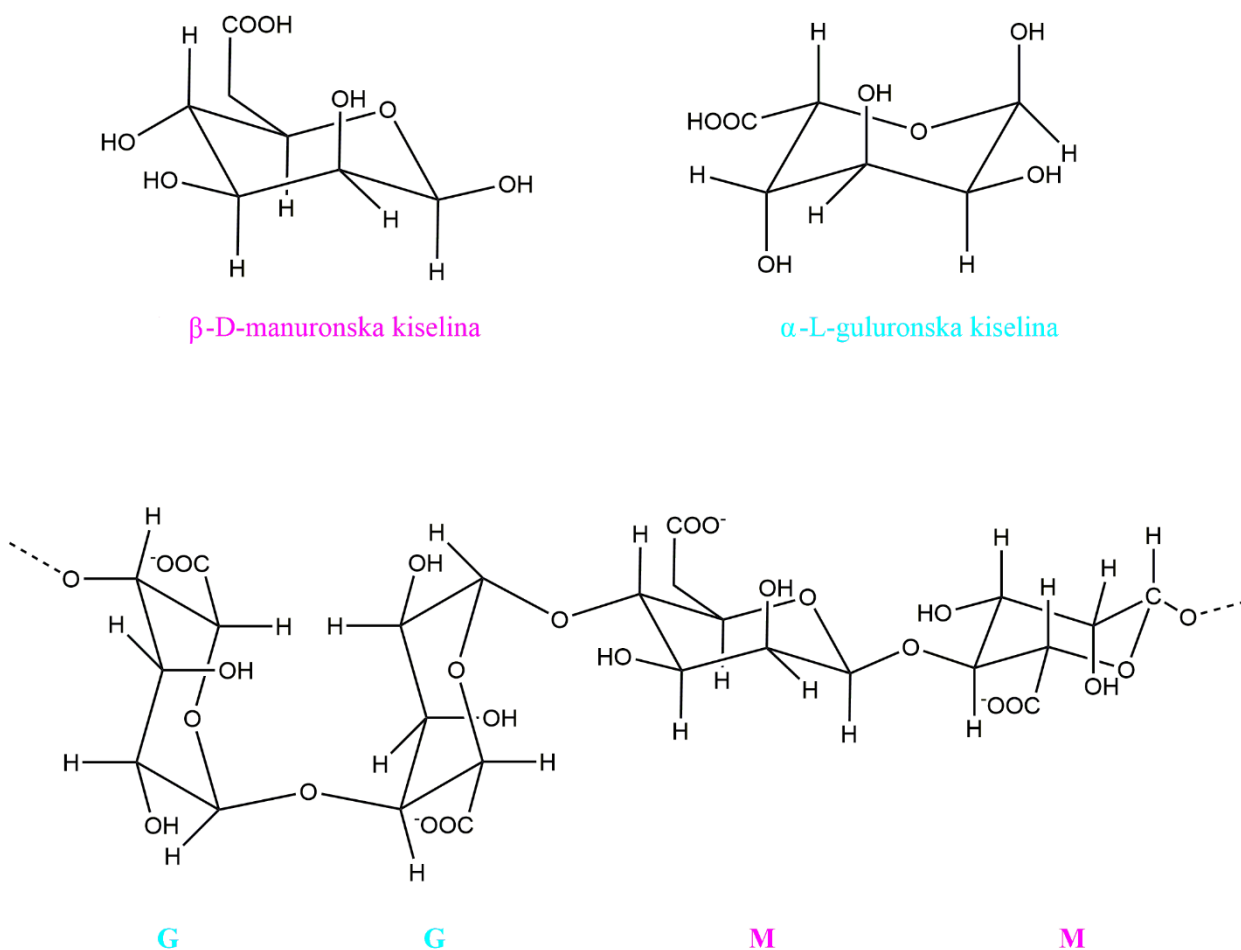
2.1.3. Polisaharidi kao materijali za dobijanje hidrogelova

Polisaharidi su jedan od glavnih materijala za dobijanje hidrogelova. Najčešće su to prirodni polimeri, koji mogu da vode poreklo iz životinja, biljaka, mikrobioloških organizama, itd. Da bi polimer bio dobar materijal za hidrogelove, on treba da ima karakteristike kao što su sposobnost bubrenja, permeabilnost, sposobnost apsorpcije, biodegradabilnost, biokompatibilnost, necitotoksičnost, a sve ove kriterijume ispunjavaju prirodni polisaharidi. Svojstva polimernog lanca, kao njihova umrežena struktura, imaju bitan uticaj na svojstvo samog hidrogela. Iz ovog razloga su mnogobrojni polisaharidi okarakterisani za ovu oblast primene, a takođe su i mnogi modifikovani, ne bi li se dobile što bolje sposobnosti hidrogela. Do danas su u hemiji hidrogelova pronašli primenu razni prirodni polisaharidi, kao što su: alginat, hitozan, hijaluron, pektin, gumiarabika, ksilan, itd. [2]

2.1.4. Alginat

Polisaharid algi, alginat je prirodni, hidrofilan, anjonski polisaharid, koji danas predstavlja značajan polimer za različite sfere primene. Alginat se sastoji od β -D-manuronske kiseline (M) i α -L-guluronske kiseline (G) koje su povezane 1→4 glikozidnim vezama. [47] U osnovi je linearni blok kopolimer kojeg čine sekvence M subjedinica (M blokovi) i G subjedinica (G blokovi), kao i naizmenične MG sekvence (MG blokovi). [3] (Slika 2) Alginat može biti izolovan iz različitih

algi i bakterija, pa tako njegov sastav, odnos M i G subjedinica, kao i dužina polimera, zavisi od samog izvora izolovanja. [3, 47] Danas se komercijalni alginati uglavnom dobijaju alkalnomekstrakcijom iz algi [48], a kao najčešći izvor se koriste braon alge (*Phaeophyceae*), uključujući sojeve *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* i *Macrocystis pyrifera*. [49] Komercijalni natrijum-alginat je rastvoran u vodi, što ga čini veoma pogodnim za in situ stvaranje hidrogelova, a u prisustvu polivalentnih katjona kao što je kalcijum, ima sposobnost građenja gela. Geliranje alginata se zasniva na njegovoj sposobnosti da vezuje katjone selektivno i kooperativno. [50] Postoje mnogobrojni mehanizmi geliranja alginata, kao što su jonsko umrežavanje, termalno geliranje, slobodno radikalska polimerizacija, „klik reakcija“, itd. Do sada je sintetisan i veliki broj različitih derivata alginata, sa čime je dodatno omogućena različita funkcionalizacija i sposobnost geliranja. [51]



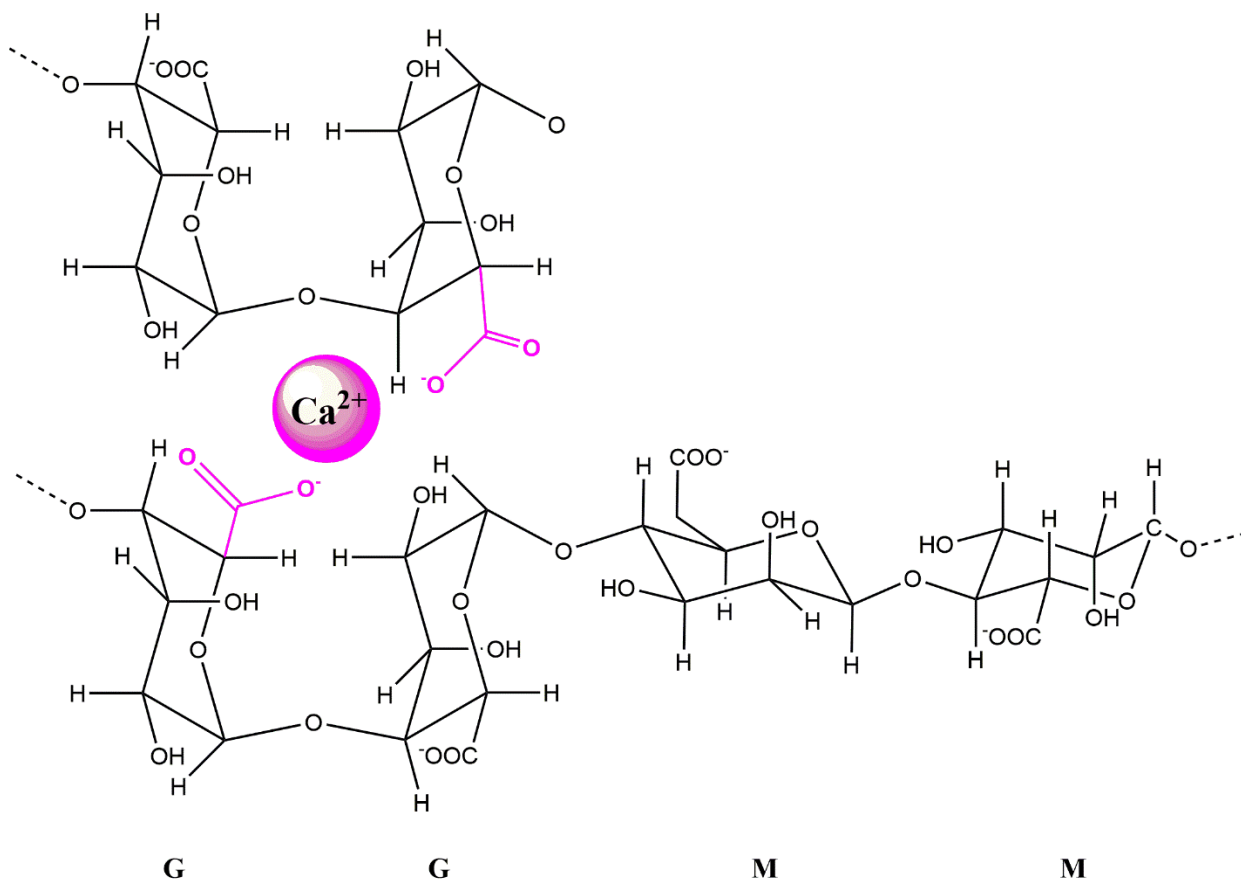
Slika 2: Struktura alginata koju čine β -D-manuronske kiseline (M) i α -L-guronske kiseline (G) povezane 1 \rightarrow 4 glikozidnim vezama.

2.1.4.1. Hemijske osobine alginata

Alginat spada u grupu polisaharida rastvornih u vodi i njegova rastvorljivost zavisi od pH vrednosti rastvora, jonske jačine medijuma, kao i od prisustva gelirajućih jona u rastvoru. Slobodne karboksilne grupe u molekulu alginata su ključne za rastvorljivost alginata, tako da je alginat rastvoran na onim pH vrednostima gde su ove grupe deprotonovane. [3] Na rastvorljivost alginata takođe utiče i njegova molekulska masa, pa se tako sa povećanjem molekulske mase povećava viskoznost rastvora polimera, što je često neželjen efekat. [52]

2.1.4.2. Jonsko umrežavanje alginata

Sposobnost alginata da u prisustvu dvovalentnih katjona formira hidrogelove je jedna od najbitnijih karakteristika ovog polisaharida. Dokazano je da su za to ključne interakcije koje nastaju između G blokova u prisustvu dvovalentnih katjona (Slika 3), dok MG blokovi nešto manje doprinose formiranju hidrogelova. [53, 54] Dvovalentni katjoni u različitoj meri interaguju sa alginatom, a dokazano je da afinitet za vezivanje sledećih katjona opada u nizu $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$, [55] iako je kalcijum danas najviše korišćen dvovalentni katjon za ove svrhe. Model jonskog geliranja alginata je nazvan “egg-box”, gde su dvovalentni katjoni koordinisani za karboksilne grupe guluronske kiseline, povezujući tako različite lance alginata i formirajući oblik kutije jaja. Povezivanje alginatnih lanaca preko kalcijumovih jona dovodi do geliranja rastvora. [56]



Slika 3: Geliranje alginata kalcijumom, usled interakcija G bloka sa kalcijumom

2.1.4.3. Biokompatibilnost

Alginat predstavlja biokompatibilni polisaharid, a njegova biokompatibilnost je ispitivana kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Dokazano je da ekstrahovani alginat, koji je u više koraka prečišćen do visokog stepena čistoće, ne dovodi ni do kakve značajne reakcije organizma nakon implantacije u životinjama. [57] Takođe, ni do kakvih značajnih inflamatornih odgovora nije dovelo ni subkutano ubrizgavanje alginatnih gelova u miševe, dobijenih od komercijalnog alginata visoke čistoće. [58]

2.1.4.4. Primene alginata

Alginat je jedan od najupotrebljivijih prirodnih polisaharida u različitim poljima primene. Količina od 30 hiljada metričkih tona natrijum-alginata se godišnje iskoristi kao stabilizator, sredstvo za zgušnjavanje ili geliranje, u prehrambenoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji. [4]

Alginat je pronašao primenu u prehrambenoj industriji prvenstveno zbog svoje sposobnosti geliranja, pa se on danas koristi kao dodatak tokom pripreme džemova, pekmeza, gde poboljšava i stabilizuje strukturu ovih proizvoda. [59] FDA (Food and drug administration) danas potvrđuje da alginat ispunjava smernice Hemijskog kodeksa za hranu (Food Chemical Codex) i samim tim ga navodi kao povoljnog za sedam različitih upotreba u prehrambenoj industriji. [60] Veoma je bitna sposobnost alginatnih hidrogelova da polimerizuju i grade mikrokapsule sa šupljim jezgrom, koje mogu da posluže za inkapsulaciju hrane i na taj način pospeše njeno očuvanje. [61] Sve više se alginat koristi i u industriji pića, pa se tako u proizvodnji piva koristi kao emulgator za održavanje stabilnosti pene. [62] Alginat se pokazao kao dobar materijal za pakovanje zbog sposobnosti biodegradabilnosti, jačine vlakana i sposobnosti propuštanja vode.

Zbog brojnih dobrih karakteristika, kao što su biokompatibilnost, biodegradabilnost, netoksičnost, sposobnost geliranja i vezivanja helirajućih agenasa, alginat se koristi u raznim biomedicinskim oblastima, kao što su tkivni inženjering, dostava lekova i regeneracija. [63]

Alginatni matriksi su pronašli ulogu i u ciljanoj dostavi lekova. Do sada su korišćeni prilikom dostave različitih lekova manjih molekulskih masa, a najčešća prednost ovakve metode je da interakcija nastala između alginatnog matriksa i leka može da bude kontrolisana i da se na taj način reguliše i kinetičko otpuštanje leka. Formiranjem alginatnih hidrogelova se dobijaju pore nanoveličina (~5 nm) kroz koje mali molekuli mogu brzo da difunduju [64], pa je otpuštanje leka u tim slučajevima zavisno od brzine difuzije leka kroz pore alginatnog gela.

Danas se alginat koristi u oblasti zarastanja rana, gde se različiti oblici alginata (hidrogel, elektrospinovano vlakno, itd.) koriste kao obloge za zarastanje rana, zbog pozitivnih svojstava, kao što su homeostatska sposobnost, sposobnost geliranja nakon apsorpcije eksudata iz rane, itd. [63]

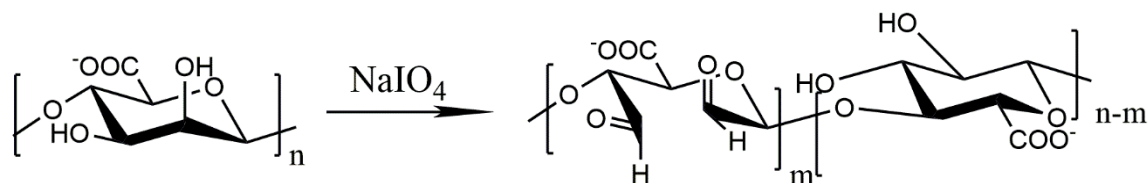
Alginat se pokazao kao efikasan sastojak matriksa koji se koriste kao kožni graftovi prilikom zarastanja rana, što je dovelo do ubrzanog procesa zarastanja, pogotovo kod pacijenata kod kojih je taj proces dodatno usporen, kao što su dijabetičari. [65] Danas postoji nekoliko komercijalno dostupnih kožnih graftova za poboljšano zarastanje rana, a to su Nu-Gel® (Systagenix), Tegagel® (3M GmbH), Curasorb® Alginate (Medtronic), Sorbsan® (B. Braun Melsungen AG), i Kendall™ Hydrocolloid Dressing (Medtronic). [66]

2.1.4.5. Modifikacija alginata

- **Hemijske modifikacije hidroksilne grupe**

Oksidacija

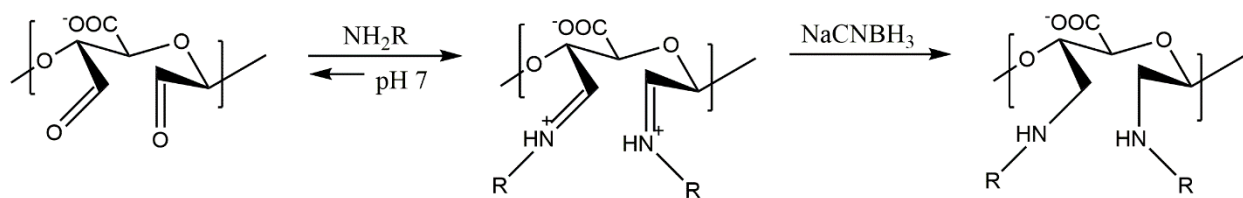
U prisustvu natrijum-perjodata može da se izvrši oksidacija hidroksilnih grupa na C-2 i C-3 poziciji, uz raskidanje C-C veze između ova dva ugljenika, uz stvaranje dve aldehidne grupe. (Slika 4) Pokazalo se da oksidovani alginat ima reaktivnije grupe i brže se degraduje od nativnog, što je veoma bitna karakteristika za kontrolisanu dostavu lekova u alginatnim hidrogelovima. [64] U cilju provere biodegradabilnosti oksidovanog alginata, komercijalni alginat je oksidovan perjodatnom reakcijom i utvrđeno je da se oksidovani alginat nakon 100 h degraduje u potpunosti pri fiziološkim uslovima i da se njegova molekulska masa tokom oksidacije smanjuje sa $11,2 \times 10^4$ g/mol na $3,6 \times 10^4$ g/mol. [67]



Slika 4: Perjodatna oksidacija alginata

Reduktivna aminacija oksidovanog alginata

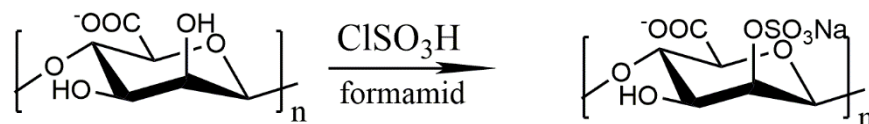
Formiranjem novih funkcionalnih grupa (aldehidne) u lancu alginata, pruža se mogućnost za vršenje dodatnih reakcija, kao što je to reduktivna aminacija. Ona se najčešće vrši u prisustvu natrijum-cijanoborhidrida kao redukcionog sredstva, pre nego natrijum-borhidrida, jer je reaktivnije i selektivnije redukciono sredstvo. (Slika 5) Takođe prednost natrijum-cijanoborhidrida je što se u njegovom prisustvu redukcija intermedijernog imina odvija brzo na pH vrednosti 6-7, na kojoj je redukcija aldehida i ketona zanemarljiva. [68] Do sada je ova reakcija vršena sa različitim aminima, dajući nove derivate alginata. Neki od njih imaju surfaktantne osobine, zbog dodatka dugog alkilnog niza na alginatni lanac, dajući alginatu sposobnost građenja micela i karakteristike površinski aktivnih supstanci. [69, 70]



Slika 5: Reduktivna aminacija alginata

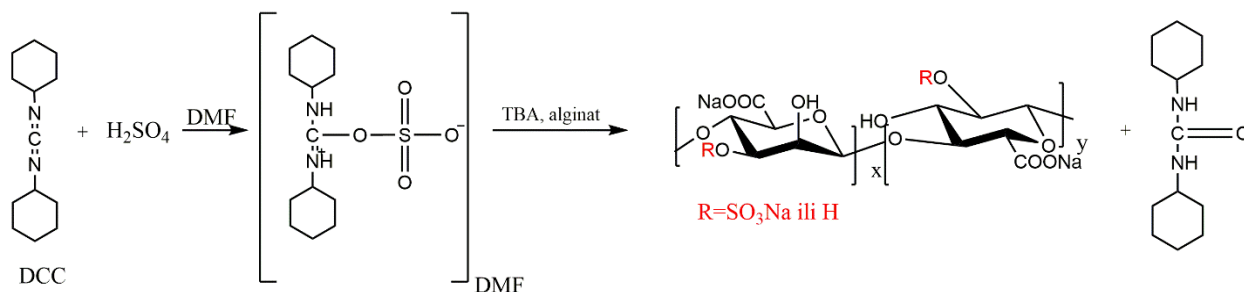
Sulfonovanje

Reakcija sulfonovanja alginata, kao i drugih polisaharida, je reakcija rađena u cilju obezbeđivanja antikoagulantne aktivnosti i kompatibilnosti sa krvlju, usled novonastale sličnosti sa strukturom heparina, prirodnog sulfonovanog polisaharida. [71] Heparin je zbog svoje sposobnosti da sprečava zgrušavanje krvi najviše korišćeni sulfonovani polisaharid prirodnog porekla. Prvi izveštaj o sulfonovanju alginata su prikazali Ronghua i saradnici, modifikujući alginat u prisustvu hlorsumporne kiseline, pri čemu se pokazali da nosintetisani alginat ima antikoagulantnu aktivnost. [72] (Slika 6)



Slika 6: Sulfonovanje alginata

Pored navedenog mehanizma, Cohen i saradnici su uradili sulfonovanje alginata koristeći karbodiimidno kuplovanje. [73] Koristili su N, N - Diciklokarbodiimid (DCC) i sumpornu kiselinu, pri čemu se formira protonovani DCC- H_2SO_4 intermedijer, koji reaguje sa hidrosilnim nukleofilom uz formiranje sulfonovanog alginata. (Slika 7) Testirano je vezivanje ovog derivata alginata, kao i nativnog alginata, za heparin-vezujuće i heparin-nevezujuće proteine. Pokazalo se da se sulfonovani alginat snažno vezuje za heparin-vezujuće proteine, a nativan se ne vezuje uopšte, dok za heparin-nevezujuće proteine nisu pokazali afinitet ni sulfonovan, ni nativan alginat.



Slika 7: Formiranje protonovanog DCC- H_2SO_4 intermedijera, koji reaguje sa hidroksilnim nukleofilom i dolazi do formiranja sulfonovanog alginata

Kopolimerizacija

Kačenje drugih polimera za lanac alginata može da dovede do promene u fizičkim i hemijskim karakteristikama. Pa se tako kačenjem sintetičkih polimera može povećati hidrofobnost i sterna zaštićenost nativnog polimera. Još 1994. godine je urađena alginatna graft kopolimerizacija, koristeći Fentonov reagens kao redoks inicijatorski sistem, za kačenje akrilnitrila i rastućeg polimernog lanca na lanac alginata. [74] Kačenjem polietilenglikola (PEG) za alginat, karbodiimidnim mehanizmom, se dobija kopolimer sa promenjenim karakteristikama, koji i dalje ima očuvane karboksilne grupe neophodne za umrežavanje. [75]

- **Hemijske modifikacije karboksilne grupe**

Esterifikacija

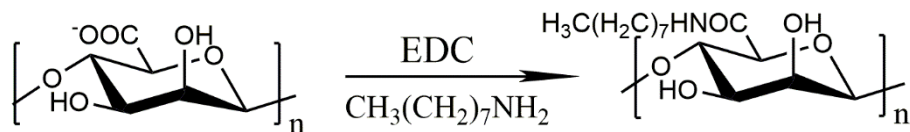
Jedna od osnovnih reakcija koje je vršena na karboksilnoj grupi je njena esterifikacija, pri čemu se alkil grupe kače za lanac alginata i time povećavaju hidrofobnost ovog polimera. (Slika 8) Do sada je sintetisan veliki broj estara alginata sa jednostavnijim alkoholima, a rađena je i esterifikacija sa kompleksnijim molekulima, kao što je holesterol, pri čemu je sintetisan amfifilni holesteril-estar alginata, koji je rastvoran u vodi. [76] Pokazalo se da ovakav estar alginata može da se samoorganizuje u stabilnije i kompaktnije nanoagregate, preko intra- i intermolekulskih hidrofobnih interakcija holesterola, u vodenom rastvoru natrijum-hlorida, što nije primećeno kod nativnog alginata. Esterifikacijom alginata sa butanolom se dobija derivat koji se pokazao kao dobar materijal za inkapsulaciju hidrofilnih i hidrofobnih molekula, zadržavši osobine geliranja i netoksičnosti, koje poseduje nativni alginat. [77]



Slika 8: Esterifikacija alginata

Amidacija

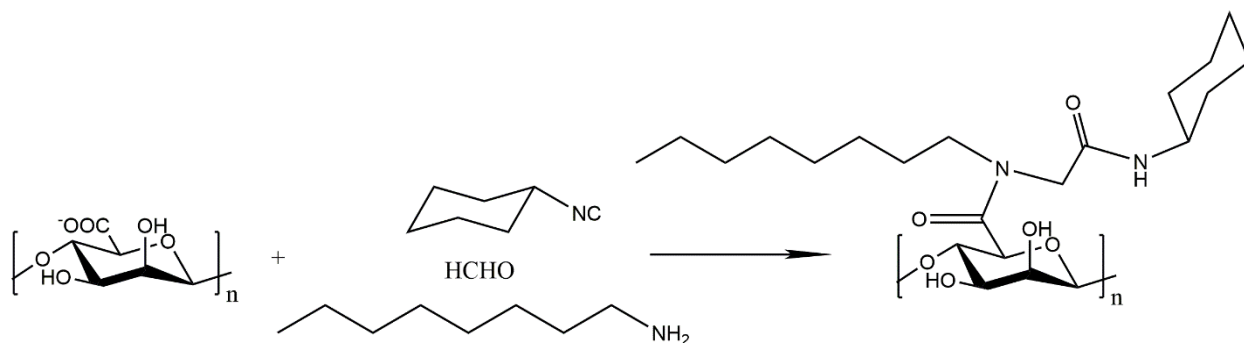
Karbodiimidni mehanizam amidacije alginata je rađen od strane više autora, koristeći 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrohlorid (EDC-HCl) za formiranje amidne veze između karboksilne grupe alginata i amino grupe nekog molekula. [78-81] (Slika 9) Banks i saradnici su ovom metodom sintetisali 4-(2-aminoetil)-benzoeva kiselina-modifikovani alginat, koji ima sposobnost formiranja hidogela pogodnog za kontrolisanu isporuku lekova. [80] Na ovaj način su sintetisani fenolni i kateholni derivati alginata, vezivanjem tiramina i dopamina, i na taj način je omogućeno formiranje hidogela enzimskom reakcijom u prisustvu peroksidaze i vodonik-peroksida. [81, 82]



Slika 9: Amidacija alginata

Ugi reakcija

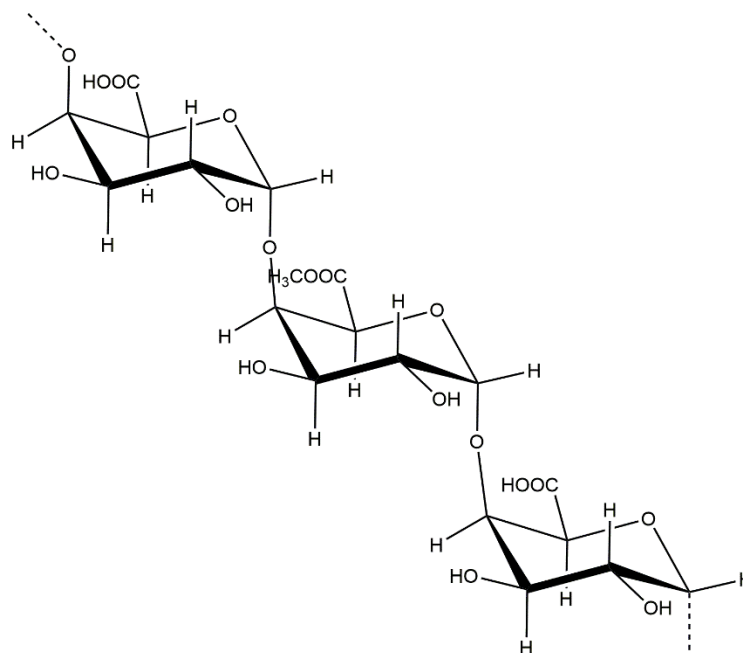
Još jedna od reakcija primenjenih za modifikaciju alginata je Ugi reakcija, u kojoj dolazi do formiranja bis-amida u prisustvu ketona/aldehida, amina, izocijanida i karboksilne kiseline. [83] Bu i saradnici su pripremili alginatni hidrogel ovo reakcijom, koristeći 1,5-diaminopentan (DAP), kao bisfunktionalni umreživač. [84] (Slika 10) Pokazalo se da struktura, transparentnost, tačka geliranja i viskoelastičnost ovog hidogela mogu da se podese promenom temperature, koncentracije samog polimera i koncentracijom dodatog umreživača.



Slika 10: Ugi reakcija

2.1.5. Pektin

Pektin spada u grupu heteropolisaharida i jedna je od najzastupljenijih komponenti ćelijskog zida biljaka. U osnovi pektina se nalazi različite asocijacije polisaharida, kao što su homogalakturonani (HG), ksilogalakturonani (XGA), ramnogalakturonani tipa I (RG-I), ramnogalakturonani tipa II (RG-II), arabinani i arabinogalaktani. Najveći deo mase pektina (60-70%) se sastoji od homogalakturonana, tj. homopolimera D-galakturonske kiseline, povezane α (1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama, od kojih su neke karboksilne grupe metil-esterifikovane, dok su poneke O-2 i O-3 pozicije O-acetilovane. [85] (Slika 11) Pektin predstavlja glavnu komponentu pulpe i kore limuna, pomorandže, limete [86], a ovim polisaharidom su bogati i suncokret, jabučna komina, krompir, paradajz, šargarepa. [87] Komercijalni pektin se najčešće dobija iz kore citrusnog voća, kao i iz jabučne komine, kao sporednih proizvoda u proizvodnji sokova. U zavisnosti od izvora u kome se nalaze, pektini se razlikuju po molekularnoj masi, stepenu acetilacije i metilacije, kao i sadržaju galakturonske kiseline i neutralnih šećera. Stepenu esterifikacije utiče na geliranje pektina i uslove obrade, pa je tako pektin sa visokim stepenom metil-esterifikacije veoma osetljiv u kiseljoj sredini i gelira pri niskim pH vrednostima. Najčešće se koristi za konzerviranje i geliranje pri visokim koncentracijama šećera. [88] Pektin sa niskim stepenom metil-esterifikacije se uglavnom koristi za pripremu džemova sa manjim koncentracijama šećera, jer za njegovo geliranje nije potrebna velika količina šećera, pokazuje manju osetljivost na kiselost i prilikom geliranja zahteva prisustvo kalcijumovih jona. [88]



Slika 11: Hemijska struktura pektina

2.1.5.1. Svojstva pektina i njegova sposobnost geliranja

Izvor pektina od koga zavisi i struktura samog pektina, metoda njegove ekstrakcije, stepen esterifikacije i drugi parametri utiču na osobine pektina, kao što su viskozitet, rastvorljivost, geliranje, itd. [89] Rastvorljivost pektina zavisi od stepena metilacija, molekulske mase, prisustva drugih jona u rastvoru, temperature, pH vrednosti. [90] Viskoizitet, rastvorljivost i geliranje su međusobno povezani, pa tako oni faktori koji dovode do povećanja jačine gela, istovremeno i dovode do veće tendencije za geliranje, smanjenje rastvoljivosti i povećane viskoznosti. [90] Razlog ove povezanosti je struktura samog pektina, tj. polikarboksilna struktura ovog polimera. Sa smanjivanjem pH vrednosti, dolazi do protonovanja karboksilne grupe i samim tim smanjenja jonizovanosti polimera i smanjenja hidratisanosti karboksilnih grupa. Sa smanjenom jonizacijom su smanjenja odbijanja u samom lancu pektina, i oni onda mogu da se udružuju i formiraju gel. pK vrednost pektina zavisi od vrste pektina i stepena njegove esterifikacije, pa tako pektin sa 65 % stepenom esterifikacije ima pH 3,55, dok onaj sa 0 % ima pH 4,10. Iz ovog može da se zaključi da pektin sa većim stepenom metilacije gelira na višem pH, zbog manjeg broja slobodnih karboksilnih grupa. [90]

U rastvoru se pektini spontano razgrađuju procesima deesterifikacije i depolimerizacije, a brzina ovog procesa zavisi od pH i temperature rastvora. Određeno je da je maksimalna stabilnost

na pH oko 4, dok sa povećanjem temperature dolazi do povećanja degradacije. Pri ekstremnijim uslovima, kao što su niska pH i povišena temperatura, dolazi do degradacije usled hidrolize glikozidnih veza. [90]

Mehizam geliranja pektina zavisi od već gore pomenutih karakteristika, a takođe je različit i za pektin sa visokom koncentracijom metoksi grupa (high-metoxo, HM) i sa niskom koncentracijom metoksi grupa (low-metoxo LM). Vodonične veze, kao i hidrofobne interakcije, imaju bitnu ulogu u geliranju pektina, pa tako vodonične veze između molekula pektina i hidrofobne interakcije metoksi grupa stabilizuju gelastu strukturu pektina. [88]

HM pektinski gelovi se dobijaju na niskim pH vrednostima i pri visokim koncentracijama saharoze, koja dovodi do smanjenja aktivnosti vode, što je potrebno da bi došlo do interakcija između samih polimernih lanaca, a da bi se smanjile interakcije lanca i vode. Takođe, snižavanjem pH dolazi i do protonovanja karboksilnih grupa i na taj način se smanjuju elektronska odbijanja u lancu. [91] Ovakav pektin gelira u prisustvu visokih koncentracija saharoze (55-75%). [5]

Do formiranja LM pektinskih gelova dolazi u prisustvu dvovalentnih kationa i jačina gela zavisi od koncentracije kationa [86]. Pri ovim uslovima do geliranja dolazi na pH vrednostima od 2 do 6 i u ovom slučaju prisustvo šećera nije neophodno. [91] Do umrežavanja dolazi preko kalcijumovih mostova između dve karboksilne grupe, dva različita lanca. [92] Ovakav model umrežavanja je nazvan „egg-box“, kao i kod umrežavanja alginata, gde se formiraju zone spajanja između GalA različitih lanaca, a i intermolekulski preko elektrostatičkog i jonskog vezivanja karboksilnih grupa, pri čemu se formiraju strukture poput kutije za jaja. [93] Kod pektina je ovaj metod geliranja delom drugačiji od alginata, pa su ga imenovali i kao „shifted egg-box“ jer je jedan od lanaca blago pomeren u odnosu na drugi. [94]

Ispitivane su interakcije poligalakturonata sa različitim kationima: Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} i Zn^{2+} , gde je utvrđeno slabo vezivanje Mg^{2+} za poligalakturonat, usled njegovog velikog afiniteta za vodu, dok su ostali joni interagovali sa poligalakturonatom i formirali gel. [95]

2.1.5.2. Primena pektina

Pektin, kao i njegovi derivati, se koriste u različitim oblastima kao što su tkivni inženjering [96], dostava lekova [97], transfer gena [98], za zarastanje rana, u papirnoj industriji, za formiranje jestivih filmova, itd. Pektin zbog svoji gelirajućih osobina pronalazi primenu i kao sredstvo za

zgušnjavanje, stabilizaciju i emulgaciju. [99] Njegove emulgujuće osobine su iskorišćene i u kozmetičke svrhe, prilikom pripreme krema i losiona.

Pektinski hidrogelovi se koriste kao oblozi za rane, da pospeše zarastanje rana, obezbede pogodnu sredinu za zarastanje i spreče bakterijske infekcije. Hidrogelovi pektina obezbeđuju hidrofilnost i kiselu sredinu u okruženju rane, lagano uklanjanje eksudata, kao i sposobnost inkorporacije i otpuštanja lekova (npr. antibiotika, analgetika), faktora rasta, koji će pospešiti zarastanje rane.

Kao i ostali prirodni polimeri, pektin pronalazi primenu u dostavi lekova. Pored osnovnih osobina karakterističnih za prirodne polimere, pektin pokazuje i muko-adhezivnost [100], lakoću rastvaranja u baznoj sredini i sposobnost geliranja u kiseljoj sredini, što je značajno pri dostavi lekova. [101]

Kao i alginat, pektin je pokazao veliki potencijal za tkivni inženjering. Promovišući nukleaciju mineralne faze u fiziološkom rastvoru, injektovane mikrosfere pektina su se uspešno koristile za tkivni inženjering kostiju. [102] U ove svrhe je korišćen nativan i modifikovan pektin, u obliku gela, mikrosfera i premaza, gajeći dvodimenzionalne i trodimenzionalne kulture ćelija kostiju. [96]

2.1.5.3. Modifikacije pektina

Modifikacije pektina su rađene sa ciljem sinteze derivata sa poboljšanim ili novim karakteristikama, koje su poželjne za neke ciljane primene. Takođe pektin ima neka neželjena svojstva za neke specifične svrhe, pa tako npr. pektin sa visokom koncentracijom metoksi grupa gelira u prisustvu visokih koncentracije saharoze i takav gel ne bi bio pogodan za pacijente sa dijabetesom. Zbog toga bi rešenje bilo modifikovati takav pektin u cilju geliranja bez dodataka šećera. Takođe, njegova brza hidratacija, oticanje i erozija usled velike rastvorljivosti, smanjuje sposobnost kontrolisanog otpuštanja leka u različitim koncentracijama. [103] Ovakva neželjena svojstva bi mogla da se uklone fizičkom, hemijskom ili enzimskom modifikacijom pektina.

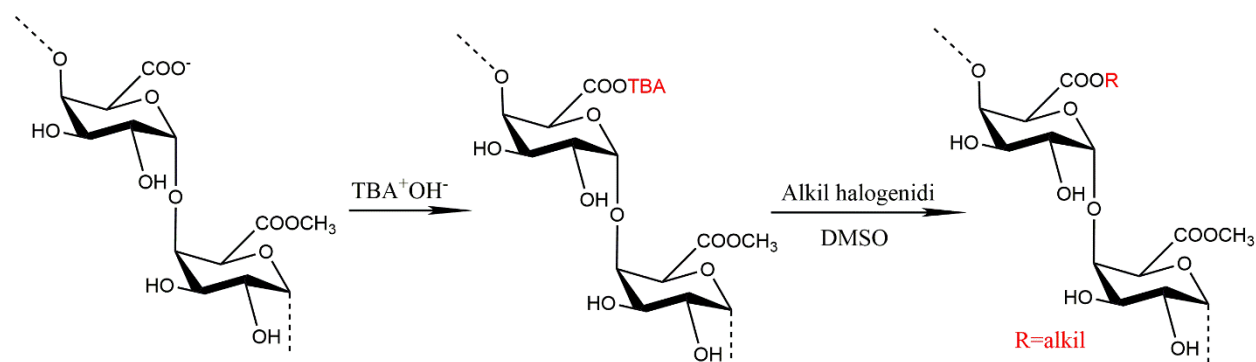
Pektin u svojoj strukturi ima hidroksilne i karboksilne grupe koje su pogodne za dalje modifikacije što može da utiče na njegovu rastvorljivost, hidrofobnost, fizičko-hemijske i biološke karakteristike, ili da doprinese stvaranju nekih novih karakteristika. Do sada su na pektinu vršene modifikacije kao što su supstitucija (amidacija, tiolacija i sulfonovanje), produžavanje lanca

(umrežavanjem ili grafting-om) i depolimerizacija (kisela i enzimaska hidroliza, β -eliminacija ili mehanička degradacija). [104]

- **Alkilovanje karboksilne grupe**

Alkilovanje karboksilne grupe je rađeno u cilju povećanja hidrofobnosti ovog polisaharida. [105] Jedna od reakcija alkilovanja koja je vršena na pektinu je metoksilovanje, koje je najčešće vršeno reakcijom sa metanolom u višku u prisustvu sumporne ili hlorovodonične kiseline kao katalizatora. [106] Mana ove sinteze je dužina reakcija, koja može da traje i nedeljama dok se ne izvrši potpuna metoksilacija pektina. Optimizovana metoda metoksilacije je reakcija sa anhidrovanim metanolom u prisustvu acetil hlorida, pri kojoj je mnogo manji stepen degradacije pektina, moguće je 100% metilacija karboksilnih grupa, a vreme odvijanja reakcije je mnogo kraće. [107]

Osim esterifikacije karboksilne grupe metil grupom, rađena je esterifikacija i sa većim ugljovodoničnim nizovima, u cilju poboljšanja pektina. Ova reakcija se najčešće radi sa tetrabutilamonijum (TBA) solima pektina u prisustvu alkil-halogenida, kao što je prikazano na Slici 12. Vezivanjem većih ugljovodoničnih nizova za karboksilnu grupu pektina se povećava hidrofobnost pektina, pa tako npr. sintetisani C_{12} -pektinski derivat pokazuje reološke osobine karakteristične za hidrofobne polimere rastvorne u vodi. [108]



Slika 12: Alkilovanje pektina

- **Alkilovanje hidrosilne grupe**

Jedan od najvažnijih primera alkilovanja hidrosilne grupe je reakcija acetilovanja. Pektini izolovani iz nekih izvora, kao što su krompir, suncokret, šećerna repa, su prirodno acetilovani, što dovodi do nekih promena u glavnim karakteristikama pektina, kao što su smanjena sposobnost vezivanja dvovalentnih katjona, pa nekad i nemogućnost geliranja. [104] Ova osobina je

objašnjena sternim smetnjama od strane acetilne grupe, prilikom vezivanja kalcijumovih jona za bliske karboksilne grupe, kao i uticajem acetilacije na konformaciju molekula. Međutim, acetilovan pektin pokazuje osobine koje ga čine povoljnim da bude emulgator i stabilizator. [109] Osim toga, acetilovan pektin ima smanjenu polarnost i rastvorljivost, usled čega je pronašao primenu i u kontrolisanoj dostavi lekova, npr. ibuprofena kroz gastrointestinalni trakt. [110]

- **Amidacija**

Amidni derivati pektina se danas koriste u prehrambenoj industriji zbog svojih gelirajućih osobina i smanjene osetljivosti na prisustvo kalcijumovih jona i pH vrednosti rastvora. Osim navedenih osobina, prednost ovih gelova je što su termoreverzibilni, te oni zagrevanjem prelaze u tečni oblik, a hlađenjem se vraćaju u prvobitnu formu gela, dok obični pektinski gelovi i nakon hlađenja ostaju u tečnom obliku. [104]

Najviše zastupljeni, a istovremeno i najjednostavniji amidni derivati pektina su oni koji imaju primarnu amino grupu (-CONH₂). Čest sintetski put je demetoksilacija metil-estarskih grupa pektina sa amonijakom u anhidrovanom metanolu, pri čemu neke metil-estarske grupe budu zamenjene amino grupama. [104]

Prilikom modifikacije pektina, treba se voditi računa na neželjene sporedne reakcije. Jedna od njih je demetoksilacija pri alkalnom pH, kao i smanjenje molekulske mase usled depolimerizacije pektina.

Osim reakcije sa amonijakom, moguća je i reakcija sa primarnim aminima, gde se formira sekundarni amid. Najčešće se reakcija vrši u prisustvu primarnih amina u metanolu, ali je moguća i reakcija u vodenim uslovima, kao i u prisustvu proteaza i amina ili aminokiselina. [104]

- **Sulfonovanje**

Uvođenjem sulfatne grupe na mesto hidroksilne grupe polimera je pokazan značajan uticaj na fizičke karakteristike polimera, pa se tako modifikovani polisaharidi koriste kao antikoagulansi, antioksidansi, kontraceptivi, a mogu da imaju i antiinflamatorno, antitumorsko i antimikrobno dejstvo. [111] Reakcija sulfonovanja pektina se najčešće vrši u prisustvu sumporne kiseline, hlorsumporne kiseline, sumportrioksida, itd., u prisustvu formamida, dimetilsulfoksida, trimetilamina ili piridina. Prvobitno se kao najbolji algens za sulfonovanje pokazala hlorsumporna kiselina, ako se uzme u obzir stepen modifikacije, prinos i stepen degradacije tokom reakcije. [104]

Kasnije se pokazalo da ovakav sintetski put ima negativne strane, kao što su velika zagađenja i nizak stepen supstitucije, pa su Fan i saradnici pronašli metodu za sulfonovanje pektina u vodenim uslovima, sa blagim sulfatnim agensom - $[N(SO_3Na)_3]$, koja se pokazala kao jednostavna i efikasna. [112]

- **Oksidacija**

Oksidacija pektina može biti izvršena na hidroksilnim grupama na pozicijama C-2 i C-3, sa natrijum-perjodatom kao oksidacionim sredstvom, pri čemu dolazi do formiranja dve aldehidne grupe. Pri ovoj vrsti oksidacije treba imati u vidu da može doći i do degradacije pektina prilikom raskidanja glikozidnih veza, što dovodi do povećane biodegradabilnosti polimera. Glavna prednost ovako oksidovanog pektina je sposobnost uvođenja novih funkcionalnih grupa na novostvorene aldehidne grupe, a samim tim i raznovrsne primene ovako dobijenih modifikata. [104] Različiti tipovi oksidacije se mogu postići upotrebom različitih oksidacionih sredstava, pa tako primenom natrijum-vanadata se vrši oksidacija terminalnih jedinica lanca [113], dok se primenom hroma (VI) na određenom pH može izvršiti oksidacija slobodnih karboksilnih grupa. [114]

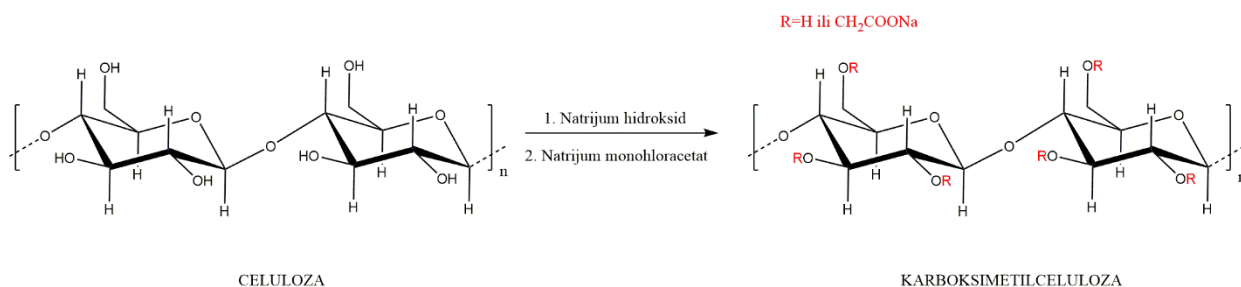
2.1.6. Celuloza

Celuloza je najrasprostranjeniji prirodni polisaharid, koji sintetišu više biljke, neke alge i bakterije. Izgrađena je od monosaharidnih jedinica D-glukoze, koje su povezane β (1→4) glikozidnim vezama, a ona izgrađuje ćelijski zid biljaka i algi. Najveća količina celuloze se dobija iz drveta i pamuka, ali se takođe može izolovati iz različitih delova biljaka. Celuloza je jeftin, biodegradabilni i obnovljivi polimer, koji je nerastvoran u vodi. Zbog posedovanja karakteristika kao što su visoka čvrstoća, biokompatibilnost, hidrofilnost, netoksičnost, biorazgradivost, obnovljivost, velika pristupačnost, celuloza predstavlja dobar polazni materijal za širok spektar novih materijala. [115]

2.1.6.1. Karboksimetilceluloza

Jedan od najbitnijih derivata celuloze je karboksimetilceluloza (CMC), koja ima uvedenu karboksimetil grupu ($-CH_2-COOH$) na mesto hidroksilne grupe glukopiranoznog lanca. (Slika 13) Sinteza CMC-a se vrši Williamson-ovom etarskom sintezom, a prvi put je sintetisana 1918. godine od strane Jansena. [116] U prvom koraku ove sinteze se celuloza tretira natrijum-hidroksidom, dok se u drugom koraku vrši reakcija sa monohlorisrećetnom kiselinom. [117] U zavisnosti od stepena

supstitucije CMC-a varira i njegova molekulska masa, pa ona može biti od 90000 do 2000000 g/mol, a od nje zavise fizička i hemijska svojstva CMC-a. [6] Razlog zašto je ovaj derivat celuloze mnogo primenljiviji od same celuloze je njegova veća hidrofilnost usled supstitucije hidroksilnih grupa, a samim tim i njegova rastvorljivost u vodi. Ovaj etar celuloze je jeftin, dostupan je na tržištu kao natrijumova so, bele boje, bez mirisa i ukusa. Zbog svoje biorazgradivosti, netoksičnosti, ali i lake i jeftine proizvodnje, CMC je pronašla primenu u mnogim oblastima. Danas se CMC koristi u papirnoj, tekstilnoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj industriji, u proizvodnji detergenata, zaštitnih premaza, u biomedicinske svrhe, itd. [6, 116]



Slika 13: Sinteza karboksimetilceluloze

2.1.6.2. Modifikacije CMC

Glavna prednost ovog derivata celuloze u odnosu na nativnu celulozu je njegova rastvorljivost u vodi, a samim tim i njegova reaktivnost i sposobnost uvođenja novih grupa koje će omogućiti novu funkcionalnost ovog polimera.

Modifikacije CMC mogu da se vrše na slobodnim hidroksilnim grupama ili na uvedenom karboksimetil supstituentu.

- **Fosforilacija CMC**

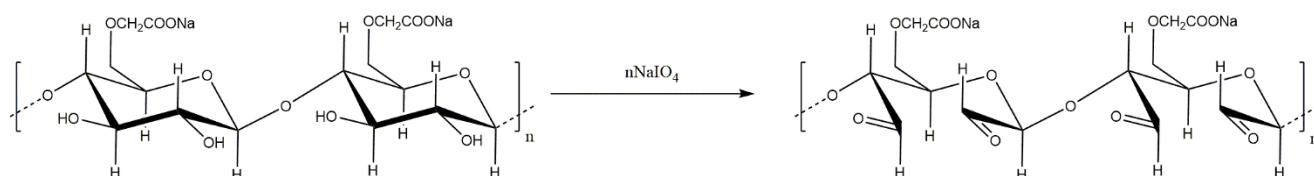
Fosforilovanje CMC se vrši prvobitnom aktivacijom karboksilnih grupa karbodiimidom, a zatim reakcijom sa 2-aminoetil-fosfornom kiselinom. Dobijeni derivati CMC-e pokazuju visoku sposobnost za ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i imaju osteogenu aktivnost. Takođe pokazuju sposobnost vezivanja za titanijske podloge, zbog koordinacije fosforilne grupe sa titanijumom. Polimerni film koji se vezuje na titanijsku podlogu se pokazao dosta idržljivim, pa tako može da izdrži nekoliko pranja u ultrazvučnom kupatilu. [118]

- **Amidacija CMC**

Prilikom amidacije CMC-a, u prvom koraku se vrši esterifikacija karboksilnih grupa sa metanolom, a u drugom koraku aminoliza dobijenog metil-estra sa različitim amidnim reagensima, kao što su n-alkilamini, hidrazin, hidroksilamin, itd. Ovakvi derivati imaju sposobnost da vezuju metalne katjone (oni koji imaju vezan hidrazid ili hidroksamsku kiselinu) ili lipide (oni koji imaju vezane N-alkilamide). Derivati sa hidroksamskim kiselinama su posebno važni, kao bioligandi koji mogu da učestvuju u transportu metalnih jona i inhibiciji metaloenzima. [119]

- **Oksidacija celuloze i CMC**

Veoma primenjivana reakcija na celulozi i karboksimetilcelulozi je oksidacija, pri čemu doazi do oksidacije hidroksilnih grupa do karbonilnih ili karboksilnih grupa. Oksidacija može biti praćena i otvaranjem piranoznog prstena, pri čemu dolazi do slabljenja glikozidnih veza i smanjenja stepena polimerizacije, što može dovesti do smanjenja molekulske mase, kao i smanjene fizičke i mehaničke otpornosti materijala. [120] Oksidaciona sredstva mogu biti raznovrsna, kao što su: NaClO_4 , KMnO_4 , NO_2 , HIO_4 i H_2O_2 . Perjodatnom oksidacijom se vrši oksidacija sekundarnih, vicinalnih hidroksilnih grupa po mehanizmu Malaprade reakcije (Slika 14), pri čemu dolazi do formiranja dve reaktivne aldehidne grupe, koje su dalje veoma pogodne za dalju derivatizaciju polimera. Prednost ove reakcije je i što je visoko specifična, pa nema sporednih reakcija koje bi bile ometajući faktor. [120]



Slika 14: Perjodatna oksidacije karboksimetilceluloze

2.1.6.3. Primena karboksimetilceluloze

Karboksimetilceluloza zbog svoje povećane rastvorljivosti u vodi u odnosu na celulozu, pronalazi primenu u mnogim oblastima. Njena netoksičnost, biokompatibilnost, visoka viskoznost pri niskim koncentracijama, antipenušavost, je čine pogodnim materijalom za različite vrste primene. Osim rastvornog oblika, CMC se koristi i u čvrstom obliku, za proizvodnju filmova, papira, itd.

Oblasti u kojima CMC pronalazi primenu su: biomedicina, farmacija, tekstilna, prehrambena, kozmetička industrija, industrija plastike, papira, ulja, itd. U biomedicinske svrhe se ovaj polimer koristi u tkivnom inženjeringu, oblasti zarastanja rana, dostave lekova, itd. [121]

U tekstilnoj industriji se CMC koristi kao zgušnjivač za boje. U procesu štampanja tekstila, CMC ima ulogu da kontroliše viskoznost rastvora boje i da poboljša hidrofilnost boje, kao i njenu sposobnost penetracije u materijal. [122]

Kao i drugi polisaharidi, CMC se koristi kao pomoćno sredstvo u prehrambenoj industriji, usled odličnih karakteristika kao što su nedostatak mirisa i ukusa, nekaloričnost, fiziološka inertnost, formiranje bistrih rastvora, itd. [121] Njegova uloga u ovoj industriji je uloga zgušnjivača, stabilizatora emulzija i aditiva, ali pored toga služi i za zadržavanje vode (ili uklanjanje vode), za bolje resuspendovanje i poboljšanje teksture. Može da se koristi i kao materijal za pakovanje, sa ciljem očuvanja svežine i bezbednosti prehrambenog proizvoda. [123]

Do sada je CMC pronašla primenu u mnogim biomedicinskim aplikacijama, kao što su tkivni inženjering, zarastanje rana, biosenzori, dostava lekova, itd. Za dostavu lekova je do sada korišćena CMC u kombinaciji sa različitim polimerima, pa je tako npr. pokazano da polivinilalkohol (PVA) u kombinaciji sa CMC može da bude dobar materijal za otpuštanje flavonoida i fenola na mesto rane, uz dodatne pozitivne efekte kao što su elastičnost, sposobnost bubrenja i antimikrobno svojstvo. [124] Veliki broj istraživanja je pokazao da CMC ima značaja u tkivnom inženjeringu. [125-127] Pa su tako Aoshima i saradnici dokazali da je CMC doveo do uspešne adhezije i proliferacije mišijih fibroblasta, u in vitro ispitivanjima. [128]

Wu i saradnici su osmislili biosensor za detekciju glukoze, sa matriksom koji se sastojao od tetraetil-ortosilikata i hidroksietil-CMC. Ovakav hidrogel je imao zarobljenu glukozo-oksidazu i pokazao se kao veoma uspešan za detekciju prisustva i količine glukoze u urinu. [129]

2.1.7. Primena hidrogelova

Hidrogelovi imaju niz prednosti u odnosu na druge biomaterijale, kao što su biokompatibilnost, kontrolisana biodegradibilnost i mehanička čvrstoća, poroznost, što ih čini pogodnim materijalima za različite primene. [18] Do danas je otkriven i optimizovan veliki broj hidrogelova, koji ispunjavaju uslove određene stabilnost, otpornosti, itd. Pored prirodnih hidrogelova, sve više se koriste i sintetički, koji imaju duži vek trajanja, povećan kapacitet vezivanja vode, visoku čvrstoću

[26], a najveća prednost je što se tačno definisane karakteristike mogu optimizovati, da bi zadovoljile željenu primenu. Pored poboljšanja već postojećih karakteristika, može se vršiti i modifikacija polimernih lanaca sa funkcionalnim grupama koje odgovaraju na različite stimulse, pa tako svojstva tih hidrogelova mogu zavisiti od temperature, svetla, magnetnog polja, hemijskih agenasa, pH vrednosti, itd. [130-132]

Danas se hidrogelovi koriste kao sistemi za dostavu lekova, u tkivnom inženjeringu, prehrambenoj industriji, za proizvodnju higijenskih proizvoda, za zarastanje rana, kao biosenzori, u agrikulturi, dijagnostici, kozmetici, biotehnologiji, itd. [7]

2.1.7.1. Primena hidrogelova za dostavu lekova

Sistemi za dostavu lekova imaju sposobnost da otpuštaju aktivne molekule na odgovarajuća mesta, uz odgovarajuću brzinu koja odgovara progresiji bolesti. Ovakvi sistemi imaju veliku prednost u lečenju u situacijama kada je lek veoma nestabilan pri fiziološkim uslovima, pa njegovo prerano oslobađanje dovodi do njegove degradacije pre nego što i dospe do aktivnog mesta delovanja (što je često slučaj sa peptidima i terapeutskim proteinima), zatim kada je visoka toksičnost leka u toj koncentraciji za druge organe, pa je u tom slučaju idealno da lek deluje na ciljanom mestu i da bude minimalna izloženost drugih organa ovom leku. (primer su hemoterapeutici kod lečenja kancera) [133] Pored ovih slučajeva, sistemi za dostavu lekova su u prednosti kod terapija koje su ciljane za tkiva i ćelije koje nisu lako dostupne cirkulacijom (genska terapija) i kod onih lekova koji treba da se uklapaju u bioritam. (insulin, estrogeni, β -blokatori, itd.) [133] Zato bi dostava lekova hidrogelovima, koji predstavljaju dobar matriks za ove svrhe jer istovremeno i štite lek od spoljašnje sredine koja bi mogla da naruši njegovu strukturu, imala brojne prednosti u odnosu na uobičajenu terapiju. Do sada su hidrogelovi korišćeni za dostavu različitih lekova, od onih male molekulske mase do makromolekula, kao što su peptidi, faktori rasta, itd. [7]

Za ovu primenu, veoma je bitna poroznost hidrogela, pa je bitno kontrolisati ovu osobinu varirajući stepen umreženja samog polimera. Drugi bitan parametar je stepen otpuštanja leka iz hidrogela, koji zavisi od difuzionog koeficijenta leka kroz mrežu hidrogela, a koji takođe može biti podešen u zavisnosti od traženih specifikacija. Podrazumeva se da hidrogelovi za ove svrhe

moraju da ispunjavaju uslove biodegradibilnosti i biokompatibilnosti, što se postiže određenom hemijskom i fizičkom strukturom hidrogelova. [18]

Dostavljanje lekova hidrogelovima može da se vrši oralno, nazalno, intestinalno, vaginalno, itd., a u zavisnosti od toga se koriste i različiti oblici hidrogelova: oralno-sferni, cilindrični, oblika diska; usađivanjem - oblika bubnja, diska ili cilindra, vaginalno-cilindrični, itd. [134]

Postoje različiti mehanizmi otpuštanja leka, pa tako npr. u slučaju korišćenja alginatnih hidrogelova, lek metotreksat ne reaguje sa samim alginatom, već kod njega brzina otpuštanja zavisi samo od brzine difundovanja iz samog gela, dok doksorubicin koji se kovalentno kači za alginat može da se otpusti samo hemijskom hidrolizom umreživača (kroslinkera) koji povezuje ova dva molekula, a mitoksantron koji je jonski kompleksiran za alginat se otpušta nakon disocijacije samog gela. [135]

Muko-adhezivnost jedna od poželjnih osobina kod isporuke lekova koji se ciljano isporučuju u nazalnu ili želudačnu sredinu, a poseduje je pektin. Takođe je bitna sposobnost rastvaranja u baznoj sredini, jer je u toj sredini omogućena i rezistentnost na amilaze i proteze, što čini pektin pogodnim za dostavu lekova u debelom crevu. [97] Pektin se pokazao kao pouzdan za targetiranje galektin molekula, koji je karakterističan za određene faze patologije kancera, pa se koristi za ciljano tretiranje tumorskih ćelija tokom hemioterapije. [136]

Poslednjih godina je veliko interesovanje za polimernim sistemima koji imaju kontrolisano otpuštanje leka, tj. hidrogelovima koji reaguju na određene stimulse. Da bi se sinhronizovalo otpuštanje leka sa fiziološkim stanjem, mora postojati određen mehanizam koji reaguje na fiziološke promene, pa bi tako idealan sistem za isporuku lekova odgovarao fiziološkim zahtevima i na promene odgovarao otpuštanjem leka. Zato se u ove svrhe sve više koriste takozvani pametni ili inteligentni hidrogelovi. („smart“ hydrogels) Hidrogelovi se smatraju pametnim sa aspekta da mogu da pokažu fizičko ili hemijsko ponašanje pod uticajem različitih stimulansa, što dovodi do kontrolisanog otpuštanja leka. [133] Du i saradnici su sintetisali kopolimerni mikrogel, koji se sastojao od karboksimetilceluloze i oksidovane CMC, kojima su bila dodata dva peptidna leka, BSA i srebro-sulfodiazin. Ovakav mikrogel je bio pH osetljiv, uz dodatno odlično antibakterijsko svojstvo. [137]

2.1.7.2. Primena hidrogelova za pakovanje

Glavna uloga hidrogelova u oblasti pakovanja hrane je kontrolisanje vlažnosti unutar samog pakovanja. Potrebno je da materijal pakovanja ima sposobnost uklanjanja tečnosti ili eksudata koji potiče ili od transpiracije povrća ili od vodene pare koja nastaje usled vremenskih uslova. Samim tim što se smanjuje koncentracija vlage, istovremeno se sprečava rast mikroorganizama. Takođe, ovim se održavaju i fizička svojstva hidroskopskih proizvoda, kao što su praškasti proizvodi, ili da se spreči omekšavanje proizvoda koji su hrskavi (čips, keks, itd.) [138]

Pri konzerviranju voća i povrća se mogu koristiti alginatni filmovi sa npr. inkorporiranim nanočesticama srebra, kako bi se poboljšalo samo konzerviranje. [139] Pored ove primene, alginatni filmovi su korišćeni i kao antibakterijski filmovi, dobijeni inkorporacijom ekstrakta belog ginsenga u alginat [140], kao i u proizvodnji antimikrobnih pakovanja dobijenih inkorporacijom bakterija mlečne kiseline u alginatni matriks, koji treba da spreče rast stvorenih patogena u samom pakovanju gotove hrane. [141]

CMC u kombinaciji sa drugim polimerima je takođe pronašla primenu u ovoj oblasti. Biodegradabilni i ekološki pogodni PVP-CMC hidrogel (polivinilpirolidon-karboksimetilceluloza hidrogel) filmovi se u veliko meri koriste za pakovanje hrane. [142] U kombinaciji sa zeolitom i metalnim katjonima (CMC/PVA/zeolit), ovi filmovi pokazuju pored biodegradabilnosti i antimikrobno dejstvo, koje je veoma bitno jer produžava rok trajanja robe. [143]

2.1.7.3. Primena hidrogelova za zarastanje rana

Tradicionalne gaze za previjanje rana su ispunjavale funkciju da zaštite ranu od spoljnih patogena, zadrže ranu suvom i omoguće isparavanje eksudata iz rane, dok noviji oblozi, kao što su oblozi na bazi hidrogela, pored zaštitne funkcije pružaju i vlažnu sredinu pogodnu za brže zarastanje rana. [144]

Kada se priča o materijalima za zarastanje rana bitno je imati na umu da ovakvi materijali moraju da uspunjava raznovrsne uslove, kao što su sposobnost smanjenja infekcije, sprečavanja krvarenja, apsorpcije eksudata rane, ubrzavanja zarastanja, da se sa njima lako rukuje, da se lako sterilišu, da su biodegradabilni, netoksični, da obezbeđuju dobru propustljivost gasova, itd. [145]

Hidrogelovi su pouzdani materijali u tretmanima zarastanja rana zbog svoje biokompatibilnosti, sposobnosti da zadržavaju i otpuštaju bioaktivne agense, takođe i zbog visokog sadržaja vode, poroznosti i fleksibilnosti. [146] Kao i za druge primene, hidrogelovi mogu da imaju određene mane koje bi mogle da otežaju njihovo uspešno korišćenje, kao što su loša mehanička stabilnost u nabubrenom stanju, mogućnost dehidracije ako nisu prekrivena, mogućnost izazivanja maceracije kože, itd. [147] Različitim sintetskim metodama i optimizacijama su pronađeni načini da se ove karakteristike poboljšaju ili zaobiđu, pa se tako u cilju poboljšanja mehaničke stabilnosti sve češće koriste kombinacije sintetičkih i prirodnih polimera. [148]

Od prirodnih polimera, do sada su u ove svrhe najviše korišćeni alginat, hijaluronska kiselina, hitozan, poli-N-acetilglukozamin, itd. [145] Ako uzmemo kao primer hijaluronsku kiselinu, za koju je utvrđeno da interaguje sa proteinima, proteoglikanima, faktorima rasta i drugim biomolekulima koji imaju bitnu ulogu u procesu zarastanja, kao i to da ima bakteriostatično dejstvo, ona predstavlja pogodan materijal za ovu primenu. [145]

Alginatni oblozi mogu biti u formi gela, koji se dobijaju geliranjem alginatnih rastvora u prisustvu dvovalentnih katjona, ili njihovom daljom obradom do poroznih listova, dobijenih „freeze-dried“ metodom, u formi pene ili vlakana. [149] Osim ovih formi, mogu da budu i u obliku nanovlakana, koja su pokazala uspešnost u zarastanju rana uz epitelizaciju, vaskularizaciju i stvaranje folikula dlake, ponašajući se kao veštačka koža iznad rane, sve do nastanka novog tkiva. Svojstva alginatnih obloga zavise od prirode umreživača koji se koriste, kao i koncentracije polimera, što može da utiče na veličinu pora u formiranoj mreži. Dodatak nanočestica u sam alginatni gel takođe dovodi do promena karakteristika gela, pa se tako dodatkom cink-oksida i nanosrebra povećava antibakterijska aktivnost gela, i podstiče proliferacija i migracija ćelija keratinocita u područje rane. Takođe, kombinovanjem alginata sa sintetičkim polimerima mogu da se poboljšaju mehaničke osobine hidrogelova za ovu svrhu. [149]

Veliki broj pektinskih zavoja je do sada patentiran i komercijalno dostupan i uglavnom se sastoje od adhezivnih, apsorbujućih polimera, agenasa za geliranje pektina i natrijum-karboksimetilceluloze. Hidrofilni pektin vezuje za sebe tečnost rane i formira gel oko nje, sa čime se kontroliše sekrecija i uklanjaju eksudati sa rane. Još jedna prednost ovog prirodnog polimera je što obezbeđuje kiselu sredinu oko rane i na taj način predstavlja bakterijsku i virusnu zaštitu. [101]

Oksidovani pektin u kombinaciji sa želatinom je korišćen kao antimikrobno sredstvo, sa aloe verom i kurkuminom i pokazao se kao materijal sa velikim potencijalom pri zarastanju rana. [150] Pektin je takođe ulazio u sastav materijala za 3D-štampanje obloge za rane. [151] Ovaj polimer u kombinaciji sa gumiarabikom, kalcijumom i fibroblast faktorom rasta je takođe pokazao potencijal u ovoj oblasti. [152]

2.1.7.4. Primena hidrogelova za tkivni inženjering

Materijali su veoma bitni za regenerativnu medicinu, koja kombinuje principe nauke o materijalima, medicine i prirodnih nauka. Njen cilj je formiranje tkiva i organa sa boljom biološkom strukturom i funkcijom.

Tkivni inženjering je grana nauke od velikog značaja, koja predstavlja jednu od glavnih tema biomedicinskog inženjeringa, nastao usled ogromne potrebe za veštačkim organima i tkivima za transplatacije. Ova grana nauke je pokazala veliki potencijal u kreiranju bioloških alternativa za gajenje tkiva, implanata i proteza. Koncept tkivnog inženjeringa uključuje postojanje određenih skela, koji služe kao podloga na kojoj će ćelije moći da rastu, da se organizuju i razvijaju u određeno tkivo ili organ. Te skele („scaffolds“) pružaju biomehaničku potporu ćelija sve dok ćelije ne proizvedu adekvatan vanćelijski matriks, a one se nakon toga razgrađuju ili metabolišu. [8] Skele imitiraju ekstracelularni matriks, obezbeđuju privremeno okruženje ćelijama, pogodno za njihovo infiltriranje, adheziju, proliferaciju i diferencijaciju. [153] [47] Ekstracelularni matriks koji se sastoji iz različitih amino kiselina, saharida ima funkciju da drži ćelije na jednom mestu i reguliše njihovu funkciju, da kontroliše formiranje i strukturu tkiva i omogućava difuziju nutrijenata, metabolita, kao i faktora rasta. [154]

Jedan od pristupa tkivnog inženjeringa koristi ćelije pacijenta i polimerne skele. Ćelije specifičnog tkiva uzete biopsijom pacijenta se gaje *in vitro*, a nakon toga se inkorporiraju na trodimenzionalne polimerne skele, koje se ponašaju kao prirodni ekstracelularni matriks tkiva. Sa polimernim skelama se ćelije dostavljaju na željeno mesto u telu pacijenta, gde omogućavaju prostor potreban za formiranje novog tkiva i potencijalno kontrolišu strukturu i funkciju formiranog tkiva. [154]

Različiti tipovi materijala su testirani za ovu primenu i željena svojstva svakako zavise od tipa tkiva, kao i vrste njegove primene. Karakteristike koje treba da ispunjavaju hidrogelovi za ovu

primenu su mehanička jačina, biodegradabilnost, elektroaktivnost, kao i određena površinska svojstva. Mehanička stabilnost je svakako bitna za one hidrogelove koji bi bili zamenski implanti za bolesno tkivo, a karakteristike same površine materijala, kao što su hemijski sastav, topologija, krutoća materijala i hrapavost, imaju bitnu ulogu u regulaciji ćelijskih funkcija. Nakon što se izvrši implantacija u telo, bitno je šta će se dešavati sa hidrogelom nakon formiranja novog tkiva, pošto on ne bi smeo da ostane u organizmu duži vremenski period, zbog čega je veoma bitna biodegradabilnost materijala. [7] Danas se koriste sintetički i prirodni polimeri u ove svrhe, kao i njihove kombinacije, a struktura kao i mehanička jačina zavise od tipa umreženja polimera. Pored navedenih karakteristika, pripremljeni hidrogelovi treba da budu što približnijih osobina ekstracelularnom matriksu, a takođe sistem njihove isporuke treba da bude što manje invazivan. [154] Biokompatibilnost je jedna od najbitnijih osobina, s'obzirom da u organizmu ne bi smelo da dođe do oštećenja drugih ćelija i izazivanja imunog odgovora. Ovaj kriterijum najčešće ispunjavaju polimeri prirodnog porekla, dok sintetički u velikom broju slučajeva izazivaju negativne reakcije organizma. [155]

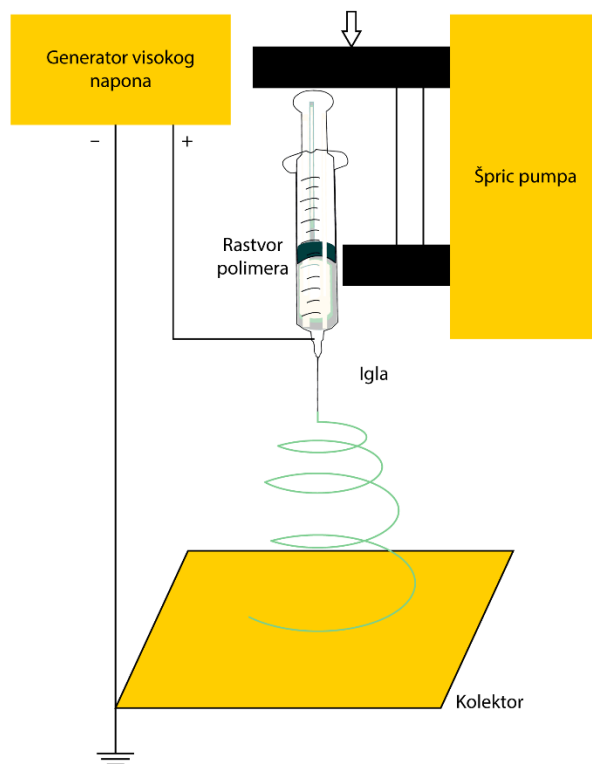
Jedni od prvih korišćenih sintetičkih polimera u ove svrhe su poliglikolna kiselina (PGA), polilaktonska kiselina (PLA), kao i njihova kombinacija, koje su prihvaćene kao sigurne od strane FDA. (Food and Drug Administration) [156] Koristeći ovakve polimerne skele, neophodno je hirurškim putem ubaciti polimer u telo pacijenta, dok je alternativni princip korišćenje onih hidrogelova koji mogu da se injektuju u telo i da se na taj način izbegne potreba za hirurškim, invazivnim intervencijama. [154] Hidrogelovi koji se sastoje od pektina i polivinilalkohola su pokazali veoma dobru biokompatibilnost sa fibroblastom, bez znakova degradacije nakon implantacije u životinjski organizam. [157]

2.1.7.5. Elektrospining

Imajući u vidu da je uloga matriksa za gajenje ćelija da imitiraju ekstracelularni matriks i obezbede strukturnu potporu ćelijama tokom razvoja u tkivo, idealna podloga za ove svrhe treba da bude što približnija prirodnom ekstracelularnom matriksu, sa aspekta hemijske i fizičke strukture. Prirodni ekstracelularni matriks čoveka je izgrađen od proteoglikana i vlaknastih proteina, strukture nano dimenzija, zbog čega su i studije pokazale da matriks za gajenje ćelija sa nanostrukturom pokazuje bolju ćelijsku potporu, bolju adheziju i proliferaciju ćelija, u odnosu na ona sa mikrostrukturom. [158]

Ove kriterijume zadovoljavaju prirodni polimeri, kao što su alginat, pektin, itd., ali sa strukturom nanovlakana, koja je slična nanoskaliranim, vlaknastim proteinima ekstracelularnog matriksa [159] Metoda dobijanja nanovlakana od polimernih materijala se naziva elektrospining i ovom metodom mogu da se proizvedu vlakna različitih dijametara i karakteristika, u zavisnosti od osobine samog rastvora polimera, kao što su viskozitet i koncentracija, ali i samih uslova elektrospininga, a to su primenjen napon i protok. Ovakvom metodom se dobijaju materijali unikatne arhitekture, koji omogućavaju formiranje tkiva u tri dimenzije.

Elektrospining je tehnika pri kojoj se primenjuje visoki električni napon na kapljicu tečnosti, što dovodi do njene deformacije i formiranja naelektrisanog mlaza tečnosti, koji se suši prilikom spuštanja do kolektora. Elektrospining sistem čine pumpa, kolektor i izvor visokog napona, kao što se može videti na Slici 15. Pumpa istiskuje rastvor iz šprica i na kraju pozitivno naelektrisane igle se formira kap rastvora koja se deformiše usled uticaja visokog napona koji se javlja između igle i kolektora. Prilikom spuštanja rastvora od igle do kolektora, dolazi do njegovog istezanja i do isparavanja tečnosti, a zatim na negativno naelektrisanom kolektoru dolazi do deponovanja suvih vlakana. [160] Nakon toga se ispituju morfološke karakteristike nanovlakana, a najbitnija tehnika za to je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).



Slika 15: Šematski prikaz elektrospining tehnike

Ova tehnika ima mnogobrojne prednosti, kao što su dobijanje tankih vlakana od po nekoliko nanometara koja mogu da pokrivaju veliku površinu, imaju dobre mehaničke karakteristike, a pritom je sam proces proizvodnje jednostavan. Iz ovih razloga se elektrospining koristi u raznim granama biomedicine, za proizvodnju materijala za filtriranje, zaštitnih materijala, materijala za senzore, optičku elektroniku, imobilizaciju enzima, biotehnologiju, a po najviše za tkivni inženjering i dostavu lekova. [9, 160, 161]

Korišćenje alginata za elektrospining je do sada dosta ispitivano, kao i primena alginatnih nanovlakana. U raznim studijama su ispitivane interakcije između matičnih ćelija, koje imaju ključnu ulogu u regenerativnoj medicinu, i materijala na bazi alginata. *In vitro* citotoksični esejem, kao i *in vitro* implantacijom mikrokapsula i skela na bazi alginata, je dokazana minimalna citotoksičnost i histokompatibilnost. [162-164]

2.1.7.6. Primena hidrogelova u imobilizaciji biokatalizatora

Hidrogelovi su do sada u velikoj meri istraženi u oblasti imobilizacije enzima, ćelija i drugih malih molekula. Oni predstavljaju hemijsku i fizičku potporu enzimima i ćelijama, štiteći njihovu strukturu od različitih uticaja. [165] Do sada su raznovrsni hidrogelovi, poreklom od prirodnih i sintetičkih polimera, ispitani za imobilizaciju velikog broja enzima i ćelija. [11, 166-169]

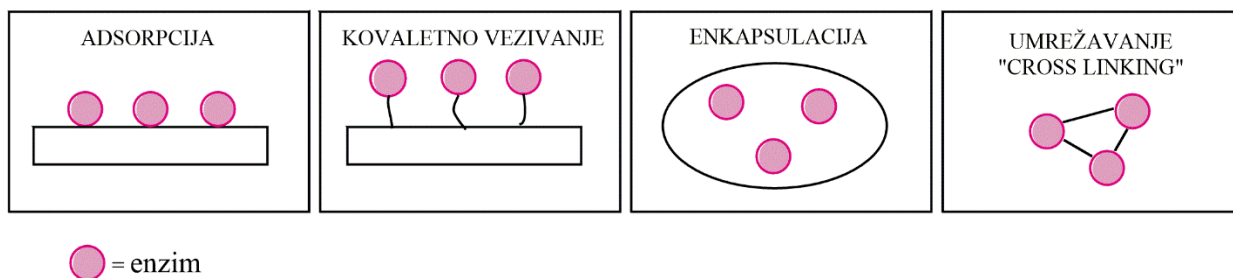
2.2. Imobilizacija biokatalizatora

Enzimi su visoko selektivni biokatalizatori, koji poseduju visoku hemijsku, stereo- i regioselektivnost pri normalnim uslovima. Biokataliza ima velike prednosti u odnosu na hemijsku katalizu, kao što su smanjen broj reakcionih koraka, netoksičnost rastvarača, neškodljivost na životnu sredinu, nepostojanje sporednih, toksičnih proizvoda, itd. [11] Danas biokatalizatori imaju ulogu u mnogim biotehnološkim primenama, kao što su biokataliza, zaštita životne sredine, biomedicina, bioenergija, u raznim industrijama, od prehrambene do farmaceutske, razvoju biosenzora, itd. Pored svih ovih prednosti, mane enzimske biokatalize su visoka cena enzima, niska stabilnost usled različitih reakcionih uslova, kao i nemogućnost njihove ponovne upotrebe usled nemogućnosti njihovog izdvajanja iz reakcione smeše. Jedna od glavnih tehnika koje se koriste za prevazilaženje ovih mana je tehnika imobilizacije enzima, kojom se dovodi do stabilizacije enzima i njegove zaštite od spoljnih uticaja tehnikom „vezivanja“ enzima za čvrstu podlogu koja je nerastvorna u reakcionoj smeši, čime se i omogućava njegovo odvajanje i ponovna upotreba. [170] Imobilizacijom se imitira prirodno funkcionisanje enzima u živim organizmima, gde je većina njih vezana za ćelijski citoskelet, membrane ili organele. Tehnikama imobilizacije su poboljšanje različite osobine enzima, kao što su temperaturna i pH stabilnost, otpornost na različite inhibitore i organske rastvarače, kao i druge karakteristike koje su veoma značajne za industrijsku primenu. [10] Mana imobilizacije enzima je što imobilizovan enzim, u poređenju sa slobodnim enzimom, ima nižu aktivnost i višu Michaelis-Mentenovu konstantu, usled poteškoća supstrata da dođe do enzima od samog matriksa za imobilizaciju. [171]

2.2.1. Tehnike imobilizacije enzima

Postoje razne tehnike imobilizacije enzima, kao što su adsorpcija i kovalentno vezivanje za nerastvoran matriks, zarobljavanje u polimernim gelovima, enkapsulacija i umrežavanje (“cross-

linking”). [172, 173] (Slika 16) Ovim tehnikama se stvaraju različite interakcije između enzima i imobilizujućeg matriksa, koje karakterišu imobilizat.



Slika 16: Tehnike imobilizacije enzima

Metode za imobilizaciju mogu da se podele na fizičke i hemijske. Fizičke metode za imobilizaciju enzima podrazumevaju postojanje trodimenzionalnog matriksa ili organskog/neorganskog polimera za enkapsulaciju. Hemijske metode obuhvataju adsorpciju, kovalentno vezivanje za imobilizacioni matriks ili samoimobilizaciju koja se vrši umrežavanjem enzima, bez prisustva matriksa. Sve navedene metode imaju svoje prednosti i mane, pa se uvek prilikom odabira tipa imobilizacije treba imati u vidu priroda enzima, matriksa, kao i željena primena.

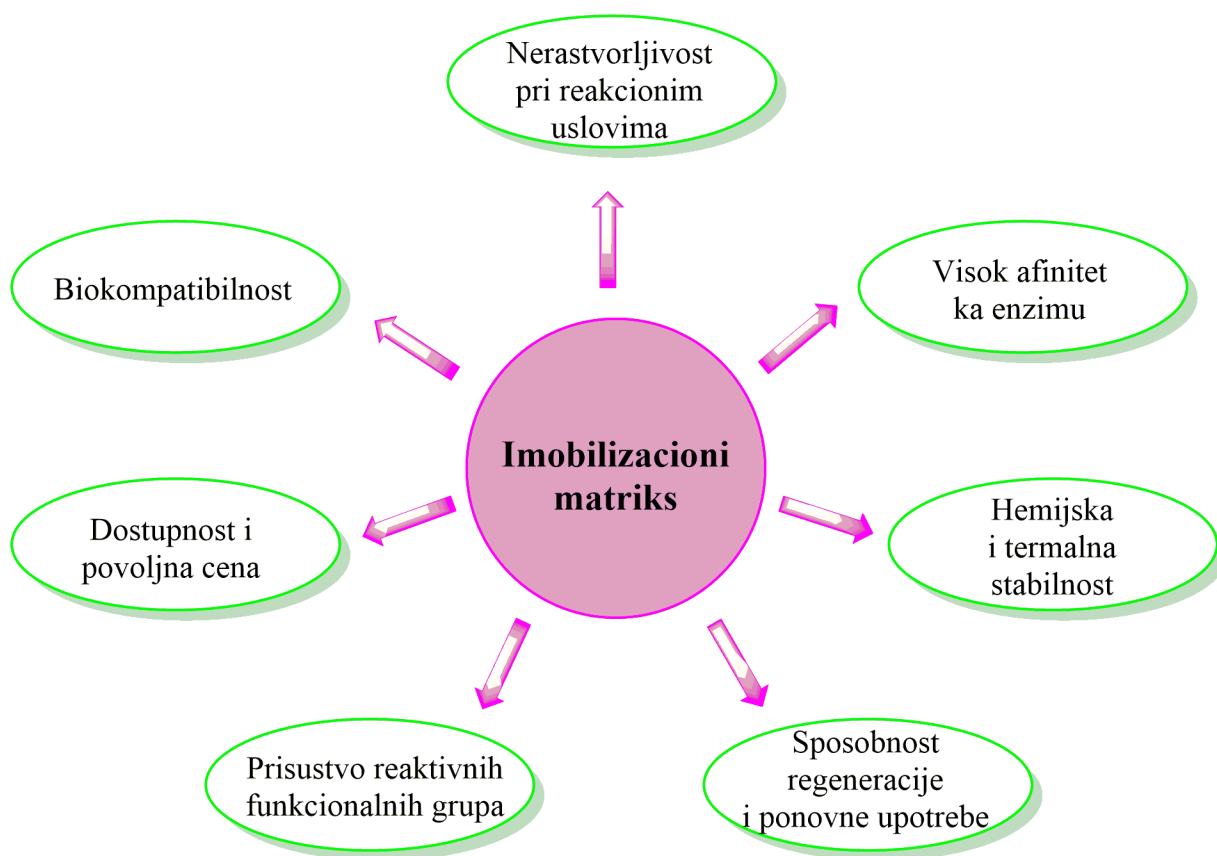
Vezivanje enzima za matriks može biti fizičke (hidrofobne i van der Waals-ove interakcije), jonske ili kovalentne prirode. Fizičko vezivanje je najslabije od ova tri tipa vezivanja, usled slabih interakcija između enzima i matriksa, dok je jonsko vezivanje jače, a kovalentno najjače. Prednost kovalentnog vezivanja je ta što se na taj način smanjuje “curenje” enzima, ali je mana što kada ako dođe do ireverzibilne deaktivacije enzima, pored enzima je i sam matriks dalje neupotrebljiv, usled njegove nemogućnosti odvajanja. Za ovaj tip imobilizacije se mogu koristiti sintetički polimeri, biopolimeri ili organski polimeri kao što je silicijum-dioksid ili zeolit. [172]

Metod zarobljavanja enzima u polimernoj mreži, gelu, može da se vrši sa polimerima, mikrokapsulama, itd. Ovom metodom takođe može da dođe do curenja enzima, usled nedovoljne fizičke barijere, zbog čega se često vrši i dodatno kovalentno vezivanje enzima za matriks. [172] Proces zarobljavanja enzima podrazumeva da u prisustvu enzima dođe do sinteze polimerne mreže, do umrežavanja, i da na taj način enzim u procesu umrežavanja ostane zarobljen u novonastaloj polimernoj mreži.

Metoda koja ne zahteva prisustvo fizičkog nosača enzima, tj. imobilizacionog matriksa, je metoda “cross linking-a” ili umrežavanja. U ovoj metodi dolazi do umrežavanja agregata ili kristala enzima koristeći bifunkcionalni reagens, pri čemu dolazi do formiranja makročestica. [172]

2.2.2. Matriksi za imobilizaciju

Matriksi za imobilizaciju su veoma raznovrsni i od njihove prirode takođe zavise karakteristike imobilizata. [174] Mogu da budu neorganskog porekla (minerali, oksidi metala, ugljenični materijali) i organskog porekla (sintetički polimeri i biopolimeri). [11] Imobilizacioni matriksi treba da poseduju određene sposobnosti, kao što su: nerastvorljivost pri reakcionim uslovima, visok afinitet ka enzimu, dostupnost i povoljna cena, biokompatibilnost, hemijska i termalna stabilnost, prisustvo reaktivnih funkcionalnih grupa, sposobnost regeneracije i ponovne upotrebe, itd. (Slika 17) [11]



Slika 17: Karakteristike koje treba da poseduje matriks za imobilizaciju

Danas se u ove svrhe sve više koriste prirodni polimeri, kao što su alginat, hitozan, celuloza, agaroza, guar guma, agar, gelatin, dekstran, pektini, itd. [10] Prednosti prirodnih polimera su njihova netoksičnost, biokompatibilnost, biodegradabilnost, obnovljivost, kao i dostupnost brojnih reaktivnih mesta i funkcionalnih grupa. Bitno je da matriks za imobilizaciju nema negativan uticaj na sam enzim. Nosač treba da zaštiti enzim, ali i da istovremeno aktivno mesto enzima bude nepromenjeno i dostupno za vezivanje supstrata, kao i da difuzija supstrata do enzima bude moguća. [11]

2.3. Lakaze

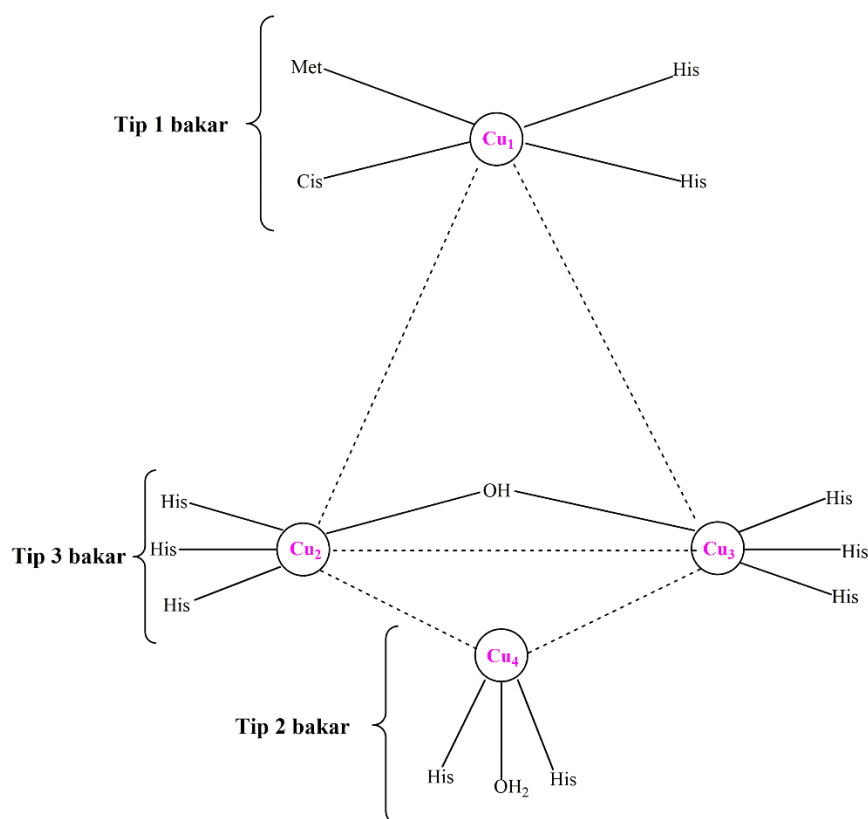
Lakaze (EC 1.10.3.2, benzendiol:kiseonik oksidoreduktaze, p-difenol:dikiseonik oksidoreduktaze) su ekstracelularni, monomerni glikoproteini koji pripadaju klasi oksidativnih enzima sa više atoma bakra. [175] Poreklo vode iz različitih gljiva, bakterija, viših biljaka, itd. Njihova biološka funkcija je povezana sa njihovim poreklom, kao i stadijumom života u kojem ih organizam proizvodi. Lakaza iz gljiva ima ulogu u odbrani od stresa, morfogenezi, degradaciji lignina; bakterijska lakaza učestvuje u procesu pigmentacije, oksidaciji toksina, kao i zaštiti od oksidacionih agenasa i UV svetlosti, dok lakaza iz biljaka učestvuje u tkivnom odgovoru i polimerizaciji lignina. [176]

Lakaze katalizuju oksidaciju velikog broja različitih suptrata, vršeći četvoroelektronsku redukciju molekula kiseonika do vode. Neki od supstrata su aromatična jedinjenja kao što su orto- i para-difenoli, metoksisupstituisani fenoli, diamini i benzentoli, zatim metalni joni (Mn^{2+}), organometali, itd. [176]

2.3.1. Strukturne karakteristike

Molekuli lakaze su dimerni ili tetramerni glikoproteini, koji najčešće sadrže 4 atoma bakra po monomeru, koja su vezana za 3 redoks mesta (tip 1, tip 2 i tip 3). Četiri atoma bakra su klasifikovana u tri grupe, na osnovu apsorpcije i spektra elektronske paramagnetne rezonance. Bakar tipa 1 (T1), takozvani "plavi bakar", sa paramagnetnim osobinama, ima maksimum apsorpcije na 600-610 nm, koji potiče od kovalentne bakar-cistein veze. T1 bakar je trigonalno koordinisan sa dva histidine i jednim cisteinom. (Slika 18) Ovaj tip bakra daje plavu boju proteinima koji imaju više bakra u svojoj strukturi. [13] Bakar tipa 2 (T2) je nebojeni bakar, takođe sa paramagnetnim osobinama, koji ne apsorbuje u vidljivom delu spektra i on je koordinovan za dva histidina. Treći tip bakra (T3) je dijamagnetni, kuplovani, binuklearni bakar, sa maksimumom apsorpcije na 330 nm. Bakar tipa 3 je koordinovan za 6 histidina. [13] Bakar T2

i T3 se nalaze blizu i formiraju trinuklearni centar, koji je deo katalitičkog mehanizma enzima. [177]

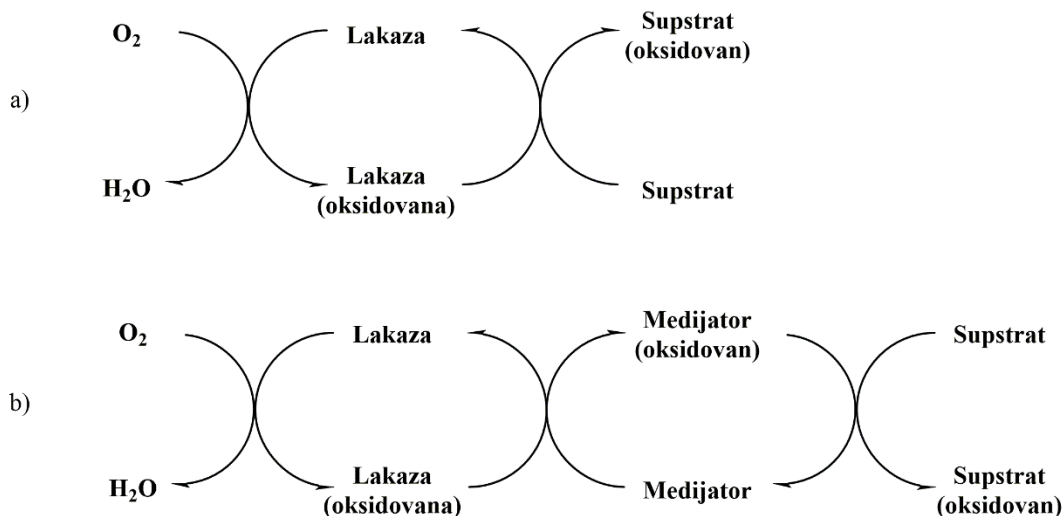


Slika 18: Aktivno mesto enzima lakaze

Prosečna molekulska masa lakaze iznosi od 50 do 100 kDa, sa izoelektričnom tačkom oko pH 4. [177] Stepen glikozilacije lakaze varira u zavisnosti od porekla lakaze, pa tako kod lakaza iz gljiva iznosi 10-25 %, dok kod lakaza poreklom iz biljaka iznosi 20-45 %. Najčešće vezani šećeri su manozna, N-acetilglukozamin i galaktoza, a stepen glikozilacije često dovodi do povećanje stabilnosti enzima. [13]

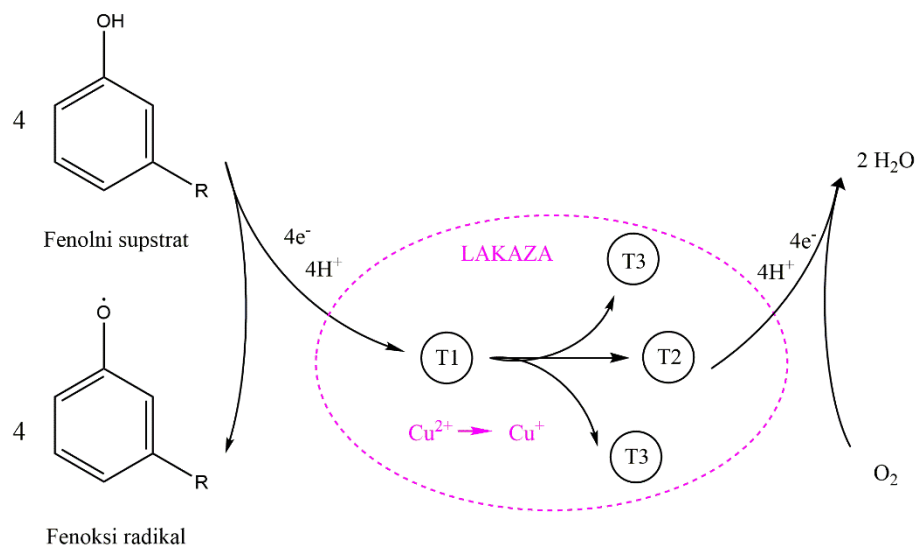
2.3.2. Katalitički mehanizam lakaze

Tokom katalitičkog mehanizma lakaze dolazi do redukcije molekula kiseonika do vode. Funkcija lakaze zavisi od atoma bakra koji imaju esencijalnu ulogu i nalaze se na tri različita mesta vezivanja. Postoje tri glavna koraka mehanizma dejstva lakaze. Prvi korak je redukcija bakra na T1 mestu od strane supstrata i njegova oksidacija, a nakon toga dolazi do prebacivanja elektrona na trinuklearni klaster T2/T3 i tu dolazi do redukcije kiseonika do vode.



Slika 19: Katalitički ciklus lakaze a) bez dejstva medijatora, b) sa dejstvom medijatora

Katalitička aktivnost lakaze se može vršiti a) bez dejstva medijatora i b) sa dejstvom medijatora. (Slika 19a i 19b) Jednostavniji mehanizam, koji ne zahteva prisustvo medijatora, je onaj gde se supstrat oksiduje u direktnoj reakciji sa klasterom bakra i tada nastaju odgovarajući radikali. Lakaze koriste kiseonik kao elektron akceptor da bi dovele do uklanjanja protona sa hidroksilne grupe fenola. (Slika 20) Novostvoreni radikali fenola mogu spontano da se reorganizuju, što može da dovede do stvaranja C-C ili C-O veza alkilnog dela lanca ili do otvaranja aromatičnog prstena. [177] Mehanizam koji iziskuje prisustvo medijatora se vrši u slučaju kada supstrat ne može direktno da se oksiduje lakazom. Razlozi za nemogućnost oksidacije mogu biti veličina supstrata, usled čega supstrat ne može da priđe aktivnom mestu enzima, ili visok redoks potencijal tog supstrata. Dodatkom hemijskog medijatora, koji se ponaša kao intermedijer supstrata lakaze, njegovi oksidovani radikali su u mogućnosti da interaguju sa supstratom koji usled svoje veličine ili redoks potencijala nije mogao direktno da reaguje sa enzimom. [177] (Slika 19b)



Slika 20: Katalitički mehanizam lakaze

2.3.3. Proizvodnja lakaze

S'obzirom da je lakaza biotehnološki važan enzim koji se koristi u bioremedijaciji, tekstilnim procesima, degradaciji boja, biotransformaciji, itd., postoji potreba za proizvodnjom velike količine ovog enzima. [13] Lakaze su estracelularni enzimi i sekundarni su metaboliti mnogih gljiva, međutim količina dobijene lakaze ovim putem je nedovoljna za komercijalnu upotrebu. Rešenje je pronađeno u kloniranju gena za lakazu i njoj heterolognoj ekspresiji, čime se povećava prinos i smanjuje cena proizvodnje lakaze. [177]

Proizvodnja ovog enzima se može vršiti fermentacijom u tečnom ili čvrstom medijumu. [13] Proizvodnja mikroorganizama u tečnom medijumu potrazumeva gajenje u tečnim medijumima, bogatim potrebnim nutrijentima, pri aerobnim uslovima. Ovaj tip proizvodnje može da se vrši u jeftinim medijumima, "otpadu", koji sadrži ugljene hidrate, azot, minerale, vitamine i inducere ekspresije enzima. Mana ove metode je što je prisutan nekontrolisan rast micelija koji utiče na prinos proizvodnje željenog enzima. [13]

Proizvodnja na čvrstom medijumu se vrši bez prisustva tečnosti, a kao podloga se koriste prirodni ili sintetički materijali. Najjeftiniji za ove svrhe su poljoprivredni otpadi, kao što su pirinčana slama, pirinčane mekinje, pšenična slama i pšenične mekinje. Ovaj način proizvodnje enzima je pogodan jer stimuliše prirodne uslove gajenja gljiva. Glavne prednosti ovog tipa proizvodnje su niža cena supstrata, manji rizik od bakterijske kontaminacije, manja obrada dobijenog enzima, itd. [13]

Do sada su lakaze poreklom iz gljiva heterologno eksprimirane u sledećim organizmima: *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus oryzae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolitica*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ficuum*, itd. [177] Bakterijske lakaze su najčešće eksprimirane u *Escherichia coli*, dok lakaze iz gljiva još uvek nisu eksprimirane u ovom organizmu. Ekspresija lakaze u *P. pastoris* ekspresionim sistemima daje mnogo veće prinose u odnosu na *S. cerevisiae*, zbog čega se ovaj organizam više koristi, pogotovo za industrijske svrhe. [177] Dodatak bakra u ekspresioni medijum je takođe pokazao pozitivan uticaj na proizvodnju lakaze u *P. pastoris* i *Aspergillus* vrstama. [177]

2.3.4. Imobilizacija lakaze

Znajući koliki potencijal lakaza ima u biotehnologiji i ekologiji, usled svoje visoke aktivnosti, specifičnosti i selektivnosti, mnoge studije su vršene sa ciljem poboljšanja primene ovog enzima i njegove dodatne stabilizacije. [178] Dokazano je da imobilizacijom lakaze može da se poboljša njena termostabilnost, kao i otpornost na ekstremnije uslove i hemijske agense. [178-181] Pored navedenih prednosti, imobilizovana lakaza ima prednost u odnosu na rastvornu jer može lako da se odvoji iz reakcione smeše i da se ponovo iskoristi, što je naročito bitno u industrijskim procesima i u kontinualnim bioreaktorima.

2.3.5. Primena lakaza

Lakaze su zbog širokog spektra supstrata pronašle primenu u mnogim biotehnološkim i industrijskim oblastima, kao što su tekstilna i prehrambena industrija, papirna industrija, farmaceutska industrija, hemijska industrija, industrija drveta, itd. Biokatalitičke osobine lakaze su iskorišćene u hemijskoj industriji, pa su tako mnogi konvencionalni hemijski procesi zamenjeni biokatalitičkim. Zbog svojih sposobnosti da oksiduju razne toksične i druge supstrate koji su opasni po životnu sredinu, lakaze se sve više primenjuju u procesima bioremedijacije i biodegradacije.

2.3.5.1. Prehrambena industrija

Lakaze se u prehrambenoj industriji koriste najviše za uklanjanje neželjenih fenola iz hrane, koji su odgovorni za tamnjenje hrane i mutnoću soka, piva i vina. [182] Fenolne komponente imaju veliki uticaj na boju, miris i ukus vina, tako da je tretiranje vina lakazama veoma efikasna i

zastupljena metoda. Osim vina, mnogi voćni sokovi sadrže fenole, čija oksidacija vremenom dovodi do promene boje i ukusa soka, pa se lakaza i kod sokova koristi kao stabilizator. [183]

Razne komponente hrane, kao što su ugljeni hidrati, fenoli, nezasićene masne kiseline, proteini sa tiolnim grupama, su supstrati lakaze i njihova modifikacija može dovesti do poboljšanja nekih karakteristika hrane. [177] Lakaze se koriste za uklanjanje kiseonika prilikom pakovanja proizvoda, da bi se sprečila njihova neželjena oksidacija [184], kao i uklanjanje kiseonika kod biljnih ulja, sa ciljem njihovog poboljšanja kvaliteta. [177] Lakaza se koristi i kao umreživač, pa tako dovodi do geliranja pektina preko mehanizma oksidativnog kuplovanja. [185]

2.3.5.2. Papirna industrija

U papirnoj industriji, industrijska priprema papira zahteva odvajanje i degradaciju lignina drvene pulpe, što se dugo vršilo hemijskom metodom, koristeći hemijske oksidanse na bazi hlora ili kiseonika. Ovom metodom se nakon degradacije lignina dobijaju hlorovani alifatični i aromatični proizvodi, koji mogu biti toksični i mutageni, [13] zbog čega su istraživanja tekla u smeru pronalaska blaže i čistije metode. Još 1994. godine je patentiran enzimski metod izbeljivanja drvene pulpe enzimom lakazom, pri čemu se dobija svetlija pulpa, sa manjom koncentracijom lignina. [186] Utvrđeno je da lakaza može da dovede i do delignifikacije pulpe, ali u prisustvu medijatora. [187] Pored lakaze, u ove svrhe se koriste i peroksidaze, ali lakaze imaju prednost jer nemaju potrebu za prisustvom vodonik-peroksida, već kiseonika, a takođe i njihova aktivnost nije inhibirana kosupstratima. [12] Prednost korišćenja lakaze u ove svrhe je višestruka: očuvanje električne energije, poboljšanje čvrstoće, kao i ekološki pristup, sa smanjenjem količinom toksičnih otpada. [13]

2.3.5.3. Organske sinteze

Biokatalizatori su sve zastupljeniji u organskim sintezama, kao ekološki podobni katalizatori. Lakaza je pogodna za ove svrhe jer je bezbedna za životnu sredinu i katalizuje reakcije pri normalnim uslovima, na vazduhu, bez potrebe za vodonik-peroksidom. [188] Lakaza može katalizovati razne reakcije, kao što su radikalska polimerizacija akrilamida [189], polimerizacija amino- i fenolnih supstrata [190], itd.

2.3.5.4. Bioremedijacija i biodegradacija

Jedan od glavnih ekoloških problema današnjice je kontaminacija zemljišta, vazduha i vode toksičnim hemikalijama, počevši od hemijske, tekstilne, farmaceutske industrije, preterane upotrebe pesticida, itd.

Bioremedijacija je proces kojim se uklanjaju štetne komponente iz životne sredine. Mikroorganizmi uklanjaju zagađujuću organske komponente, metabolizirajući ih do ugljenika. [13] Utvrđeno je mnogim studijama da lakaza može da se koristi za degradaciju raznovrsnih supstanci koje predstavljaju zagađivače životne sredine. Lakaza u prisustvu medijatora može da se koristi za degradaciju plastike olefinske strukture, gde inicira radikalsku, lančanu reakciju koja rezultuje u razradnji plastike, kao i za degradaciju poliuretana. [177] Degradacija ugljovodoničnog niza polietilena je dokazana lakazom, pa tako lakaza inkubirana sa ovim polimerom dovodi do smanjenja molekulske mase polietilena. [191] Ovi enzimi se mogu koristiti i za eliminisanje neprijatnih mirisa sa deponija, farmi stoke ili mlinova za celulozu. [177]

Lakaza bez i u prisustvu medijatora može da oksiduje ksenobiotike, tako da dolazi do otpuštanja proizvoda koji su manje toksični i imaju bolju biorasploživost, i koji se lakše mogu ukloniti fizičkim ili mehaničkim postupcima. [12]

Jedni od glavnih zagađivača životne sredine su policiklični aromatični ugljovodonići (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs). Ovi molekuli su toksični, kancerogeni i mutageni, a zbog svoje kompleksne strukture se teško degraduju i samim tim dug vremenski period ostaju u prirodi. Njihova degradacija je dokazana u prisustvu lakaze iz *Pycnoporus sanguineus*. [192] Fenoli se nalaze u otpadu različitih industrijskih procesa: konverzija uglja, prerada nafte, hemijske industrije organskih proizvoda, proizvodnje maslinovog ulja, itd. [177] Do sada je lakaza korišćena za uklanjanje velikog broja fenolnih jedinjenja, naročito u imobilizovanom obliku. [193-198] Lakaza je takođe korišćena da smanji koncentraciju sintetičkih, heterocikličnih komponenti u zemljištu, kao što su halogeni pesticidi. [177]

2.3.5.5. Tekstilna industrija

U tekstilnoj industriji se lakaza koristi za izbeljivanje pamuka i u ovakvom procesu izbeljivanja se postiže ušteda hemikalija, energije i vode. Ovakav način izbeljivanja ima velike prednosti u odnosu na konvencionalne metode izblejivanja hlorovanim i kiseoničnim reagensima. [199]

Takođe se u ovoj industriji lakaza koristi za izbeljivanje teksasa bojenog indigom, da bi se dobile svetlije nijanse. [200]

2.3.5.6. Degradacija boja

Danas postoji više od 100 000 komercijalno dostupnih boja, koje se koriste u tekstilnoj, prehrambenoj, papirnoj i kozmetičkoj industriji, iako se dve trećine tržišta boja iskoristi u tekstilnoj industriji. [201] Za bojenje tekstila se koriste boje različitih hemijskih struktura, počevši od neorganskih molekula, do polimera i drugih organskih boja. Većina tih boja je otporna na dejstvo svetlosti, vodu, kao i različite hemikalije, ne bi li njihova postojanost na tekstu bila što dugotrajnija, ali to sa druge strane predstavlja problem prilikom tretiranja otpadnih voda tekstilne industrije. Prilikom procesa bojenja, do 50% upotrebljene boje se ne veže za materijal, već zaostaje u tečnosti. [202] Uklanjanje boja iz industrijskih otpadnih voda je jedan od glavnih ekoloških problema, pa samim tim postoje mnogobrojna istraživanja na ovu temu.

Lakaza je pronašla primenu u dekolorizaciji tekstilnih boja zbog svog potencijala da degraduje veliki spektar boja, različitih struktura. Do sada je lakaza iz različitih izvora ispitana za degradaciju velikog broja boja, bilo kao slobodna ili imobilizovana na različitim materijalima, i pokazala se kao veoma uspešan biokatalizator. [16, 203-206]

2.4. Tekstilne boje kao zagađivači životne sredine

Boje po hemijskoj strukturi predstavljaju organske, nezasićene molekule koji mogu biti rastvorni u vodi ili uljima. Karakteriše ih prisustvo hromofora, sposobnih da apsorbuju vidljivu svetlost (380-750 nm). Ranije su boje bile prirodnog porekla i one su se izolovale iz različitih biljaka, insekata, minerala, školjki, itd. [207] Prirodne boje su sigurnije za životnu sredinu od sintetičkih, a jedna od glavnih prednosti je što njihove otpadne vode mogu da se tretiraju biorazgradnjom. Mana prirodnih boja je što je njihovo nanošenje na vlakna mnogo manje efikasno, pa se one nanose u prisustvu metalnih soli, koje imaju afinitet i za boje i za vlakna. [208] Danas postoji veliki broj sintetičkih boja koje mogu biti veoma raznovrsnih struktura, pa tako postoje azo, nitro boje, ftalocijaninske i diarlimetanske boje, itd. [209]

2.4.1. Klasifikacija boja

Tekstilne boje se mogu klasifikovati na osnovu njihove hemijske strukture ili njihove industrijske primene. Na osnovu hemijske strukture, boje su podeljene u različite podgrupe, u

zavisnosti od toga koju hromoforu poseduju, pa tako postoje azo, nitro, indigo, antrahinonske, ftaleinske, trifenil-metanske, nitrozo boje, itd. [210] (Slika 21)

Klasa boja	Hromofora	Predstavnik
1. Azo boje		 Kiselo crvena 337
2. Nitro boje		 Disperzno žuta 14
3. Indigoidne boje		 Vat plava 35
4. Antrahinonske boje		 Reaktivno plava 4
5. Ftaleinske boje		 Fenolftalein
6. Trifenil-metanske boje		 Bazno ljubičasta 2
7. Nitrozo boje		 Fluorescentno obeležena nitrozo boja (DNSBA-NO)

Slika 21: Klasifikacija tekstilnih boja na osnovu hemijske strukture, sa prikazanim hromoforama i primerima svake grupe

Na osnovu industrijske primene, boje se mogu podeliti na sledeće podgrupe: disperzione, direktne, reaktivne, vat boje, bazne, kisele, sumporne boje, itd. [209] Većina disperzionih boja pripada azo bojama, iako su ljubičaste i plave boje uglavnom dobijene od antrahinonskih derivata. One su uglavnom slabo rastvorne u vodi, a najviše se koriste za farbanje poliestra, kao i najlona, celuloza-acetata i nekih akrilnih vlakana. [209] Kisele boje se koriste za farbanje najlona, vune ili svile u opsegu pH od 3 do 7, i mogu biti raznovrsnih struktura. Njihova glavna karakteristika je prisustvo sulfonovanih grupa, koje im obezbeđuju rastvorljivost u vodi. Pogodne su za bojenje vune zbog interakcija sulfonovanih grupa sa amonijum grupama vunenog materijala. [210]

Bazne boje se najčešće koriste za bojenje akrilnih, papirnih i najlonskih supstrata, ali i nekih modifikovanih poliestarskih supstrata. [210] Ove boje su rastvorne u vodi i karakteriše ih prisustvo katjona, koji se elektrostatički privlače sa negativnim grupama supstrata. Pozitivno naelektrisanje može da potiče od amonijum grupe, ili da bude delokalizovano, kao što se može videti kod mnogih triarilmetanskih i ksantanskih boja. [211] Prva otkrivena direktna boja je Congo red, 1884. godine, kao boja koja ima veliki afinitet za vezivanje za celulozna vlakna. [212] U direktne boje spadaju veoma različiti hemijski tipovi boja i njihova zajednička osobina je da su lake za primenu, imaju širok spektar boja, ali im je mana što se lako ispiraju, pa su često zamenjene reaktivnim bojama. Reaktivne boje su postale veoma popularne zbog svoje postojanosti usled prisustva reaktivnih grupa koje se vezuju za materijal, kao i sjaja i velikog opsega nijansi. [213] Za boje iz vat grupe je karakteristično da su veoma postojane i da se veoma slabo ispiraju tokom pranja. Rastvaraju se u vrućoj vodi, a jedan od predstavnika ove klase je indigo. [209]

2.4.2. Metode za uklanjanje tekstilnih boja iz životne sredine

Tekstilne boje predstavljaju jedan od glavnih zagađivača životne sredine, ako uzmemo u obzir njihovu svakodnevnu upotrebu i neefikasnost samog procesa bojenja. Metodologija za uklanjanje boja iz životne sredine je veoma kompleksna usled postojanja velike raznovrsnosti boja. Problem postoji i u procesima raspadanja boja, pa tako u anaerobnoj sredini dolazi do raskidanja azo veza u azo bojama i oslobađanja aromatičnih amina u vodenu sredinu. Prisustvo ovakvih jedinjenja je ozbiljan ekološki problem, zbog njihove toksičnosti za vodene organizme i mutagenosti za ljude. [214] Da bi se rešio ovaj problem, na globalnom nivou se donose zakonske regulative i vrše se sve strože kontrole tretiranja industrijskih, otpadnih voda. Otpadne vode iz tekstilne industrije su često

veoma kompleksnog sastava i zahtevaju intenzivne tretmane, pa se za njihovo uklanjanje često kombinuje više tehnika.

Tehnike prečišćavanja otpadnih voda iz tekstilne industrije se već godinama optimizuju, sa ciljem potpune degradacije boja do njihovih krajnjih proizvoda oksidacije: CO_2 , H_2O , NO_3^- , SO_4^{2-} i Cl^- . Danas postoji veliki broj metoda, pa tako imamo fizičke metode: adsorpcija, sedimentacija, flotacija, flokulacija, koagulacija, ultrafiltracija, fotojonizacija i spaljivanje, ali takođe imamo i hemijske metode: neutralizacija, redukcija, oksidacija, elektroliza, jonska izmena, itd. [214] I pored ovolikog broja različitih metoda, potpuno uklanjanje boja je i dalje izazovan proces. Biološki tretmani su danas sve više zastupljeni, a neki od bioloških tretmana obuhvataju korišćenje filtera, aktivnog mulja, anaerobnog varenja, raznih mikrobnih sojeva, itd. Na primer gljive bele truleži imaju sposobnost razgradnje sintetičkih boja, pored sposobnosti degradacije lignina, usled prisustva lignolitičkih enzima – lignin peroksidaze, mangan-zavisnih peroksidaza i lakaza. Prvobitno su u tretmanu degradacije otpadnih voda korišćene gljivične kulture, međutim da bi se prevazišao problem akumulacije biomase, počeli su da se koriste izolovani enzimi. [215] Lakaza je sve više korišćena u ove svrhe, zbog svoje široke supstratne specifičnosti i lakog procesa proizvodnje/izolovanja.

Do sada je u mnogobrojnim studijama dokazana sposobnost lakaze za degradaciju različitih tipova tekstilnih boja. [15, 16, 203-205, 215-219] Prisustvo redoks medijatora, kao što je 1-hidroksibenzotriazol (HBT), može pospešiti efikasnost degradacije i supstratnu specifičnost, ali su mu mane visoka cena, ograničena biodegradabilnost i potencijalna toksičnost. [41]

2.5. Ekspresija proteina na površini ćelija kvasca

Rekombinantna tehnologija je svojim napretkom dovela do proizvodnje velikog broja rekombinantnih proteina, veoma bitnih za razne oblasti, a naročito za medicinu. Usled velike potražnje za rekombinantnim proteinima, potrebno je pronaći ekspresione sisteme koji su visoko efikasni, jednostavni za rad i imaju nisku cenu [220]. Velika prednost je kada ekspresioni sistemi imaju sposobnost sekrecije proteina koji su pravilno uvijeni, što umnogome olakšava dalje upravljanje proteinima, jer nema potrebe za prečišćavanjem, izvlačenjem proteina iz ćelije, denaturacijom i procesom ponovnog uvijanja proteina (“refolding”). [221]

Ekspresioni sistemi imaju funkciju u prevođenju genske sekvence u proteinsku sekvencu. Prilikom ovog prevođenja je potrebno da dođe do očuvanja fizičke veze između genotipa i fenotipa. Ekspresioni sistemi mogu biti raznovrsni, a njihova glavna podela je na prokariotske i eukariotske sisteme. Na osnovu mesta eksprimiranja, oni se dalje mogu podeliti na unutarćelijske ekspresione sisteme, periplazmatske i sisteme prikazivanja proteina na površini ćelija. [222]

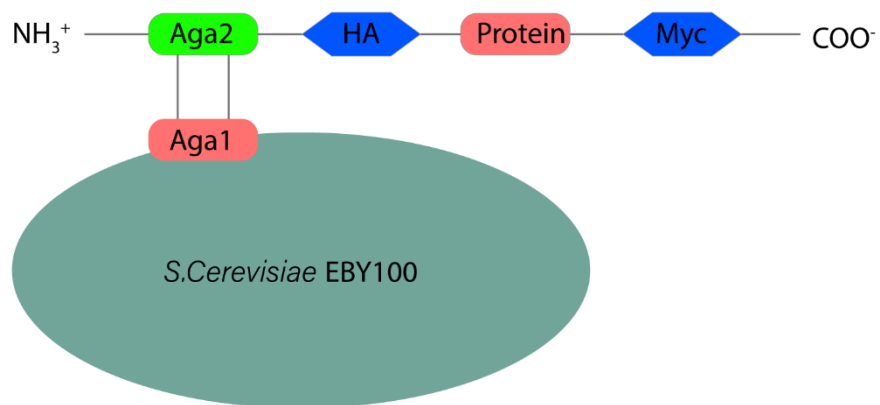
Saccharomyces cerevisiae je pored *Pichia pastoris* jedan od najviše istraženih i najviše korišćenih eukariotskih organizama za heterolognu ekspresiju proteina. U odnosu na bakterijske sisteme, i najčešće korišćen organizam *E. coli*, kvasci imaju sposobnost post-translacionih modifikacija i sekrecije, što veoma olakšava proces proizvodnje i prečišćavanja. [221] Što se tiče industrijskog procesa, ovaj kvasac je takođe pogodan, jer je otporan na nizak pH, visoke koncentracije šećera i etanola, kao i visok osmotski pritisak. [220] Efikasnost transformacije ovog organizma je relativno velika, iako je niža u odnosu na *E. coli*, mnogo je viša u odnosu na *P. pastoris*.

Kod ekspresije proteina na površini ćelija kvasca (“yeast surface display”), svaka pojedinačna ćelija se transformiše sa jednim vektorom koji kodira protein od interesa, koji je genetski spojen sa proteinom sidra na površini ćelije. Protein sidra sadrži signalnu sekvencu koja usmerava transport fuzionog proteina na površinu ćelije, gde je on nakon toga zakačen za ćeliju, ali i istovremeno dostupan vanćelijskom prostoru. [223]

Ekspresija proteina na površini kvasca je prvi put urađena 1997. godine [224] i od tada je jedna od vodećih metoda u inženjeringu proteina zbog sledećih prednosti:

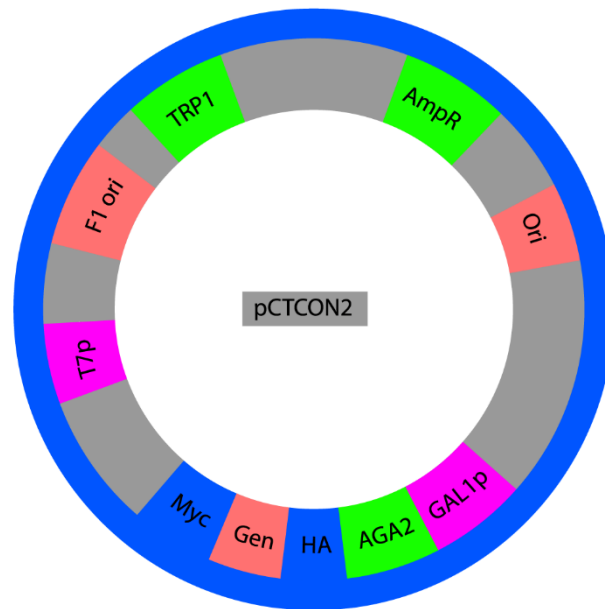
1. Kvasci su eukariotski ekspresioni sistemi koji mogu da vrše post-translacione modifikacije (kao što je formiranje disulfidnih mostova)
2. Ovi sistemi nisu zahtevni ni tehnički, ni vremenski, u odnosu na ostale eukariotske sisteme
3. Omogućavaju uključivanje epitopskih oznaka, koje olakšavaju identifikaciju proteina koji se eksprimira, ili omogućavaju afinitet vezivanja za određeni ligand
4. Kompatibilnost sa analizama protočne citometrije, kojom mogu da se odredi kinetika disocijacije, stabilnost i specifičnost, bez dodatne ekspresije, dobijanja rastvornog proteina i njegovog prečišćavanja [223]

I pored toga što su do sada korišćeni mnogi sojevi kvasca i različiti proteini sidra, najkorišćeniji sistem je *Saccharomyces cerevisiae* Aga1-Aga2. Sa ovakvim sistemom dolazi do ekspresije proteina koji je vezan za Aga2 protein, a koji je povezan preko dva disulfidna mosta sa membranskim proteinom α -aglutininom Aga1. [225, 226] (Slika 22)



Slika 22: Ekspresija na površini ćelija kvasca preko Aga1 i Aga2 proteina

Da bi došlo do ekspresije željenog proteina, potrebno je klonirati gen koji kodira željeni protein u klonirajući region pCTCON2 ekspresionog vektora. Kao što se može videti na Slici 23, klonirajući region se nalazi nizvodno od GAL1 promotora, koji omogućava uspešnu ekspresiju proteina u prisustvu galaktoze kao inducera. Nizvodno od promotora se nalazi gen koji kodira Aga2 protein, nakon toga ide gen za hemaglutinin epitop (HA), pa klonirajući region, i onda Cmyc tag (peptidni epitop). Ova dva spomenuta epitopa služe za detekciju konstrukta na površini ćelija, korišćenjem specifičnih antitela obeleženih enzimima ili fluorescentnim bojama. [224]



Slika 23: Mapa klonirajućeg vektora pCTCON2

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Oprema

Analitička vaga : Shimadzu ATX224

Centrifuga : Eppendorf minifuga

Centrifuga : BioSan LMC – 3000

Elisa čitač : LKB 5060-006

FT-IR spektrofotometar: Nicolet 6700 Thermo-Scientific

Liofilizator: Christ, Alpha 2–4 LD plus

Mikroskop: Olympus, CX22

NMR spektrofotometar : Bruker Avance III 500 MHz (AV500)

Peristaltička pumpa : Heidolf peristaltic pump

pH metar : Adwa AD8000

Sistem za proteinsku elektroforezu : Cleaver Scientific Ltd CS – 300V

Spektrofotometar : WPA Lightwave S2000 UV/VIS

Tehnička vaga : Kern 440 – 35A

Termostat: Enviromental Shaker – Inkubator ES – 20

Ultrazvučna sonda: Branson, Sonifier 150

3.1.2. Hemikalije

Pektin iz kore citrusa, natrijum-alginat iz smeđih algi, dopamin-hidrochlorid, triton X-100 (t-oktil-fenoksi-polietoksietanol) i Span 80 (sorbitan-monooleat) su naručeni od kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD). Natrijum-cijanoborhidrid je kupljen od Merck kompanije (Darmstadt, Nemačka), a natrijum-metaperjodat od VWR Chemicals (Leuven, Belgija). Od

kompanije Betahem (Beograd, Srbija) su poručene soli kalcijum-hlorida, natrijum-hlorida, amonijum-sulfata i bakar (II)-hlorida. Supstrat za lakazu, 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) je kupljen od AppliChem kompanije (Darmstadt, Nemačka). MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum bromid) je kupljen od kompanije Acros Organics. Sve korišćene sintetičke boje su kupljene od kompanije Roth (Karlsruhe, Nemačka) i Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD).

Antibiotski selektabilni marker, ampicilin, naručen je od kompanije Invitrogen (Kalifornija, SAD). Korišćene komponente za pripremu medijuma, agar, pepton i triptonsu naručene od kompanije Torlak (Srbija), a azotne baze kvasca bez amonijum-sulfata i aminokiselina (YNB), kao i kazamino kiseline (CAA) su naručene od Roth (Karlsruhe, Nemačka).

3.1.3. Izvor genskog konstrukta za lakazu

Gen za lakazu iz soja *Streptomyces cyaneus* je sintetisan od strane Genscript kompanije (Piscataway, SAD) i ukloniran u pET-22b(+) vektor, kao i PCTCON2 vektor, od strane Selin Ece i saradnika.

3.1.4. Vektori i sojevi

Soj *Escherichia coli* BL21 je korišćen kao domaćini za kloniranje željenog gena, a soj DH5 α kao soj za održavanje plazmida.

Za ekspresiju gena na površini ćelija kvasca korišćen je pCTCON2 vektor i *Saccharomyces cerevisiae* soj EBY100 dobijeni od profesora Dejn Vitrap sa MIT (SAD).

3.2. Mikrobiološke metode

U svim mikrobiološkim metodama su poštovana pravila rada u mikrobiološkoj hemiji. Za pripremu mikrobioloških podloga, korišćene su supstance čistoće *pro analysis*. Prilikom pripremanja podloga, određene količine supstanci su suspendovane u demineralizovanoj vodi, a potom i sterilisane u autoklavu na 121°C tokom 20 minuta. Komponente za pripremanje medijuma koje su termolabilne i ne smeju da se sterilišu na visokoj temperature, su sterilisane filter sterilizacijom, upotrebom filtera od 0,22 mikrona.

3.2.1. Medijumi za rast bakterija

3.2.1.1. Super optimalni tečni medijum za rast bakterija (SOC medijum)

SOC medijum je pripreman rastvaranjem 5 g ekstrakta kvasca, 0,5 g NaCl i 20 g triptona u 960 mL demineralizovane vode, nakon čega je rastvor sterilisan i ohlađen. U ohlađen medijum su dodati prethodno sterilisani rastvori: 10 mL 1M MgCl₂, 10 mL 1M MgSO₄ i 20 ml 20% (w/v) glukoze.

3.2.1.2. Luria–Bertani medijum za rast bakterija (LB medijum)

U 1000 mL demineralizovane vode je suspendovano 5 g ekstrakta kvasca, 10 g NaCl i 10 g triptona. Podešen je pH rastvora na 7,4, nakon čega je urađena sterilizacija.

3.2.1.3. Luria–Bertani medijum za rast bakterija sa rezistencijom na ampicilin (LB – ampicilin)

U 1000 mL demineralizovane vode su resuspendovane sledeće komponente: 5 g ekstrakta kvasca, 10 g NaCl i 10 g triptona. pH rastvora je podešena na 7,4, nakon čega je rastvor sterilisan. Nakon sterilizacije i hlađenja do 50°C, dodat je sterilan rastvor ampicilina (C = 100 mg/mL), do finalne koncentracije od 100 µg/mL.

3.2.1.4. Luria–Bertani medijum za rast bakterija sa rezistencijom na kanamicin i hloramfenikol (LB–kanamicin, hloramfenikom)

U 1000 mL demineralizovane vode su resuspendovane sledeće komponente: 5 g ekstrakta kvasca, 10 g NaCl i 10g triptona. pH rastvora je podešena na 7,4, nakon čega je rastvor sterilisan. Nakon sterilizacije i hlađenja do 50°C, dodati su sterilni rastvori kanamicina (C = 25 mg/mL) i hloramfenikola (C = 25 mg/mL), do finalnih koncentracija od 25 µg/mL.

3.2.1.5. Luria–Bertani čvrst medijum za rast bakterija (LA medijum)

U 1000 mL demineralizovane vode je suspendovano 5 g ekstrakta kvasca, 10 g NaCl, 10 g triptona i 20 g agara, nakon čega je podešen pH na 7,4 i sterilisan rastvor.

3.2.1.6. Luria–Bertani čvrst medijum za rast bakterija sa rezistencijom na ampicilin (LA–ampicilin)

U 1000 mL demineralizovane vode je rastvoreno 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 10 g triptona i 20 g agara. Nakon što je pH rastvora podešena na 7,4, rastvor je sterilisan, ohlađen i u njega je dodan 1 ml sterilnog rastvora ampicilina ($C = 100 \text{ mg/mL}$), tako da je finalna koncentracija ampicilina iznosila $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

3.2.1.7. Luria–Bertani čvrst medijum za rast bakterija sa rezistencijom na kanamicin i hloramfenikol (LA-kanamicin, hloramfenikol)

U 1000 mL demineralizovane vode je rastvoreno 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 10 g triptona i 20 g agara. Nakon što je pH rastvora podešena na 7,4, rastvor je sterilisan, ohlađen i u njega je dodan po 1 mL sterilnog rastvora kanamicina ($C = 25 \text{ mg/mL}$) i hloramfenikola ($C = 25 \text{ mg/mL}$), tako da su finalne koncentracije kanamicina i hloramfenikola iznosile $25 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Medijumi za rast kvasaca

3.2.2.1. YPD tečni medijum za rast kvasaca

U 900 mL demineralizovane vode je resuspendovano 10 g ekstrakta kvasca i 20 g triptona. Dobijeni medijum je sterilisan i ohlađen na $50 \text{ } ^\circ\text{C}$, nakon čega mu je dodato 100 mL prethodno sterilisanog rastvora 20 % glukoze (w/v).

3.2.2.2. YPD čvrsti medijum za rast kvasaca

U 900 mL demineralizovane vode je resuspendovano 10 g ekstrakta kvasca, 20 g triptona i 20 g agara. Dobijeni rastvor je sterilisan i ohlađen na $50 \text{ } ^\circ\text{C}$, nakon čega mu je dodato 100 mL prethodno sterilisanog 20 % rastvora glukoze (w/v).

3.2.2.3. 2xYPAD tečni medijum za rast kvasaca

U 800 mL demineralizovane vode je resuspendovano 20 g ekstrakta kvasca, 40 g triptona i 0,08 g adenin-sulfata. Nakon sterilizacije je rastvor ohlađen na $50 \text{ } ^\circ\text{C}$ i dodato mu je 200 mL prethodno sterilisanog 20 % rastvora glukoze (w/v).

3.2.2.4. Tečni selektivni medijum za rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A)

U 890 mL demineralizovane vode su rastvorene sledeće supstance: 5,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,6 g azotne baze kvasca bez $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i amino kiselina (YNB) i 5 g kazamino kiselina (CAA). Dobijeni rastvor je sterilisan, ohlađen na oko 50 °C i dodati su sledeći, prethodno sterilisani rastvori: 100 mL 20 % glukoze (Glc) (w/v) i 10 mL 20 mg/mL adenin-sulfata (A).

3.2.2.5. Tečni selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A)

U 890 mL demineralizovane vode su rastvorene sledeće supstance: 5,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,6 g azotne baze kvasca bez $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i amino kiselina (YNB) i 5 g kazamino kiselina (CAA). Dobijeni rastvor je sterilisan, ohlađen na oko 50 °C i dodati su sledeći, prethodno sterilisani rastvori: 100 mL 20 % galaktoze (Gal) (w/v) i 10 mL 20 mg/ml adenin-sulfata (A).

3.2.2.6. Čvrsti selektivni medijum za rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A)

U 890 mL demineralizovane vode je resuspendovano 5,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,6 g azotne baze kvasca bez $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i amino kiselina (YNB), 5 g kazamino kiselina (CAA) i 20 g agara. Nakon sterilizacije medijuma, ohlađen je na 50 °C i dodati su prethodno sterilisani rastvori: 100 mL 20 % (w/v) glukoze i 10 mL 20 mg/mL adenin-sulfata.

3.2.3. Kompetentne ćelije

3.2.3.1. Pripremanje hemijski kompetentnih ćelija bakterija *Escherichia coli* DH5a soja

Sa LA agar ploče je inokulisanaa jedna kolonija *Escherichia coli* DH5a soja u 10 mL LB medijuma i gajena u termostatu sa mešanjem 8 h na temperaturi od 37 °C, pri 250 obrtaja/min. 1ml kulture ćelija je prebačen u 100 mL svežeg LB medijuma, i ćelije su gajene na 22 °C preko noći u termostatu sa mešanjem, pri 250 obrtaja/min, dok optička gustina na 600 nm nije dostigla vrednost od 0,55. Kada je postignuta odgovarajuća optička gustina, ćelije su prebačene na led i inkubirane 10 minuta. Nakon inkubacije su ćelije centrifugirane na 4 °C, 10 minuta na 3000 obrtaja/min. Dobijeni supernatant je odbačen, a staložene ćelije su resuspendovane u 40 mL sterilnog, ledenog Inoue pufera (55 mM MnCl_2 , 15 mM CaCl_2 , 250 mM KCl, 10 mM PIPES, pH

6,7). Čelije su ponovo centrifugirane na 4 °C u trajanju od 10 minuta i pri 3000 obrtaja/min i resuspendovane u 8 mL istog, Inoue, pufera. Čelijama je dodato i 0,7 mL sterilnog DMSO-a, nakon čega su ćelije ostavljene na ledu 10 minuta. Suspenzija ćelija je podeljena u alikvote od po 100 µL koji su odmah nakog alikvotiranja zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80 °C.

3.2.3.2. Pripremanje hemijski kompetentnih ćelija bakterija *Escherichia coli* BL21 soja

Sa LA agar ploče je inokulisana jedna kolonija *Escherichia coli* BL21 soja u 5 mL LB medijuma sa kanamicinom i hloramfenilom. Zasejana ćelija je inkubirana u termostatu sa mešanjem na temperaturi od 37 °C, pri 250 obrtaja/min, tokom 16 h. 2 mL kulture ćelija je prebačen u 200 mL svežeg LB medijuma, i ćelije su gajene na 37 °C u termostatu sa mešanjem, pri 250 obrtaja/min, dok optička gustina na 600 nm nije dostigla vrednost od 0,375. Kada je postignuta odgovarajuća optička gustina, ćelije su alikvotirane u 4 sterilne polipropilenske posude po 50 mL i inkubirane na ledu 5-10 minuta. Nakon inkubacije su ćelije centrifugirane na 4 °C, 7 minuta na 3000 obrtaja/min. Dobijeni supernatant je odbačen, a staložene ćelije su resuspendovane u po 10 mL sterilnog, ledeno hladnog 100 mM CaCl₂. Čelije su ponovo centrifugirane na 4 °C u trajanju od 5 minuta, pri 3000 obrtaja/min. Dobijene ćelije su resuspendovane u 10 mL ledeno hladnog 100 mM CaCl₂ i inkubirane 30 minuta na ledu. Nakon perioda inkubacije je izvršeno centrifugiranje na 3000 obrtaja/min u trajanju od 5 minuta. Supernatant je odbačen, a staložene ćelije su resuspendovane u ledeno hladnom 100 mM CaCl₂ sa 10 % glicerolom. Dobijena suspenzija ćelija je podeljene u alikvote od po 250 µL u sterilnim ependorfama, koje su odmah nakon alikvotiranja zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80°.

3.2.3.3. Pripremanje hemijski kompetentnih ćelija kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100

Tokom pripreme hemijski kompetentnih ćelija, kolonija *Saccharomyces cerevisiae* EBY 100 soja sa YPD agar ploče je inokulisana u 2,5 mL 2xYPAD tečnog medijuma sa 12,5 µg/mL hloramfenikola. Čelije su gajene u termostatu sa mešanjem preko noći na 30 °C (250 obrtaja/min). Prekonoćna kultura je prebačena u erlenmajer sa 50 mL 2xYPAD medijuma i ćelije su gajene pri temperaturi od 30 °C, na 250 obrtaja/min u termostatu sa mešanjem. Kada su ćelije dostigle željenu optičku gustinu na 600 nm (oko 1), prekinut je rast centrifugiranjem na 3000 obrtaja/min u toku od 5 minuta. Dobijeni ćelijski pelet je resuspendovan u 25 mL sterilne, demineralizovane vode, a

nakon toga još jednom centrifugiran na istom broju obrtaja tokom 5 minuta. Još jednom je izvršeno resuspendovanje ćelija u sterilnoj, demineralizovanoj vodi (500 μ L) i centrifugiranje od 5 minuta na 6000 obrtaja/min. Finalno dobijene ćelije su resuspendovane u sterilnom FCC rastvoru (5 % glicerol, 10 % DMSO), a nakon toga podeljene u alikvote od po 50 μ L koji su zamrznuti na -80°C .

3.3. Molekularno–biološke metode

3.3.1. Transformacija kompetentnih ćelija *Escherichia coli*

Transformacija prethodno pripremljenih kompetentnih ćelija *Escherichia coli* je rađena sa dobijenim plazmidnim konstruktom, ukloniranog gena za lakazu u pET-22b(+) vektoru (dobijenim od dr Selin Ece i Prof. dr Rainer Fischer). Plazmidna DNK je dodata u zamrznute kompetentne ćelije, a nakog toga je transformaciona smeša inkubirana na ledu 30 minuta. Nakon toga su ćelije temperaturno šokirane na 42°C , 45 sekundi, a odmah nakon toga su stavljene u led na 2 minuta. 1 mL SOC medijuma je dodat u transformisane ćelije i izvršena je inkubacija na 37°C u trajanju od 1 h. Po završetku inkubacije, uzeto je 100 μ L dobijene smeše i zasejano na LA medijum sa odgovarajućim antibiotikom. Zasejane ćelije su inkubirane 14 h na 37°C .

3.3.2. Transformacija kompetentnih ćelija *Saccharomyces cerevisiae*

Prethodno pripremljene kompetentne ćelije *Saccharomyces cerevisiae* su polako otopljene na ledu i nakon toga centrifugirane 2 minuta na 6000 obrtaja/min. Dobijeni supernatant je odbačen, a staložene ćelije su resuspendovane u 260 μ L 50 % rastvora PEG3350, 36 μ L 1 M litijum acetata, 50 μ L skuvane jednolančane DNK (2 mg/ml) i 14 μ L plazmidne DNK. Ćelijska smeša je promešana na vorteksu i inkubirana na temperaturi od 42°C tokom 1 h. Nakon perioda inkubacije, u ćelijsku suspenziju je dodat 1ml odgovarajućeg medijuma za rast. Uzeto je 200 μ L finalne smeše i zasejano na odgovarajući čvrst medijum za rast ćelija. Zasejane ćelije su inkubirane 2 dana na 28°C .

3.3.3. Izolovanje plazmida

3.3.3.1. Izolovanje plazmida iz bakterija

Sa LA medijuma sa odgovarajućim antibiotikom je inokulisana jedna ćelija u 5 mL LB medijuma sa istim antibiotikom. Ćelije su gajene u termostatu sa mešanjem 14 h na 37°C pri 250 obrtaja/min. Nakon 14 h, prekonoćna kultura je centrifugirana 1 minut na 13000 obrtaja/min.

Supernatant je odbačen, a ćelije su resuspendovane u 150 μ L hladnog GTE+ rastvora (25 mM TRIS, 10 mM EDTA, 50 mM glukoza, 100 μ g/ml ribonukleaze, pH 8,0). Nakon toga je ćelijama dodato i 300 μ L sveže pripremljenog P2 rastvora (200 mM NaOH, 1 % SDS) i sve je lagano mešano dok rastvor ćelija nije bio potpuno bistar. Potom je dodato 450 μ L hladnog 4 M CH₃COOK, pH 6,3, pri čemu je uz veoma lagano izvrtanje ependorfa došlo do formiranja beličastog precipitata. Dobijena suspenzija je centrifugirana 4 minuta na 13000 obrtaja/min. Odvojeni supernatant je prebačen u nov ependorf i izvršeno je precipitiranje plazmidne DNK dodatkom 400 μ L izopropanola. Dobijena smeša je promešan nekoliko puta i centrifugirana 4 minuta na 13000 obrtaja/min. Supernatant je odbačen, a precipitat sa plazmidnom DNK je ispran dodatkom 1 mL ledeno-hladnog 75 % etanola. Etanol je potom uklonjen centrifugiranjem 2 minuta na 13000 obrtaja/min, a dobjeni precipitat, plazmidna DNK, je osušen u vakuum uparivaču na 45 °C, 30 min.

3.3.4. Proizvodnja lakaze u *Escherichia coli* BL21 soju

Prethodno transformisane ćelije *E. coli* BL21 soja sa pET22b(+) vektorom sa ukloniranom lakazom su inokulisane u 10 mL tečnog LB medijuma sa ampicilinom (100 μ g/mL). Inokulisane ćelije su inkubirane tokom noći na 37 °C mešajući se brzinom od 180 obrtaja/min. Prekonoćna kultura je prebačena u 300 mL LB medijuma sa ampicilinom iste koncentracije i ostavljena je da se meša (180 obrtaja/min) na temperaturi od 37 °C, dok optička gustina na 600 nm nije dostigla 0,6. Ekspresija proteina je indukovana dodatkom izopropil- β -D-tiogalaktopiranozida (IPTG) u finalnoj koncentraciji od 0,5 mM. Pripremljena suspenzija je inkubirana 20 h na 20 °C uz mešanje od 180 obrtaja/min.

3.3.5. Proizvodnja lakaze u *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soju

Transformisane ćelije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja sa plazmidnim konstruktom pCTCON2 plazmida i gena za lakazu (dobijenim od dr Selin Ece i Prof. dr Rainer Fischer), kao i sa praznim PCTCON2 vektorom, su inokulisane u 50 mL tečnog YNB – CAA medijuma sa Glc + A. Inokulisane ćelije su inkubirane na 30 °C preko noći pri 160 obrtaja/min. Praćena je optička gustina na 600 nm i kada je dostigla oko 5, ekspresija proteina je indukovana dodatkom tečnog tečnog YNB – CAA medijuma sa Gal+A. Ćelijske suspenzije su razblažena galaktoznim medijumom tako da finalno OD_{600nm} bude ~ 0,5. Ekspresija je rađena na 30 °C, pri mešanju od 160 obrtaja/min, tokom 24 h.

3.4. Preparativne metode

3.4.1. Afinitetna hromatografija

Nakon završene fermentacije ćelija *E. coli*, ćelijske suspenzije su centrifugirane (3000 obrtaja/min, 30 minuta, 4 °C) i dobijeni talog ćelija je resuspendovan u 20 mM K-fosfatnom puferu pH 7,4 koji je sadržao 300 mM NaCl. Potom je izvršeno liziranje ćelija dejstvom ultrazvučne sonde (12×10 s) i centrifugiranje na 3000 obrtaja/min, tokom 20 minuta. Dobijeni supernatant je dodatno proceden, a nakon toga koncentrovan na Viva Flow 50 (Sartorius, Nemačka) ultrafiltracionoj membrani sa 10 kDa cut – off. Nakon koncentrovanja, koncentrat je dodatno proceden kroz 0,45 µm PVDF filter. Skoncentrovan i proceden uzorak je prečišćavan na 10ml Ni-nitilotriacetat-agaroz (Ni-NTA) afinitetnoj koloni. U skoncentrovan uzorak je prethodno dodat imidazol koncentracije 20 mM i podešen pH na 7,4. Ekvilibracija kolone je rađena sa 20mM kalijum-fosfatnim puferom pH 7,4, koji je sadržao 20 mM imidazol i 300 mM NaCl. Na kolonu je pre nanošenja uzorka nanet 0,1 M NiCl₂·6 H₂O. Za eluciju proteina korišćen je gradijent od 0 do 500 mM imidazola u 20 mM kalijum-fosfatnom puferu sa 300 mM NaCl, pH vrednosti 7,4. Elucija je rađena sa 10 zapremina kolone i protokom od 0,8 mL/min, praćena merenjem apsorbance na talasnim dužinama od 280, 325 i 600 nm. Sakupljene frakcije od 2 mL su naknadno analizirane na aktivnost lakaze.

3.5. Analitičke metode

3.5.1. Određivanje enzimске aktivnosti

3.5.1.1. Određivanje enzimске aktivnosti slobodne lakaze

Određivanje enzimске aktivnosti lakaze rađeno je na sobnoj temperaturi koristeći ABTS kao supstrat ($\epsilon_{420} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), prateći njegovu oksidaciju merenjem apsorbance na 420 nm, na Elisa Microplate Reader-u LKB 5060-006 (LKB, Beč, Austrija).

Reakciona smeša za prečišćen, slobodan enzim se sastojala od sledećih komponenti: 2 µL rastvora enzima ($C = 0,1\text{ mg/mL}$), 158 µL Na-acetatnog pufera (pH 4,5, 100 mM), 20 µL 20 mM CuSO₄ i 20 µL 20 mM ABTS-a. Apsorbanca na 420 nm je merena na svakih 2 minuta, u periodu od 20-30 minuta.

3.5.1.2. Određivanje enzimске aktivnosti imobilizovane lakaze u mikrokuglicama

Za određivanje enzimске aktivnosti imobilizovane lakaze, u reakcionu smešu koja se sastojala od 1,6 mL Na-acetatnog pufera (0,1 M, pH 4,5), 200 μ L CuSO_4 (20 mM) i 200 μ L ABTS-a (20 mM) je dodato 10 mg vlažnih mikrokulica. Pripremljena reakciona smeša je centrifugirana 1 minut na 2500 obrtaja/minuti i 200 μ l supernatanta je prebačeno u mikrotitar ploču iz koje je merena apsorbanca. Apsorbanca je merena na Elisa Microplate Reader-u na 420 nm, na sobnoj temperaturi. Nakon merenja apsorbanca, odvađena zapremina supernatanta je vraćana u reakcionu smešu sa mikrokuglicama da bi se reakcija mogla nastaviti u prvobitnoj zapremini. Svaka 3 minuta je reakciona smeša centrifugirana, uzimani su alikvoti i merena je njihova apsorbanca. Izračunata je specifična aktivnost imobilizovane lakaze po miligramu vlažnih mikrokuglica.

3.5.1.3. Određivanje enzimске aktivnosti lakaze na površini ćelija kvasca

Za enzim zakačen za ćelije kvasca je korišćena sledeća reakciona smeša : 8 μ l suspenzije ćelija (u Na-acetatnom puferu pH 4,5, koncentracije 250 mg/mL), 200 μ L 20 mM CuCl_2 , 1092 μ L Na-acetatnog pufera pH 4,5 i 200 μ L 20 mM ABTS-a. Po 200 μ L ovako pripremljene smeše je prebačeno u mikrotitar ploču i apsorbanca na 420 nm je merena svakih 15 minuta na sobnoj temperaturi, tokom 2h.

3.5.1.4. Određivanje enzimске aktivnosti lakaze na ćelijskim zidovima

Prilikom merenja aktivnosti ćelijskih zidova sa lakazom pripremana je smeša koja se sastojala od: 13 μ L suspenzije ćelijskih zidova u Na-acetatnom puferu pH 4,5 (koncentracija suspenzije ćelijskih zidova u puferu je 150 mg/mL), 200 μ L 20 mM CuCl_2 u istom puferu, 1087 μ L Na-acetatnog pufera pH 4,5 i 700 μ L 20 mM ABTS u istom puferu. 200 μ L pripremljene smeše je prebačeno u mikrotitar ploču i apsorbanca na 420 nm je merena svakih 2 minuta tokom 15 minuta.

3.5.1.5. Određivanje enzimске aktivnosti imobilizovane lakaze na ćelijskim zidovima

Određivanje enzimске aktivnosti alginatnih kuglica sa ćelijskim zidovima sa lakazom je vršeno dodatkom kuglica u smešu koja se sastojala od 550 μ L 0,1 M Na-acetatnog pufera pH 4,5, 100 μ L 20 mM CuCl_2 u istom puferu i 350 μ L 20 mM ABTS-a u istom puferu. Svakih 5 minuta je uzimano 200 μ L reakcione smeše i merena je apsorbanca na 420 nm na sobnoj temperaturi.

Prilikom određivanja enzimске aktivnosti svih uzoraka, merenja su rađena u triplikatu. Jedna internacionalna jedinica (IU) enzimске aktivnosti lakaze je definisana kao količina enzima koja oksiduje 1 μmol supstrata tokom jednog minuta, pri datim reakcionim uslovima. [227]

3.5.2. Određivanje koncentracije proteina Bredfordovom metodom

3.5.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bredfordovom metodom

Priprema Bredfordovog reagensa: 250 mg CBB G-250 boje je rastvoreno u 50 mL 95% etanola, a potom je dodato 100 mL 96% fosforne kiseline i dopunjeno destilovanom vodom do 200 mL. Pripremljen rastvor je razblažen 5 puta destilovanom vodom i filtriran kroz nabrani filter papir do gubitka plave boje.

U mikrotitar ploči se pomeša 200 μL Bredfordovog reagensa i 20 μL uzorka (za mikro esej), odnosno 5 μL uzorka (za makro esej). Kao slepa proba se uzima ista količina destilovane vode i 200 μL Bredfordovog reagensa. Bredfordov reagens i uzorak se inkubiraju 5 minuta, a nakon toga se meri apsorbanca na 620 nm na Elisa Reader-u. Rastvor BSA koncentracije 0,1 - 1 mg/mL, odnosno 0,01 - 0,1 mg/mL, se koristi za konstruisanje makro, odnosno mikro standardne prave.

3.5.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina merenjem absorbance na 280 nm je korišćeno prilikom određivanja koncentracije proteina u supernatantu tokom ćelijske lize kvasca. Za izračunavanje koncentracije proteina korišćen je izračunat molarni ekstencioni koeficijent za lakazu iz *S. cyaneus*, na osnovu kodirajuće sekvence, uključujući i C-terminalni His6 tag.

3.5.3. Denaturišuća elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza je korišćena za proveru čistoće dobijenog proteina. Pripremani su 4 % gel za koncentrovanje i 10 % gel za razdvajanje, prema podacima prikazanim u Tabeli 1.

Tabela 1: Komponente za pripremu gelova za razdvajanje i koncentrovanje kod SDS-PAGE

<i>Komponenta</i>	<i>Gel za razdvajanje (10 %)</i>	<i>Gel za koncentrovanje (4 %)</i>
Rastvor akrilamida (AA, 30 % T, 2,7 % C)*	3,33 mL	0,5 mL
1,5 M Tris pufer pH 8,8	2,5 mL	/
0,5 M Tris pufer pH 6,8	/	940 µL
Voda	4 mL	2,25 mL
10 % SDS	100 µL	38 µL
TEMED	4 µL	2 µL
10 % APS	75 µL	25 µL
Ukupna zapremina	10 mL	4 mL

*T-ukupna masa akrilamida i bisakrilamida u 100 mL rastvora; C-masa bisakrilamida u odnosu na T.

Priprema uzoraka za SDS-PAGE: Jedna zapremina pufera za uzorke (PUZ, 60 mM Tris pH 6,8, 10 % glicerol, 2 % SDS, 14,4 mM β – merkaptioetanol, 0,02 % bromfenolplavo) je pomešana sa 4 zapremine uzorka. Dobijena smeša je inkubirana 10 minuta na 95 °C. Ovako pripremljeni uzorci su spremni za nanošenje na gel.

Uslovi rada: Tokom koncentrovanja uzorka, tačnije dok uzorci iz koncentrujućeg gela nisu ušli u razdvajajući gel, elektroforeza je rađena pod naponom od 80 V. Nakon toga je napon povećan na 180 V. U kadici za elektroforezu se nalazio pufer za elektroforezu koji se sastojao od 25 mM Tris pufera, 192 mM glicina, 0,1 % SDS-a na pH 8,3.

Nakon završetka elektroforeze, gel je prebačen u rastvor za bojenje i fiksiranje (0,1 % CBB G-250, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina). Nakon bojenja je prebačen u rastvor za obezbojavanje (7 % rastvor sirćetne kiseline), što je dovelo do pojave plavo obojenih proteinskih traka na gelu.

3.5.4. Nativna elektroforeza

Prečišćen protein je analiziran i pomoću native poliakrilamidne elektroforeze. Prilikom pripreme gelova za koncentrovanje i razdvajanje uzoraka, korišćene su komponente prikazane u Tabeli 2.

Tabela 2: Komponente za pripremu gelova za razdvajanje i koncentrovanje kod nativne elektroforeze

<i>Komponenta</i>	<i>Gel za razdvajanje (10 %)</i>	<i>Gel za koncentrovanje (4 %)</i>
Akrilamidni rastvor (AA, 30 % T, 2,7 % C)	3,33 mL	0,5 mL
1,5 M TRIS pufer pH 8,8	2,5 mL	/
0,5 M TRIS pufer pH 6,8	/	940 µL
Voda	4,1 mL	2,29 mL
TEMED	4 µL	2 µL
10 % APS	75 µL	25 µL
Ukupna zapremina	10 mL	4 mL

*T-ukupna masa akrilamida i bisakrilamida u 100 mL rastvora; C-masa bisakrilamida u odnosu na T.

Priprema uzoraka za nativnu elektroforezu: Jedna zapremina pufera za uzorke (PUZ, 60 mM Tris pH 6,8, 10 % glicerol, 0,02 % bromfenolplavo) je pomešana sa 4 zapremine uzorka. Ovako pripremljeni uzorci su spremni za nanošenje na gel.

Uslovi rada: Dok uzorci iz koncentrujućeg gela nisu ušli u razdvajajući gel, elektroforeza je rađena pod naponom od 80 V, a nakon toga je napon povećan na 180 V. U kadici za elektroforezu se nalazio pufer za elektroforezu koji se sastojao od 25 mM Tris pufera, 192 mM glicina na pH 8,3.

Da bi bila moguća detekcija lakaze na gelu, naneta su dva paralelna seta uzoraka na gel. Gel je podeljen na dva dela nakon završetka elektroforeze, i polovina gela sa prvim setom uzoraka je prebačena u rastvor za bojenje i fiksiranje (0,1 % CBB G-250, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina). Nakon bojenja je prebačena u rastvor za obezbojavanje (7 % rastvor sirćetne kiseline), što je dovelo do pojave plavo obojenih proteinskih traka na gelu.

3.5.5. Detekcija aktivnosti lakaze u nativnom gelu (zimogram)

Sa drugom polovinom gela, koja je sadržala drugi set istih uzoraka je proverena detekcija aktivnosti lakaze. Pripremljeno je 15 mL 1 % agaroznog rastvora u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 5 i dodato je ABTS do finalne koncentracije 5 mM. Rastvor je izliven u kadicu za DNK elektroforezu i sačekano je da polimerizuje. Na agarozni gel je stavljena polovina poliakrilamidnog gela sa prethodno urađene elektroforeze i sačekano je da dođe do pojave zelenih traka, koje potiču od aktivne lakaze.

3.5.6. Karakterizacija lakaze

3.5.6.1. Određivanje pH optimuma lakaze

Prilikom određivanja pH optimuma lakaze, merena je promena apsorbance u različitim puferima pH opsega od 2 do 9, koristeći ABTS kao supstrat. Korišćeni puferi : 0,1 M citratni pufer pH 2,0-3,5; 0,1 M acetatni pufer pH 4,0-5,5, 0,01 M PIPES pufer pH 6,0-7,5 i 0,1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7,5-9. Relativna aktivnost na različitim pH vrednostima je izračunata i normalizovana u odnosu na maksimalnu aktivnost (na optimalnom pH) i prikazana kao procentualna relativna aktivnost.

3.5.6.2. Određivanje pH stabilnosti lakaze

pH stabilnost lakaze je analizirana inkubiranjem enzima u optimalnom puferu (0,1 M Na-acetatni pufer, pH 4,5) tokom 0, 24 i 48 h, na sobnoj temperaturi. Enzimska aktivnost je merena po protokolu koji je opisan u odeljku 3.5.1. Relativna specifična aktivnost je računata kao što je opisano u odeljku 3.5.6.1.

3.5.6.3. Određivanje temperaturne stabilnosti lakaze

Temperaturna stabilnost je određena inkubiranjem enzima na različitim temperaturama (25, 30, 60 i 90 °C) tokom 1 h. Potom je enzim inkubiran 5 minuta na ledu i merena je enzimska aktivnost po već navedenom protokolu (3.5.1.). Relativna aktivnost je određena u odnosu na najveću aktivnost koja je predstavljena kao 100%.

3.5.6.4. Određivanje kinetičkih parametara lakaze

Kinetički parametri lakaze su određivani na sobnoj temperaturi u optimalnom puferu (0,1 M Na-acetatni pufer pH 4,5) sa ABTS-om kao supstratom u različitom opsegu koncentracija 0,025-1,8 mM. Izračunate vrednosti za enzimsku aktivnost su analizirane nelineranom regresionom analizom u Mihaelis – Menteninu hiperbolu upotrebom Graph Pad Prism 6 programa.

3.6. Proizvodnja liziranih ćelijskih zidova sa eksprimiranom lakazom

Ekspresija lakaze na površini ćelija kvasca je urađena po protokolu opisanom u delu 3.3.5. Dobijene ćelije sa uspešno eksprimiranom lakazom na površini, kao i prazne ćelije transformisane

sa praznim pCTCON2 vektorom, su isprane 3 puta sa 0,1 M Na-acetatnim puferom pH 4,5, da bi se uklonio ekspresioni medijum. Ovako pripremljene ćelije su odvojene centrifugiranjem, izmerene i nakon toga resuspendovane u 3 % rastvoru toluena u vodi u finalnoj koncentraciji od 0,13 g/mL (v/v). Ćelije su lizirane u toluenskom rastvoru na sobnoj temperaturi, pri mešanju od 170 obrtaja/min. Ćelijska liza je praćena tokom 48 h, a svakih par sati je uziman uzorak od 2 mL koji je dalje analiziran. Uzimani uzorci su centrifugirani 2 minuta na 13000 obrtaja/min, nakon čega je dobijeni ćelijski talog ispiran destilovanom vodom, do uklanjanja toluena. U ispranim ćelijama je određivana enzimska aktivnost, po postupku opisanom u poglavlju 3.5.1. Dobijeni supernatant nakon centrifugiranja je okarakterisan i u njemu je određena koncentracija proteina (merjenjem apsorbance na 280 nm), kao i enzimska aktivnost, po opisanim protokolima u poglavljima 3.5.2. i 3.5.1.

3.7. Modifikacija pektina

3.7.1. Perjodatna oksidacija

Pektin je rastvoren u vodi u finalnoj koncentraciji od 1,12 % (w/v). Pektinskom rastvoru je dodat natrijum-metaperjodat u finalnim koncentracijama od 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM i 10,0 mM, tako da odnos molariteta perjodata i pektina bude 5 mol%, 10 mol%, 15 mol% i 20 mol%. Dobijene smeše su ostavljene nekoliko sati da se mešaju na sobnoj temperaturi, u mraku, a nakon toga su ostavljene još 20 h u mraku, na +4 °C. Reakcija je prekinuta dodatkom glicerola u finalnoj koncentraciji od 500 mM uz mešanje u toku od 30 minuta. Dobijeni oksidovani pektin je istaložen iz smeše dodatkom NaCl u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v) i dodatkom dve zapremine 96 % (v/v) etanola. Istaložen pektin je odvojen centrifugiranjem (15 minuta na 3000 obrtaja/min) i rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1% (w/v). Postupak taloženja oksidovanog pektina je ponovljen još dva puta. Finalno dobijen oksidovani pektin je ispran etanolom, osušen na vazduhu i ostavljen za sledeći korak modifikacije.

3.7.2. Reduktivna aminacija natrijum-cijanoborhidridom i dopaminom

Oksidovani pektin je rastvoren u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5 u finalnoj koncentraciji od 1% (w/v). Nakon toga su u dobijeni rastvor istovremeno dodati čvrst dopamin i natrijum-cijanoborhidrid, u finalnim koncentracijama od 1,5 % (w/v) i 0,5 % (w/v), datim redosledom. Reakciona smeša je ostavljena u mraku da se meša 24 h, na sobnoj temperaturi. Nakon

završetka reakcije, modifikovan pektin je istaložen dodatkom NaCl do finalne koncentracije od 1 M i dve zapremine 96 % (v/v) etanola. Dobijeni talog je odvojen ceđenjem na Bihnerovom levku, a nakon toga rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v) i ponovo proceden na Bihnerovom levku. Postupak taloženja je ponovljen još jednom i finalno dobijeni rastvor pektina je liofilizovan. Talog modifikovanog pektina je čuvan na -20 °C.

3.8. Modifikacija alginata

3.8.1. Perjodatna oksidacija alginata

Alginat je rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1,12 % (w/v). U rastvor alginata je dodat natrijum-metaperjodat u finalnim koncentracijama od 1,25 mM, 2,5 mM, 5,0 mM i 10,0 mM, tako da odnos molariteta perjodata i alginata bude 2,5 mol%, 5 mol%, 10 mol% i 20 mol%. Reakcione smeše su ostavljene ~4 h da se mešaju u mraku na sobnoj temperaturi, a nakon toga su ostavljene još 20 h u mraku, na +4 °C. Reakcije su prekinute dodatkom glicerola u finalnim koncentracijama od 500 mM uz mešanje u toku od 30 minuta. Dobijeni oksidovani alginat je istaložen iz smeše dodatkom NaCl u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v) i dodatkom dve zapremine 96 % (v/v) etanola. Istaložen, oksidovan alginat je odvojen centrifugiranjem (15 minuta na 3000 obrtaja/min) i rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v). Postupak taloženja oksidovanog alginata je ponovljen još dva puta. Finalno dobijen oksidovani alginat je ispran etanolom, osušen na vazduhu i ostavljen za sledeći korak modifikacije.

3.8.2. Reduktivna aminacija natrijum-cijanoborhidridom i dopaminom

Oksidovani alginat je rastvoren u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5 u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v). Potom su u rastvor oksidovanog alginata dodati čvrst dopamin i natrijum-cijanoborhidrid, u finalnim koncentracijama od 1,5 % (w/v) i 0,5 % (w/v), datim redosledom. Reakciona smeša je ostavljena u mraku da se meša 24 h, na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, modifikovan alginat je istaložen dodatkom NaCl do finalne koncentracije od 1 M i dve zapremine 96 % (v/v) etanola. Dobijeni talog je odvojen ceđenjem na Bihnerovom levku, a nakon toga rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v) i ponovo proceden na Bihnerovom levku. Postupak taloženja je ponovljen još jednom i finalno dobijeni rastvor alginata je liofilizovan. Modifikovan alginat je čuvan na -20 °C.

3.8.3. Reduktivna aminacija natrijum-cijanoborhidridom i L-DOPA-om

Oksidovani alginat je rastvoren u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5 u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v). Potom su u rastvor oksidovanog alginata istovremeno dodati čvrsta L-DOPA i natrijum-cijanoborhidrid, u finalnim koncentracijama od 1,5 % (w/v) i 0,5 % (w/v). Reakciona smeša je ostavljena u mraku da se meša 24 h, na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, modifikovan alginat je istaložen dodatkom NaCl do finalne koncentracije od 1 M i dve zapremine 96 % (v/v) etanola. Dobijeni talog je odvojen ceđenjem na Bihnerovom levku, a nakon toga rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v) i ponovo proceden na Bihnerovom levku. Postupak taloženja je ponovljen još jednom i finalno dobijeni rastvor alginata je liofilizovan. Modifikovan alginat je čuvan na -20 °C.

3.9. Modifikacije karboksimetilceluloze fenolnim jedinjenjima

3.9.1. Perjodatna oksidacija

Karboksimetilceluloza (CMC) je rastvorena u vodi u finalnoj koncentraciji od 1,12 % (w/v). Pripremljenom rastvoru je dodat natrijum-metaperjodat u finalnim koncentracijama od 1,25 mM, 2,5 mM, 5,0 mM i 7,5 mM ili 10,0 mM, tako da odnos molariteta perjodata i CMC-a bude 2,5 mol%, 5 mol%, 10 mol% i 15 mol% ili 20 mol%. Dobijene smeše su ostavljene nekoliko sati da se mešaju na sobnoj temperaturi, u mraku, a nakon toga su ostavljene još 20 h u mraku, na +4 °C. Reakcija je prekinuta dodatkom glicerola u finalnoj koncentraciji od 500 mM uz mešanje u toku od 30 minuta. Dobijeni oksidovani CMC je istaložen iz smeše dodatkom NaCl u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v) i dodatkom dve zapremine 96 % (v/v) etanola. Istaložen pektin je odvojen centrifugiranjem (15 minuta na 3000 obrtaja/min) i rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1% (w/v). Postupak taloženja oksidovanog pektina je ponovljen još dva puta. Finalno dobijen oksidovani CMC je ispran etanolom, osušen na vazduhu i ostavljen za sledeći korak modifikacije.

3.9.2. Reduktivna aminacija natrijum-cijanoborhidridom i tiraminom/tirozinom/dopaminom

3.9.2.1. Modifikacija tiraminom

Oksidovani CMC je rastvoren u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 6 u finalnoj koncentraciji od 1% (w/v). U dobijeni rastvor je dodat tiramin-HCl u finalnoj koncentraciji od 1,5 % (w/v), a nakon pola sata mešanja na sobnoj temperaturi i provere pH vrednosti rastvora je dodat natrijum-cijanoborhidrida u finalnoj koncentraciji od 0,5 (w/v). Reakciona smeša je ostavljena u mraku tokom 24 h, na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, modifikovan CMC je istaložen dodatkom NaCl do finalne koncentracije od 1 M i dve zapremine 96 % (v/v) etanola. Dobijeni talog je odvojen ceđenjem na Bihnerovom levku, a nakon toga rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v) i ponovo proceden na Bihnerovom levku. Postupak taloženja je ponovljen još jednom i finalno dobijeni talog je ispran etanolom i osušen na vazduhu. Talog modifikovanog pektina je čuvan na -20 °C.

3.9.2.2. Modifikacija tirozinom

Oksidovani CMC je rastvoren u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 6 u finalnoj koncentraciji od 1% (w/v). U dobijeni rastvor je dodat tirozin u finalnoj koncentraciji od 1,5 % (w/v), a nakon pola sata mešanja na sobnoj temperaturi i provere pH vrednosti rastvora je dodat natrijum-cijanoborhidrida u finalnoj koncentraciji od 0,5 (w/v). Reakciona smeša je ostavljena u mraku tokom 24 h, na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, smeša je centrifugirana i odbačen je dobijeni talog. Iz rastvora je istaložen modifikovan CMC dodatkom NaCl do finalne koncentracije od 1 M i dve zapremine 96 % (v/v) etanola. Dobijeni talog je odvojen ceđenjem na Bihnerovom levku, a nakon toga rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v) i ponovo proceden na Bihnerovom levku. Postupak taloženja je ponovljen još jednom i finalno dobijeni talog je ispran etanolom i osušen na vazduhu. Talog modifikovanog pektina je čuvan na -20 °C.

3.9.2.3. Modifikacija dopaminom

Oksidovani CMC je rastvoren u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 6 u finalnoj koncentraciji od 1% (w/v). U dobijeni rastvor je istovremeno dodati čvrst dopamin i natrijum-cijanoborhidrid, u finalnim koncentracijama od 1,5 % (w/v) i 0,5 % (w/v), datim redosledom. Reakciona smeša je ostavljena u mraku tokom 24 h, na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, modifikovan

CMC je istaložen dodatkom NaCl do finalne koncentracije od 1 M i dve zapremine 96 % (v/v) etanola. Dobijeni talog je odvojen ceđenjem na Bihnerovom levku, a nakon toga rastvoren u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 1 % (w/v) i ponovo proceđen na Bihnerovom levku. Postupak taloženja je ponovljen još jednom i nakon toga dobijeni modifikat je liofilizovan i čuvan na -20 °C.

3.10. Karakterizacija modifikovanih polisaharida

3.10.1. Snimanje UV-Vis spektara

Nativni i modifikovani polisaharidi su rastvoreni u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 0,1 % (w/v). Mereni su apsorpcioni spektri rastvora u opsegu talasnih dužina od 200 do 350 nm na UV-Vis spektrofotometru (LLG-uniSPEC2 Spectrophotometer).

3.10.2. Snimanje FTIR spektara

Za snimanje FTIR spektara, nativni i modifikovani polisaharidi su korišćeni kao čvrsti uzorci i snimani su ATR metodom. Spektri su snimani u opsegu od 1800 do 600 cm^{-1} na Thermo Scientific Nicolet 6700 spektrofotometru.

3.10.3. Snimanje ^1H NMR spektara

^1H NMR spektri nemodifikovanih i modifikovanih polisaharida su snimljeni na Bruker Avance III 500 MHz instrumentu. Uzorci su pripremljeni rastvaranjem u deuterijum-oksidu.

3.10.4. Provera sposobnosti formiranja hidrogelova

3.10.4.1. Geliranje u prisustvu vodonik-peroksida i peroksidaze iz rena

Pripremljeni su 10% rastvori tiramin-CMC-a, tirozin-CMC-a i dopamin-CMC-a u destilovanoj vodi. U pripremljene rastvore su dodavani vodonik-peroksid i peroksidaza iz rena (horseradish peroxidase, HRP) u finalnim koncentracijama od 1 mM i 1 U/mL, navedenim redosledom.

Kod tirozinskih derivata je naknadno povećavana koncentracija vodonik-peroksida i HRP-a, usled slabije sposobnosti geliranja.

3.10.4.2. Geliranje u prisustvu natrijum-perjodata u baznoj sredini

Pripremljen je 10 % rastvor dopamin-CMC-a u destilovanoj vodi. U pripremljen rastvor je dodat bazni rastvor natrijum-perjodata koncentracije 0,5 %, sa 1,6 % NaOH, u finalnoj koncentraciji od 0,065 % natrijum-perjodata u smeši.

3.10.4.3. Geliranje neorganskim solima

Geliranje dobijenih modifikata CMC-a je ispitivano sa solima barijuma (II), gvožđa (II) i aluminijuma (III).

Geliranje u prisustvu soli barijuma

Pripremljen je 5,5 % rastvor $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u destilovanoj vodi. U pripremljen rastvor su ukapavani 4 % rastvori CMC-a: nativan CMC, tiramin-CMC i tirozin-CMC. Praćena je promena viskoznosti i boje rastvora.

Geliranje u prisustvu soli gvožđa

Pripremljen je 4 % rastvor $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u destilovanoj vodi. U pripremljen rastvor su ukapavani 4 % rastvori CMC-a: nativan CMC, tiramin-CMC i tirozin-CMC. Praćena je promena viskoznosti i boje rastvora.

Geliranje u prisustvu soli aluminijuma

Pripremljen je 4 % rastvor $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ u destilovanoj vodi. U pripremljen rastvor su ukapavani 4 % rastvori CMC-a: nativan CMC, tiramin-CMC i tirozin-CMC. Praćena je promena viskoznosti i boje rastvora.

3.11. Imobilizacija slobodne lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama

U cilju imobilizacije prečišćene lakaze, metodom okludovanja unutar mikrokuglica koje nastaju enzimskim umrežavanjem hemijski modifikovanog pektina, korišćen je prethodno modifikovan dopamin-pektin. Dopamin-pektini različitih stepena modifikacije (5, 10 i 15 mol%) su rastvoreni u PIPES puferu (0,01 M, pH 7,5), u finalnoj koncentraciji od 20 % (w/v). Pripremljenim rastvorima je dodat 20 mM CuSO_4 u finalnoj koncentraciji od 2 mM i rastvor

enzima lakaze koncentracije 2 mg/mL, tako da je finalno dodato 25 IU u smešu. Finalna smeša se sastojala od sledećih komponenti: 6% dopamin-pektin (w/v), 2 mM CuSO₄ i 25 IU lakaze, u finalnoj zapremini od 165 µL. Pripremljena smeša je odmah nakon dodavanja svih komponenti i homogenizacije ukapana u 500 µL lakog mineralnog ulja koje je sadržalo 3% Span 80 (v/v). Dobijena emulzija je mešana 1,5 h na magnetnoj mešalici (1000 obrtaja/min), sve dok nije došlo do formiranja kuglica braon boje. Reakcija je zaustavljena dodatkom 0,5 mL 0.5% Triton X-100 (v/v) i ostavljena je da se meša još 5 minuta. Dobijene kuglice su isprane tri puta sa 0,5 mL 5% Triton X-100 u CaCl₂ (v/v), a nakon toga i tri puta sa po 0,5 mL 5 % CaCl₂ (w/v). Isprane kuglice su čuvane u 5 % rastvoru CaCl₂ na 4°C.

3.11.1. Prinos imobilizacije

Prinos imobilizacije lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama je definisam kao odnos aktivnosti imobilizovane lakaze u odnosu na ukupnu dodatu aktivnost.

3.11.2. Optimizacija imobilizacije slobodne lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama

Optimizovani su uslovi imobilizacije, kao što su stepen modifikacije dopamin-pektina, masena koncentracija dodatog polimera i količina dodate enzimske aktivnosti. Korišćen je dopamin-pektin različitih stepena modifikacije 5, 10 i 15 mol%, u različitim masenim koncentracijama, tako da su one u finalnoj smeši iznosile 5, 10 i 15 % (w/v). Tokom variranja navedenih parametara, praćena su mehanička svojstva kuglica i parametri imobilizacije (specifična aktivnost, prinos imobilizacije) u cilju pronalaženja uslova za dobijanja kuglica sa optimalnim karakteristikama. Enzimska aktivnost je određena po protokolu navedenom u poglavlju 3.5.1. Nakon što su utvrđeni najbolji uslovi za ova dva parametra, pri tim uslovima je varirana količina dodate enzimske aktivnosti. Dodavani su rastvori enzima različitih koncentracija - 1,385 mg/mL; 2,77 mg/mL; 5,54 mg/mL i 8 mg/mL, što je u ukupnoj smeši iznosilo 12,5, 25, 50 i 72 dodatih enzimskih jedinica lakaze. Merena je enzimska aktivnost dobijenih kuglica i određen prinos imobilizacije, na osnovu kojih su utvrđeni uslovi pravljenja kuglica za sve naredne eksperimente.

Nakon što su defnisani optimalni uslovi za pripremanje mikrokuglica sa ćelijskim zidovima sa lakazom, određena je veličina dobijenih mikrokuglica, na optičkom mikroskopu.

3.12. Imobilizacija ćelijskih zidova sa lakazom u alginatne i dopamin-alginatne kuglice

Dobijeni ćelijski zidovi sa lakazom su resuspendovani u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5 sa 2 mM CuCl_2 u koncentraciji od 450 mg/mL. Pripremljen je 4 % rastvor alginata i dopamin-alginata u istom puferu u kom su resuspendovani i ćelijski zidovi. Od modifikovanih alginata, korišćen je 5 mol% jer su oni sa većim stepenom modifikacije imali mnogo manju viskoznost usled raskidanja veza tokom perjodatne oksidacije, i samim tim nisu mogli da daju mehanički stabilne, sferne kuglice, a manje modifikovan alginat, iako više viskozan, je imao manji stepen modifikacije, pa bi i stepen umreženja sa njima bio manji. Pripremljeni rastvor alginata/dopamin-alginata i ćelijskih zidova su pomešani u zapreminskom odnosu 2:1, tim redom, tako da je finalna smeša sadržala 2,7 % alginat/dopamin-alginat (w/v) i 150 mg/mL ćelijskih zidova sa lakazom. Ovako pripremljena smeša sa nativnim i modifikovanim alginatom je ukapavana u 2 % CaCl_2 (w/v) koji se mešao na magnetnoj mešalici. Formirane kuglice su ostavljene da se mešaju u rastvoru CaCl_2 tokom 30 minuta, a nakog toga su isprane dva puta 2 % rastvorom CaCl_2 i čuvane u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5 sa 5 mM rastvorom CaCl_2 na 4 °C. Sve kuglice su pripremane u triplicatu i sa njima su rađena ostala merenja.

3.12.1.1. Prinos imobilizacije

Prinos imobilizacije je definisan kao odnos aktivnosti imobilizovanog enzima u odnosu na ukupnu dodatnu aktivnost.

3.12.1.2. Optimizacija imobilizacije ćelijskih zidova sa lakazom u alginatne i dopamin-alginatne kuglice

Koncentracija dodatnih ćelijskih zidova je varirana u cilju optimizacije uslova imobilizacije, dobijanja kuglica sa najboljim mehaničkim parametrima i parametrima imobilizacije (specifična aktivnost i prinos imobilizacije). Pomešan je prethodno pripremljen 2,7 % alginat/dopamin-alginat sa različitim koncentracijama smeše ćelijskih zidova u 0,1 M Na-acetatnom puferu (sa 2 mM CuSO_4 , pH 4,5). Finalno pripremljene smeše su sadržale 20, 40, 60, 100, 120, 150, 200 i 250 mg/mL ćelijskih zidova. Ovako pripremljene smeše su ukapavane u 2 % CaCl_2 (w/v) uz mešanje na magnetnoj mešalici i dodatno su mešane 30 minuta, nakog čega su isprane dva puta 2 %

rastvorom CaCl₂ i čuvane u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5 sa 5 mM rastvorom CaCl₂ na 4 °C. Sve kuglice su pripremane u triplikatu i sa njima su rađena ostala merenja.

3.13. Karakterizacija imobilizovane lakaze

3.13.1. Određivanje pH optimuma

Aktivnost imobilizovane lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama je određena koristeći puferne pH opsega od 2,0 do 9,0, dok je za dopamin-alginat kuglice sa ćelijskim zidovima sa lakazom korišćen opseg pH od 2,0 do 7,5. Korišćeni su sledeći puferi: 0,1 M citratni pufer, pH 2,0 - 3,5; 0,1 M acetatni pufer pH 4,0 - 5,5; 0,01 M PIPES pifer pH 6,0 - 7,5 i 0,1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7,5-9. Enzimaska aktivnost je određena sa ABTS-om kao supstratom, po već opisanom postupku u poglavlju 3.5.1. Relativna aktivnost na različitim pH je normalizovana u odnosu na maksimalnu aktivnost (na optimalnom pH) i prikazana kao procentualna relativna aktivnost.

3.13.2. Određivanje pH stabilnosti

Prilikom određivanja pH stabilnost imobilizovanog enzima u optimalnom puferu (0,1 M Na-acetatni, pH 4,5 za dopamin-pektin mikrokuglice i 0,1 M Na-acetatni, pH 5 za dopamin-alginat kuglice), kuglice sa imobilizovanim enzimom su inkubirane 0, 24 i 48 sati, na sobnoj temperaturi. Nakon perioda inkubacije, određena je enzimaska aktivnost, po već objašnjenom postupku u poglavlju 3.5.1. Relativna specifična aktivnost je normalizovana u odnosu na maksimalno dobijenu aktivnost i predstavljena kao procentualna relativna aktivnost.

3.13.3. Određivanje temperaturne stabilnosti

Temperaturna stabilnost imobilizovanog enzima je određivana na temperaturama od 25, 30, 60 i 90 °C. Imobilizovan enzim je inkubiran u toku 1 sata na pomenutim temperaturama, a nakon toga ohlađen na ledu 5 minuta. Enzimaska aktivnost je određena sa ABTS-om kao supstratom, po već opisanom postupku u poglavlju 3.5.1. Relativna aktivnost je računata u odnosu na maksimalnu aktivnost enzima, na optimalnoj temperaturi i predstavljena kao procentualna.

3.13.4. Određivanje kinetičkih parametara

Kinetički parametric, Km i Vmax su određeni za imobilizovanu lakazu u dopamin-pektin mikrokuglicama i imobilizovane ćelijske zidove sa lakazom u dopamin-alginat kuglicama. Korišćene koncentracije supstrata za lakazu u dopamin-pektin mikrokuglicama su bile u opsegu

0,025-1,8 mM, dok su za imobilizovane ćelijske zidove sa lakazom u dopamin-alginatu iznosile 1,5-12 mM. Km i Vmax su određeni iz Michaelis-Menten modela, analizom nelinearne regresije, koristeći program GraphPad Prism v6.

3.14. Dekolorizacija tekstilnih boja

3.14.1. Dekolorizacija boja imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lakazom u dopamin-alginat kuglicama

Za proveru sposobnosti dekolorizacije boja dopamin-alginatnim kuglicama sa ćelijskim zidovima sa lakazom, korišćeno je 8 različitih tekstilnih boja: Amido Black 10B, Methylene Blue, Guinea Green, Reactive Black 5, Methyl green, Evans Blue, Crystal Violet i Remazol Brilliant Blue. Prvobitno su pripremljeni štok rastvori boja u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 5, koji su čuvani na sobnoj temperaturi u mraku. Pre same upotrebe, štok rastvori boja su razblaženi 0,1 M Na-acetatnim puferom pH 5 uz dodatak bakar-hlorida do finalne koncentracije od 2 mM i kalcijum-hlorida od 5 mM, tako da su apsorbance na maksimalnoj talasnoj dužini (za sve boje je to 620 nm) iznosile oko 0,8-1. Reakciona smeša se sastojala od ~20 mg odmerenih kuglica i 1 ml pripremljene boje u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 5 sa 2 mM CuCl₂ i 5 mM CaCl₂. Tako pripremljena reakciona smeša je stajala tokom 48 h u mraku, na sobnoj temperaturi, bez mešanja. Praćena je promena apsorbance na 620 nm, za svaku od navedenih boja. Kao kontrolna reakcija je pripremljena reakciona smeša sa istim komponentama, dok su umesto kuglica sa ćelijskim zidovima sa lakazom, korišćene kuglice sa ćelijskim zidovima bez lakaze. Sva merenja su rađena u triplikatu. Nakon merenja početne apsorbance ($A_{početna}$) i finalne apsorbance ($A_{finalna}$), preračunata je procentualna relativna dekolorizacija, prema sledećoj formuli:

$$Relativna\ dekolorizacija\ (\%) = \frac{A_{početna} - A_{finalna}}{A_{početna}} \times 100$$

Po navedenoj formuli je računata i relativna dekolorizacija sa kontrolnim kuglicama. Dobijene vrednosti kontrolnih kuglica su oduzete od dobijenih vrednosti kuglica sa imobilizovanim enzimom.

3.14.2. Ponovna upotreba kuglica sa imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lakazom

Dopamin-alginatne kuglice sa imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lakazom su testirane za ponovnu upotrebu pri dekolorizaciji tekstilnih boja. Kuglice su inkubirane 48h u rastvorima boja, pripremljenim kao u navedenom postupku u prethodnom poglavlju. Apsorbanca (na 620 nm) pripremljene boje je izmerena u nultom trenutku i nakon 48 h, tj. nakon završetka jednog ciklusa obezbojavanja. Između ciklusa su kuglice odvojene od rastvora, isprane tri puta 0,1 M Na-acetatnim puferom pH 5 sa 5 mM CaCl₂. Ispranim kuglicama je dodavana sveže pripremljena boja. Ovaj proces je ponavljan 10 puta, tokom trajanja svih ciklusa dekolorizacije. Aktivnost kuglica u prvom ciklusu je definisana kao 100 % i relativne aktivnosti ostalih ciklusa su računane u odnosu na tu aktivnost. Ukupno je praćeno 10 ciklusa dekolorizacije, a svaki ciklus je trajao 48 h. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3.14.3. Dekolorizacija boja imobilizovanom lakazom u dopamin-pektin mikrokuglicama

Sposobnost dekolorizacije tekstilnih boja je ispitivana i sa imobilizovanom lakazom u dopamin-pektin mikrokuglicama. Dekolorizacija je testirana sa tri različite boje: Amido Black 10B, Reactive Black 5 i Evans Blue. Pripremljeni su štok rastvori boja u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5 sa 2 mM CuSO₄, koji su čuvani na sobnoj temperaturi, u mraku. Pre postavljanja reakcije, boja je razblažena sa istim puferom do apsorbance od ~ 0,8. Reakcija dekolorizacije je postavljana sa ~10 mg mikrokuglica u 1 mL sveže pripremljene boje, u mraku, na sobnoj temperaturi, bez mešanja. Sve reakcije su postavljane u triplikatu. Promena apsorbance je merena spektrofotometrijski na 620 nm u nultom času reakcije ($A_{\text{početna}}$) i nakon 48 h (A_{finalna}) reakcije.

Relativna dekolorizacija (%) je računata po sledećoj formuli:

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

3.14.4. Ponovna upotreba mikrokuglica sa imobilizovanom lakazom

Ponovna upotreba mikrokuglica sa imobilizovanom lakazom za dekolorizaciju boja je takođe ispitivana. Praćen je stepen dekolorizacije tokom 10 ciklusa od po 48 h. Reakcije dekolorizacije su postavljane na isti način kao što je objašnjeno u prethodnom poglavlju. Nakon završetka svakog

ciklusa reakcije, rastvor je uklanjan, a kuglice su ispirane tri puta sa 0,1 M Na-acetatnim puferom sa 5 mM CaCl₂. Nakon ispiranja kuglica, one su ponovo stavljanje u sveže pripremljen rastvor boje i inkubirane 48 h. Početna apsorbanca u nultom satu, i finalna apsorbanca nakon 48h, su merene na 620 nm za svaki ciklus. Početna apsorbanca reakcione smeše je definisana kao 100 % i u odnosu na nju je računata relativna aktivnost.

3.15. Elektrosponing

Elektrosponing metodom su pravljena nanovlakna od različitih modifikata polisaharida. Za pravljenje nanovlakana su testirani dopamin-alginat (10 i 20 mol%) i dopamin-karboksimetilceluloza (10 mol%). Polimeri su pripremani za elektrosponing rastvaranjem u vodi, a nakon toga su im dodavani dimetilsulfoksid (DMSO), 4% polietilenglikol (PEG) i Tritona X-100. Navedene komponente su mešane u razmerama prikazanim u Tabeli 3. Nakon dodatka svih komponenti, smeše su ostavljene da se mešaju par sati i nakon toga su prebačene u špric.

Špric je postavljen u uređaj za elektrosponing i podešen je odgovarajući protok i napon struje. Elektrosponing je rađen pri naponu od 25000 V i pri protoku od 0,3 mL/h. Vlakna su nanošena na pokrovna stakla za mikroskop, koja su bila postavljena na kolektor tokom spinovanja.

Tabela 3: Komponente i njihove količine, dodate prilikom pravljenja rastvora za elektrosponing

<i>Polimer</i>	<i>m polimera (g)</i>	<i>Voda (μL)</i>	<i>4% PEG (μL)</i>	<i>DMSO (μL)</i>	<i>Triton X-100 (μL)</i>	<i>Ukupna zapremina (mL)</i>
<i>10 mol% dopamin-alginat</i>	0,14	3271,17	600	517,12	51,71	4,440
<i>20 mol% dopamin-alginat</i>	0,14	3271,17	600	517,12	51,71	4,440
<i>10 mol% dopamin-CMC</i>	0,14	1400	600	200	20	2,220

3.15.1. Ispiranje i umrežavanje nanovlakana

Pločica sa nanovlaknima je potopljena u 96 % etanol i ostavljena je 30-45 minuta, nakon čega je ostavljena da se osuši na vazduhu (5-10 minuta). Pločica sa nanovlaknima je prebačena u rastvor barijum-hlorida (2g BaCl₂ u 40 mL vode), u kome je stajala je oko 20 minuta. Ostavljena je da se osuši na vazduhu (par minuta) i nakon toga je pločica sa nanovlaknima prebačena u destilovanu vodu (15 minuta) i zatim sušena na vazduhu.

Nakon ispiranja nanovlakana od viška barijuma, ona su prebačena u rastvor NaIO₄ (0,14 g u 40 mL vode). Odmah nakon stavljanja u rastvor, došlo je do promene boje nanovlakana u narandžasto-crvenu. Pločica sa nanovlaknima je stajala 15 minuta u rastvoru perjodata i nakon toga je ostavljena da se osuši na vazduhu. Posle 2-3 minuta je osušeno nanovlakno gledano na mikroskopu.

3.16. Gajenje ćelija na nanovlaknima

Nakon umrežavanja nanovlakana barijumom i perjodatom, dobijena nanovlakna su prebačena u 6-well mikrotitar ploču i sterilisana pod UV svetlošću tokom 2 h. Nakon toga, dodato je 2 mL hranljivog DMEM medijuma (Dulbekov modifikovan "Eagle" medijum) u svaki bunarić, sa ciljem da se poboljša adhezija ćelija. Ploča je stavljena u inkubator na 24 h.

Nakon inkubacije, DMEM je aspiriran iz bunarića, a zatim su vlakna dva puta isprana PBS-om. Na ovako pripremljena vlakna je zasejana suspenzija ćelija (MRC-5), tako što je dodato po 2 mL ćelija u svaki bunarić (500.000 ćelija po bunariću). Kao kontrola su postojali bunarići bez nanovlakana sa zasejanim ćelijama. Ploča sa nanovlaknima i ćelijama je ostavljena tokom 24 h u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO₂.

3.16.1. Priprema nanovlakana sa ćelijama za skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM)

Uzorci su se fiksiraju 48 h u 2,5 % rastvoru glutaraldehida. Nakon isteka 48 h, uzorci se ispiraju sledećim rastvorima:

1. 3 % sirćetnom kiselinom, 15 minuta
2. 3 % sirćetnom kiselinom i 25 % etanolom u odnosu 1:1, 15 minuta
3. 3 % sirćetnom kiselinom i 50 % etanolom u odnosu 1:1, 15 minuta
4. 70 % etanolom, 15 minuta

Nakon ispiranja uzorci se čuvaju u 70% etanolu, na 4 °C, do snimanja na SEM-u.

3.16.2. Esej za određivanje citotoksičnosti (MTT esej)

Dobijena nanovlakna (dimenzija 0,6 cm x 0,6 cm) su prebačena u 6-well mikrotitar ploču i sterilisana pod UV svetlom tokom 2 h. Nakon toga je dodato po 100 µL DMEM-a u svaki bunarić, sa ciljem da se poboljša adhezija ćelija. Ploča je zatim stavljena u inkubator tokom 24 h.

Nakon završene inkubacije, DMEM je uklonjen iz bunarića i zasejana je suspenzija ćelija (MRC-5), tako što je dodato po 100 µL ćelija u svaki bunarić (10.000 ćelija po bunariću). Bunarići bez nanovlakana sa zasejanim ćelijama predstavljaju kontrolu.

Ploče sa zasejanim ćelijama su ostavljene u inkubatoru tokom 24 h i 72 h, na 37 °C i 5 % CO₂. Nakon 24 h/72 h, aspirirani su rastvori iz bunarića i dodato je po 125 µL rastvora 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid-a (MTT) u PBS-u, koncentracije 5 mg/mL. Inkubacija je rađena tokom 2-3 h na 37 °C i 5 % CO₂.

Nakon inkubacije, rastvor je aspiriran i dodato je po 150 µL DMSO-a. Inkubiranje u DMSO-u je trajalo 15-20 minuta u mraku. Apsorbanca je merena na 570 nm na mikrotitar-plate čitaču (ELISA Rayto 2100C), a dobijeni podaci su sređeni u GraphPad programu. Ćelijska vijabilnost se izražava procentualno kao procenat vijabilnosti ćelija, deljenjem apsorbanci uzoraka sa apsorbancom kontrolnih ćelija, pomnoženih sa 100. [228]

4. Rezultati i diskusija

4.1. Ekspresija lakaze na površini ćelija kvasca

Gen za lakazu iz *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 je sintetisan i kloniran u pET-22b(+) vektor od strane Genscript kompanije (Piscataway, USA), prema nukleotidnoj sekvenci koja je dostupna u nukleotidnoj bazi podataka (NCBI) pod rednim brojem HQ857207. Gen je upotrebom odgovarajućih prajmera za kloniranje lakaze u pCTCON2 vektor, umnožen i ukloniran u vektor od strane Selin i saradnika iz Ahena. [229]

Gen za lakazu iz *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, kompletna nukleotidna sekvenca:

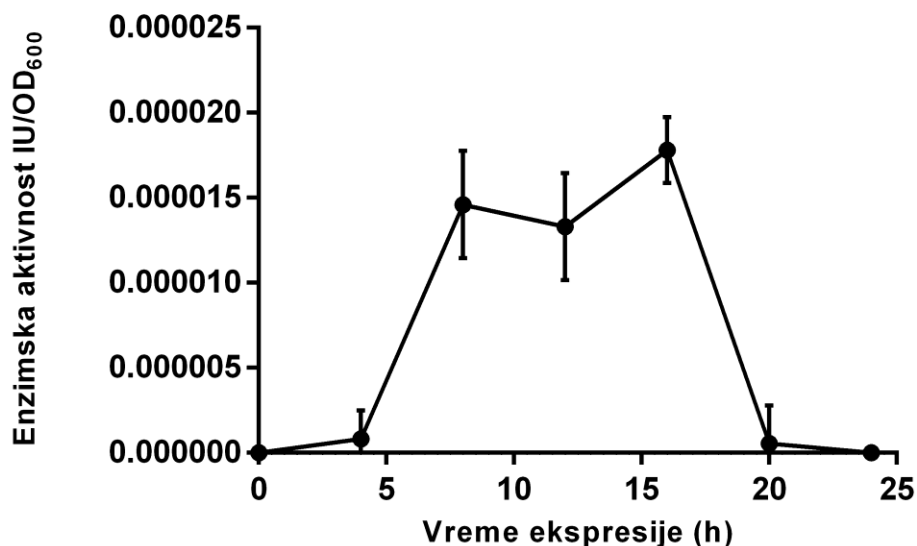
```
TTGACCGACATCATCGAGAGGCTCACGGACAGCGACGGGAAGCCGGAGGAGGAGCAGCTCGGCACCGGGC
AACTCAGCCGTACACGGCCCCACTGCCCGTCCCGCCCGTCTCGCCCGGCCCTCCGACGACGTCTTGCA
CGAGACCGAGATCGCCTTACGCCCGGCCTGGGTGCGCCTGCACCCGACGCTGCCGCCGACCCTGATGTGG
GGATACGACGGCCAGGTGCCGGGCCGACCATCGAGGTGCCGGCGGGACAGCGCGTCCGCATCGCCTGGA
CCAACCGCATTCCTCAAGGACAGCGAGTACCCGGTACCTCGGTGGAGGTGCCGCTGCGCACCCGACGGCCG
CCCGCAGTCCACCACCGAGCCCGGGCCGCGAGGGCGTTCGAGCCGAACAAGGACGTCGCCCGCGTGCCTGGC
TGGTCCGTCACCCATCTGCACGGCGCCAGACGGGGCGGGCAACGACGGCTGGGCGGACAACCGGGTCCG
GCTTCGGAGACGCCAGTCTCCGAGTACCCGAAGCACCACCAGGGCGTCCAGTGGTGGTACCACGACCA
CGCCATGAACATCACCCGGTGAACGTGATGACGGCCCTGTACGGCACCTACCTCGTCCGCGACGACGAG
GAGGACGCCCTCCATCTGCCGTGCGGGGAGCGGGAGATCCCGTGTCTCGCCGACCGCAACCTCGACA
CCGACGAGGACGGCCGGCTCAACGGACGGCTGTGCACAAGACGTGATCGTCCAGCAGCAGAACCCGGA
GACGGCAAGCCGCTCCATCCCGTTCAGCGGCCCGTACAACACGGTCAACGGCCGCATCTGGCCGTAC
GCCGACGTGGACGACGCCCTGGTACCCTTCCGGCTGGTCAACCGCTCCAACGGCGGGATCTACGACCTCG
TCCTGGTCGACGAGGACGACAACCCGGTCCCGGGCATCGTCCACCAGATCGGCAGCGACGGCGGGCTGTG
GCCGCGTCCCGTCCCGGTGACTTCGACGGCGCGCTGCCACCCTGACCGCGGCGCTGCCGAGCGCTTC
GATCTGCTCGTCTGACTTCCCGCGCCTCGCGGGCCGGCGGCTCCGCTGGTCAACAAGGGCCGCAACCAGC
CGCCGGGCGTCTCCGACCCGGCAGGTGACGTGCGCTATCCGGCGGTCATGGAGTTCGGGTCCGCGAGAG
CTGCGAGACGGACACCTTCGAACGCGCGAGGTGCTCTCCGGTCTTCCGCGCGCTCACGCACGACATC
GAGCACGGCCACCGGCTGATCGTCTCACCCCGCCGCCACCAAGGGCGGCGGGGTCACCCGGAGATCT
GGGAGATGACGGAGGTCCAGAACCCGGGCGACATCCAGGTCCCCACCGAGGGCGTTCATCCAGGTCACCGG
AGCTGACGGGAAGACCAAGACCTACCGGCGCACCCCGCGGACGTTCAACGACGGCTGGGCTTACCATC
CCGAGGGCAGCCACGAGAGTGGAGCTTCTCAACTCGCGCCGATCGTCCACCCCATGCACATCCACC
TGGCGGACTTCCAGTGTCTCGGCCGGGACGCCTACGACGTCTCCGGCTTCGACCCGGCGATCGGCGGCAC
CCGCAGCCCGATCCGCCACGACGCCGGCACCACGATCCCGTGGCGCCCAACGAGCTGGGCCACAAGGAC
GTCCTCCGGGTACCGGGGAACCAGATCCTGCGCGTCATGGGCAAGTTCGACGGTTCGTACGGCCGGTTCA
TGTACCACTGCCACCTCTCGAACACGAGGACATGGGCATGATGCGGCCCTTCGTGTCATGCCCCCGGA
GGCCCTGAAGTTCGACCACGGCGCCGGTACGGCGGCCACGACGGCCACGGGGCGGGCCACACGGGCTGA
```

Nakon uspešno kloniranog gena lakaze u pCTCON2 vektor, ovakav konstrukt je korišćen za transformaciju kompetentnih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY 100 soja, po opisanom protokolu u poglavlju 3.3.2. Dobijene pojedinačne kolonije transformisanih ćelija kvasca su korišćene za ekspresiju lakaze na površini ćelija kvasca, kao himernog proteina sa Aga2 proteinom. Lakaza je uspešno eksprimirana na površini ćelija kvasca i njena aktivnost je proveravana sa ABTS-om kao supstratom, kao što je objašnjeno u poglavlju 3.5.1. Indukcija ekspresije je vršena u prisustvu galaktoze i praćena je enzimaska aktivnost od početnog trenutka

indukcije do 24 h, da bi se utvrdilo optimalno vreme ekspresije, tj. kada dolazi do najvećeg stepena ekspresije i kada se uočava najveća enzimaska aktivnost. Kao što se može videti na Slici 24 najveća enzimaska aktivnost je dobijena nakon 16 h ekspresije, tako da je u svim sledećim ekspresijama lakaze ovo vreme korišćeno kao optimalno. Prilikom merenja enzimske aktivnosti, odvojene ćelije su ispirane 3 puta sa 0,1 M Na-acetatnim puferom pH 4,5, ne bi li se u potpunosti uklonio fermentacioni medijum. Tokom određivanja enzimske aktivnosti je dodavan bakar, za koji je utvrđeno da je neophodan za aktivaciju lakaze iz *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 izolovane iz *E. coli*. [229]

Da bismo proverili da li enzimaska aktivnost potiče od uspešno eksprimirane lakaze, uporedo su transformisane ćelije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY 100 sa praznim pCTCON2 vektorom. Nakon ekspresije proteina, pri istim uslovima kao kod ekspresije lakaze, proverena je enzimaska aktivnost dobijenih ćelija sa ABTS-om. Ćelije kvasca sa praznim vektorom nisu pokazivale enzimsku aktivnost.

Detektovana je aktivnost ćelija kvasca sa eksprimiranom lakazom na površini i ona je iznosila $0,01 \pm 0,001$ IU/g vlažne ćelijske biomase, dok ćelije koje su korišćene kao kontrolna proba, prethodno transformisane sa praznim pCTCON2 vektorom, nisu pokazivale enzimsku aktivnost.

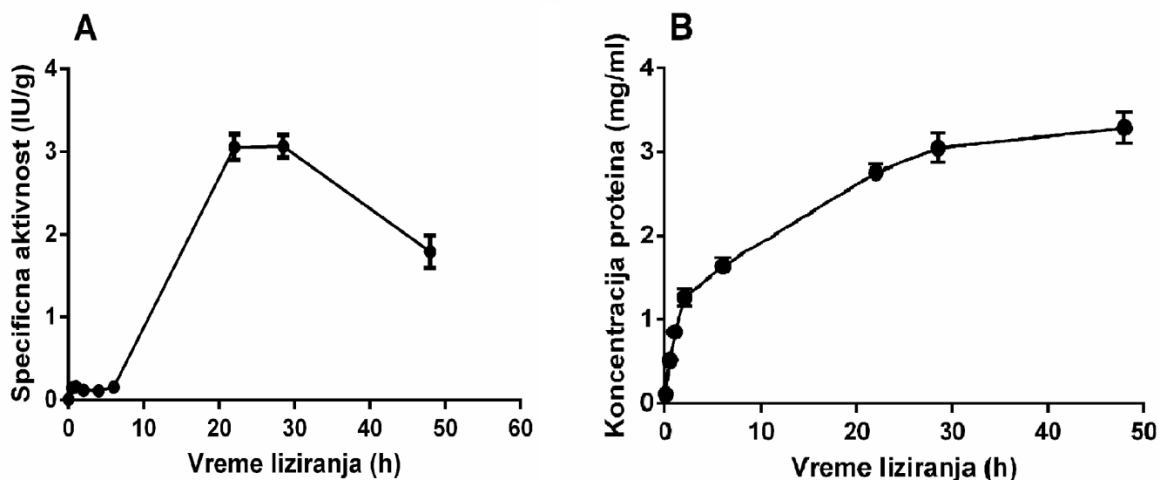


Slika 24: Ekspresija lakaze na površini ćelija kvasca praćena tokom vremena

Do sada je u samo nekoliko radova prijavljena proizvodnja lakaze u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. [230, 231] Prednost ekspresije lakaze na površini ćelija kvasca se pokazala u vidu poboljšane stabilnosti enzima [230], pa je tako lakaza na površini ćelija kvasca nakon 25 dana zadržala 90 % svoje aktivnosti, dok je slobodna lakaza nakon istog perioda zadržala 60 % svoje aktivnosti. Ovim rezultatima je pokazana veća stabilnost lakaze na površini ćelija kvasca, u odnosu na slobodnu lakazu, a samim tim i prednost njenog korišćena u procesima koji zahtevaju višekratnu upotrebu. [230] Lakaza iz *Streptomyces cyaneus* je eksprimirana u bakteriji *E. coli* [229], ali do sada nije eksprimirana na površini ćelija kvasca.

4.2. Ćelijska liza

U cilju povećanja enzimske aktivnosti lakaze zakačene za površinu ćelija kvasca, urađena je ćelijska liza organskim rastvaračem, kao po navedenom protokolu u poglavlju 3.6. Izvršeno je razaranje ćelijskog zida, pri čemu je došlo do ispuštanja unutrašnjem sadržaja ćelije. Pri ovom postupku su dobijeni ćelijski zidovi sa zakačenim enzimom. Liza je vršena u 3 % vodenom rastvoru toluena, na sobnoj temperaturi, sa stalnim mešanjem. Ćelijska liza je praćena tokom 48 h, ne bi li se odredilo optimalno vreme lize. Optimalno vreme lize je u ovom slučaju bilo ono vreme nakon kog su ćelijski zidovi sa lakazom imali najveću enzimsku aktivnost, a kada je dobijeni supernatant sa liziranim komponentama imao najveću koncentraciju proteina i minimalnu aktivnost lakaze. Utvrđeno je da je enzimsku aktivnost lakaze rasla od početka lize i dostigla maksimum između 20. i 30. časa, dok je koncentracija proteina u lizatu dostigla plato nakon 30 časova lize. Aktivnost lakaze u supernatantu se nije povećavala tokom liziranja, što bi dovelo do zaključka da je ostala zakačena za ćelijske zidove. Na osnovu praćenih parametara koji su prikazani na Slici 25, kao optimalno vreme lize je uzet 24. čas liziranja, kada su dobijeni ćelijski zidovi imali najveću enzimsku aktivnost, dok je lizat imao visoku koncentraciju proteina i nisku aktivnost lakaze.

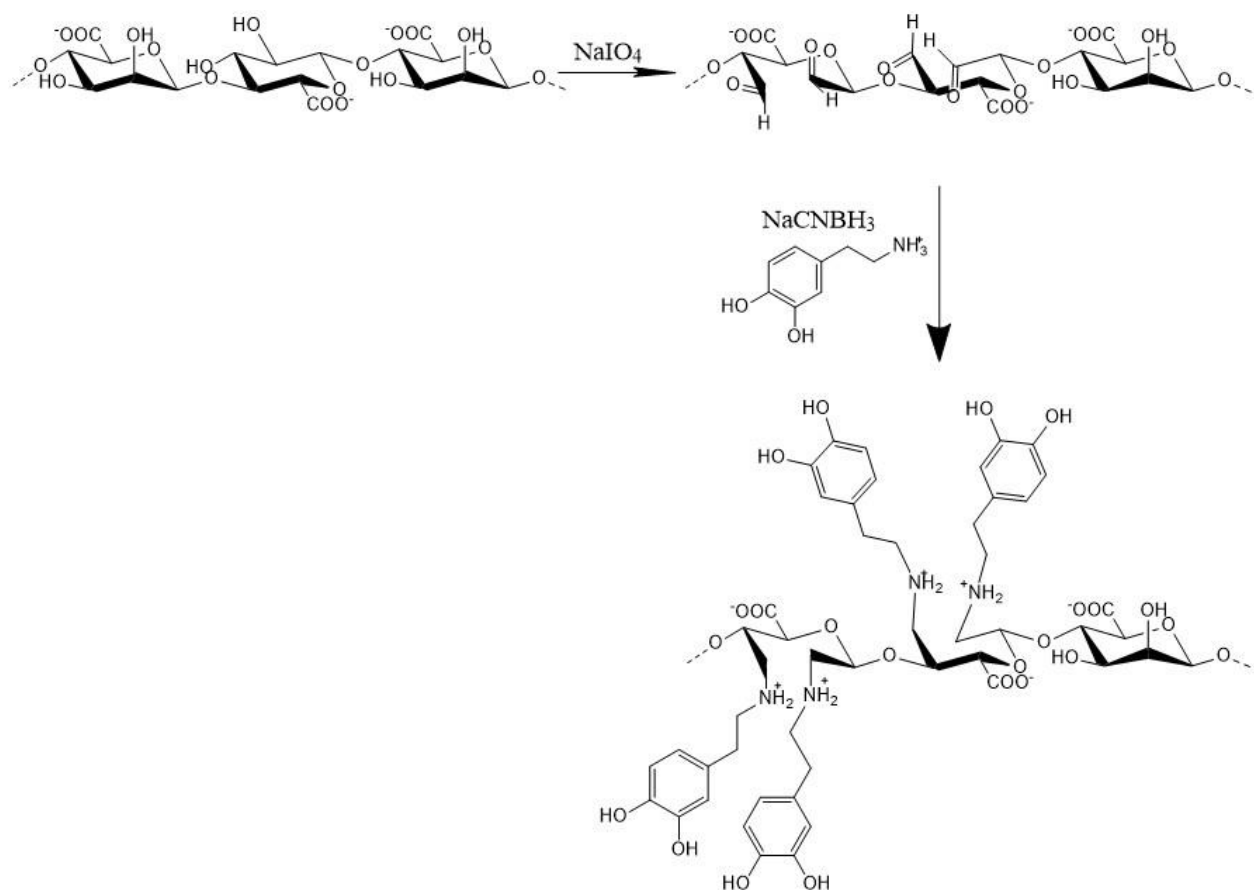


Slika 25: Optimizacija vremena liziranja ćelija praćenjem: A) specifične aktivnosti ćelijskih zidova, B) koncentracije proteina u lizatu, tokom 48 h ćelijske lize

Nakon izvršene ćelijske lize, specifična enzimski aktivnost je porasla sa $0,010 \pm 0,001$ IU/g, koliko je iznosila za ćelije, na $3,1 \pm 0,2$ IU/g za ćelijske zidove, tačnije porasla je 310 puta. Ovaj porast specifične enzimski aktivnosti bi mogao da se objasni smanjenjem mase ćelijskih zidova, u odnosu na cele ćelije kvasca.

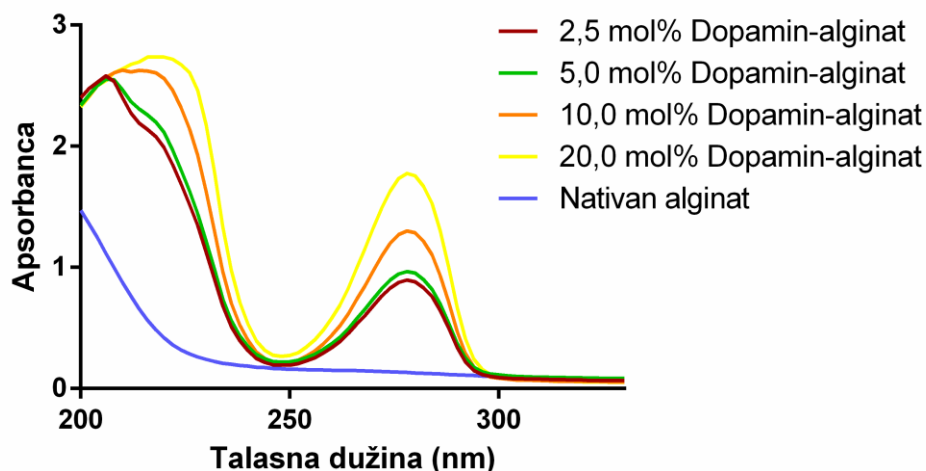
4.3. Sintaza i karakterizacija dopamin-alginata

U cilju modifikacije alginata dopaminom, alginat je u prvom koraku oksidovan reakcijom perjodatne oksidacije sa različitim molarnim odnosima perjodata i alginata: 2,5, 5,0, 10,0 i 20,0 mol%. Formirane aldehidne grupe su dalje reduktivno aminovane u prisustvu dopamina i natrijum-cijanoborhidrida. U strukturu alginata je uvedena nova funkcionalna grupa, dopaminska, preko novoformirane sekundarne amino grupe. (Šema 1)



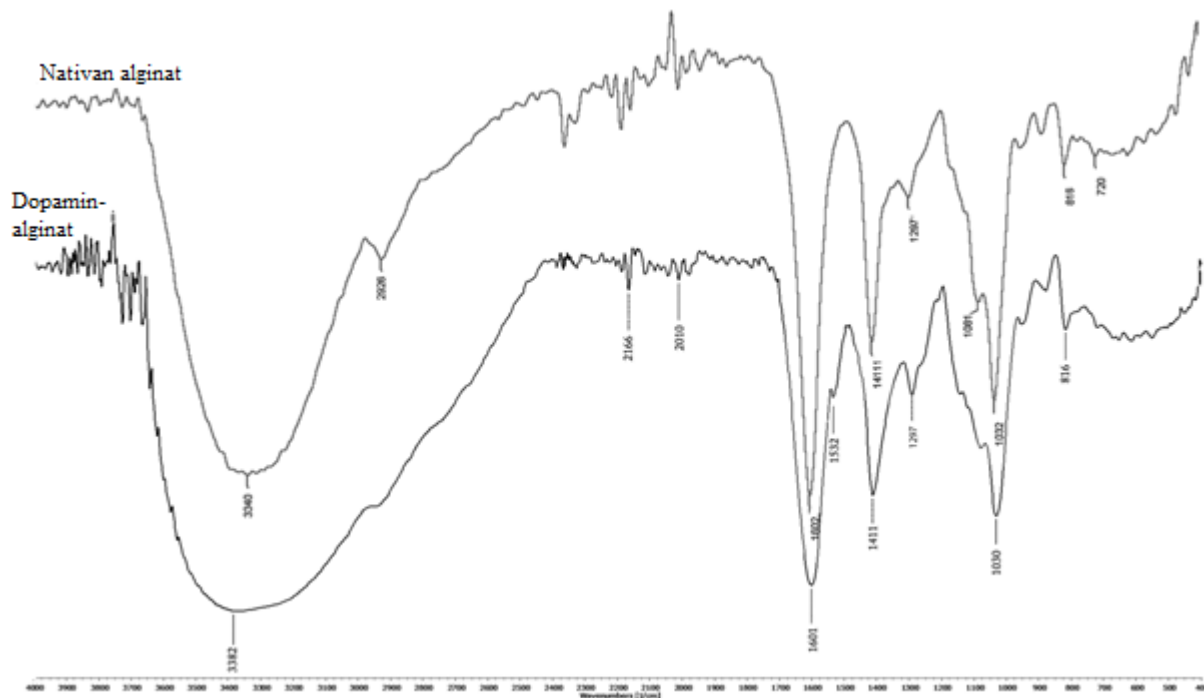
Šema 1: Reakcija perjodatne oksidacije alginata i reduktivne aminacije oksidovanog alginata u prisustvu natrijum-cijanoborhidrida i dopamina

Dobijeni derivati alginata su okarakterisani UV-Vis spektroskopijom i snimanjem FTIR i ^1H NMR spektara. Snimanjem UV-Vis spektara u opsegu talasnih dužina od 200 do 350 nm, uočena je pojava apsorpcionog maksimuma na talasnoj dužini od 280 nm kod dopamin-alginatnih derivata. S obzirom da dopamin apsorbuje na ovoj talasnoj dužini, kao i da nativan alginat nema apsorpcioni pik na ovoj talasnoj dužini, utvrđeno je da je dopamin uspešno vezan za alginat. Sa prikazanih UV-Vis spektara na Slici 26 se takođe može uočiti da apsorpcioni pik na 280 nm raste sa povećanjem stepena modifikacije dopamin-pektina. Ovo se može objasniti tim da sa povećanjem koncentracije oksidacionog reagensa dolazi do povećanog stepena oksidacije alginata, a samim tim postoji veći broj novostvorenih aldehidnih grupa na koje se potencijalno može uvesti veći broj novih funkcionalnih grupa.



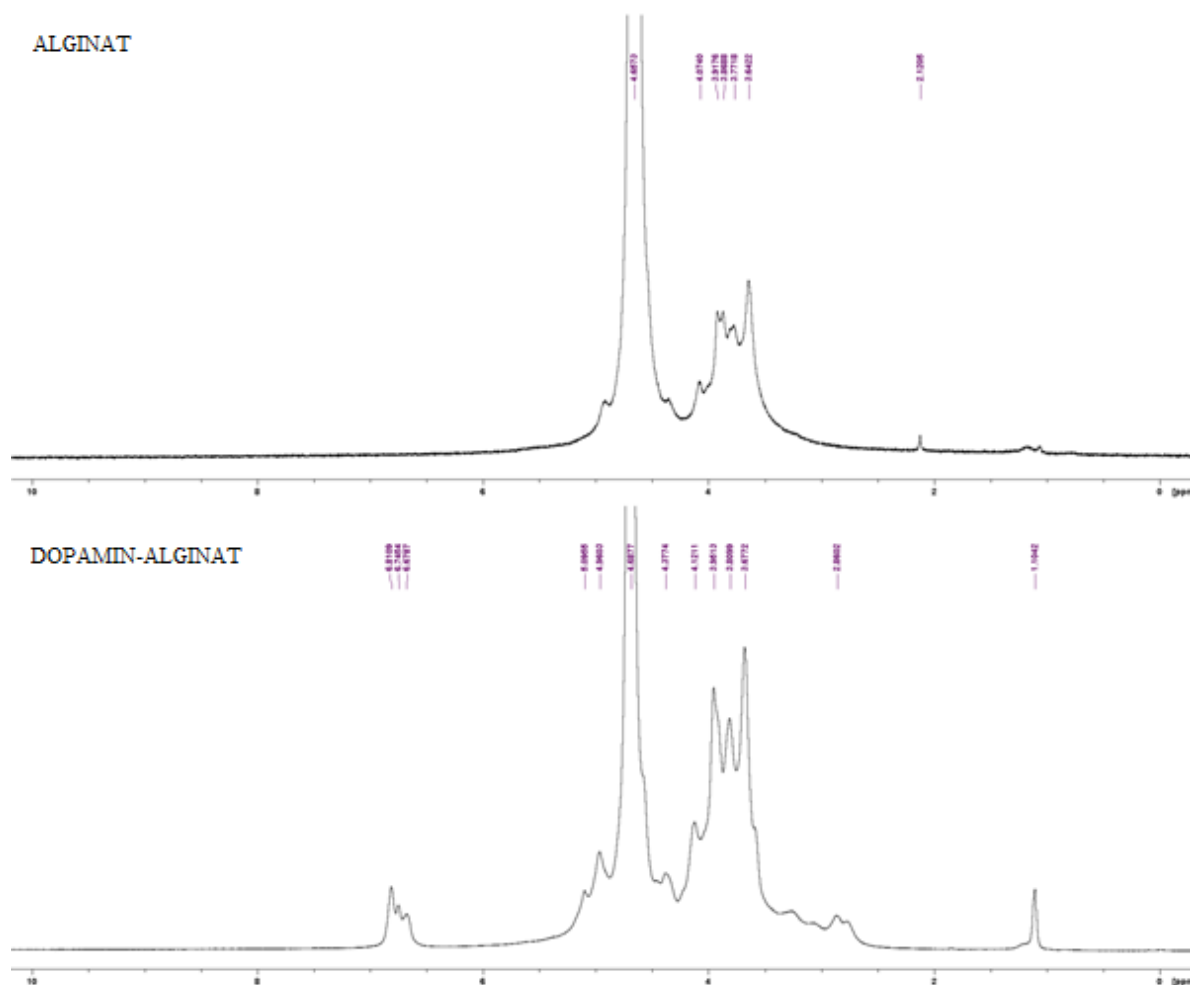
Slika 26: UV-Vis spektar nativnog alginata i modifikovanih dopamin-alginata sa različitim stepenom modifikacije (2,5, 5,0, 10,0, 20, 0 mol%)

Snimani su FTIR spektri nativnog alginata i dopamin-alginata. Na FTIR spektrima modifikovanog alginata se vidi prisustvo aromatičnih prstenova, usled postojanja pika na 1532 cm^{-1} , koji potiče od C-C istežućih (“stretching”) vibracija u prstenu [232], dok kod nativnog alginata nema pomenutog pika. (Slika 27)



Slika 27: FTIR spektar nativnog alginata i dopamin-alginata

U cilju dokazivanja uspešnosti modifikacije alginata dopaminom, snimljeni su i ^1H NMR spektri nativnog i modifikovanog alginata. Snimljeni spektri su takođe dokazali uspešnost modifikacije, usled prisustva pikova od tri aromatična vodonikova atoma na 6,65, 6,75 i 6,85 ppm koja potiču od strukture dopamina, koji su prisutni na spektru dopamin-alginata, a nema ih na spektru nativnog alginata. (Slika 28)



Slika 28: ^1H NMR spektri nativnog alginata i dopamin-alginata

Nakon spektralne karakterizacije dobijenih derivata alginata, može da se potvrdi uspešnost modifikacije alginata dopaminom. Nakon ove modifikacije, i dalje su sačuvane karboksilne grupe, a uvedena je fenolna i amino grupa, što predstavlja novi princip modifikacije u odnosu na prethodno prijavljene karbodiimidne metode modifikacije. [233-235] Kao i kod modifikovanog pektina, prisustvo pozitivnih i negativnih grupa u lancu alginata, kao i povećan broj naelektrisanih

grupa, dovodi do bolje sposobnosti adsorpcije drugih molekula, što je veoma bitno za imobilizaciju, tkivni inženjering i dostavu lekova.

4.4. Imobilizacija ćelijskih zidova u alginatnim i dopamin-alginatnim kuglicama

Da bi se ćelijski zidovi sa enzimom mogli koristiti u bač sistema, urađena je njihova imobilizacija u alginatnim kuglicama metodom zarobljavanja enzima, koristeći jone kalcijuma kao umreživač. Novosintetisan dopamin-alginat je takođe korišćen kao imobilizacioni matriks i poređen je sa nativnim alginatom. Pored jonskog umrežavanja, kod dopamin-alginata je očekivano i dodatno, kovalentno umrežavanje dopamina u prisustvu lakaze, što predstavlja glavnu prednost korišćenja modifikovanog alginata u odnosu na nativan. Ukapavanjem smeše alginata/dopamin-alginata i ćelijskih zidova u rastvor kalcijum-hlorida su dobijene sferne kuglice, pravilnog oblika.

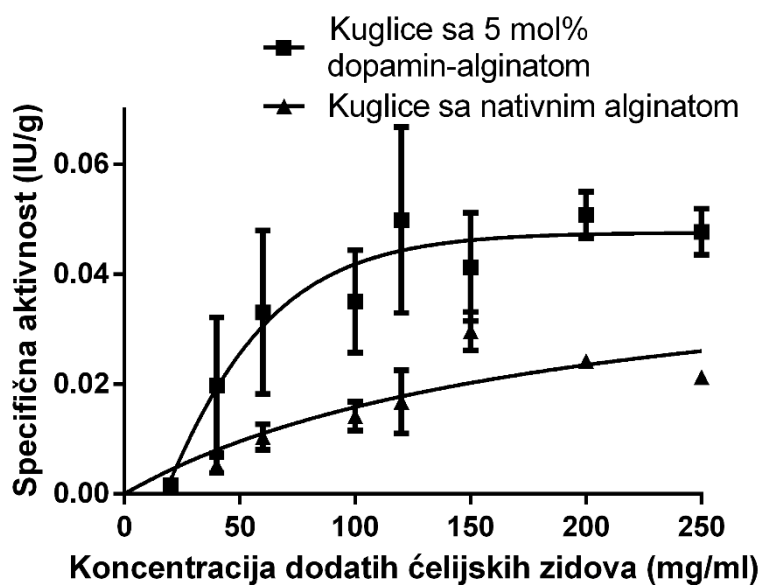
4.4.1. Optimizacija imobilizacije ćelijskih zidova u alginatnim i dopamin-alginatnim kuglicama

Od dobijenih dopamin-alginatnih modifikata različitog stepena modifikacije, za imobilizaciju je korišćen 5 mol% dopamin-alginat. Modifikati sa većim stepenom modifikacije su pokazali mnogo manju viskoznost, usled smanjene molekulske mase i raskidanja veza tokom perjodatne oksidacije, pa samim tim nisu mogli da daju mehanički stabilne, sferne kuglice. 2,5 mol% dopamin-alginat takođe nije izabran za ovu primenu, jer se usled manjeg stepena modifikacije očekuje i manji stepen umreženja. Dobijene kuglice dopamin-alginata su imale braon boju, karakterističnu za oksidovan dopamin, što kod nativnog alginata nije bio slučaj, već su dobijane kuglice bele boje.

Da bi dobili kuglice sa najboljim mehaničkim karakteristikama, ali i najboljim parametrima imobilizacije kao što su specifična aktivnost i prinos imobilizacije, varirana je koncentracija dodatih ćelijskih zidova. Kao što se može videti na Slici 29, dodatkom 150 mg/mL ćelijskih zidova je dostignuta maksimalna specifična aktivnost, koja je ostala približno ista nakon dodatka veće koncentracije ćelijskih zidova. Iz ovog je uočeno da maksimalna količina ćelijskih zidova koja može biti imobilizovana, nakon koje nema porasta specifične aktivnosti, iznosi 150 mg/mL, tako da je ona uzeta kao optimalna za dalje imobilizacije.

Na Slici 29 takođe može da se uoči da ćelijski zidovi sa lakazom imobilizovani u dopamin-alginatu, imaju 2 puta veću specifičnu aktivnost u odnosu na one imobilizovane u nativnom alginatu. Ovo može da se objasni uticajem dodatnog umreženja subjedinića dopamin-alginata, usled oksidacije dopamina i njegovog umreženja. Samim tim, bolja poroznost dopamin-alginatnih kuglica predstavlja prednost u odnosu na kuglice nativnog alginata.

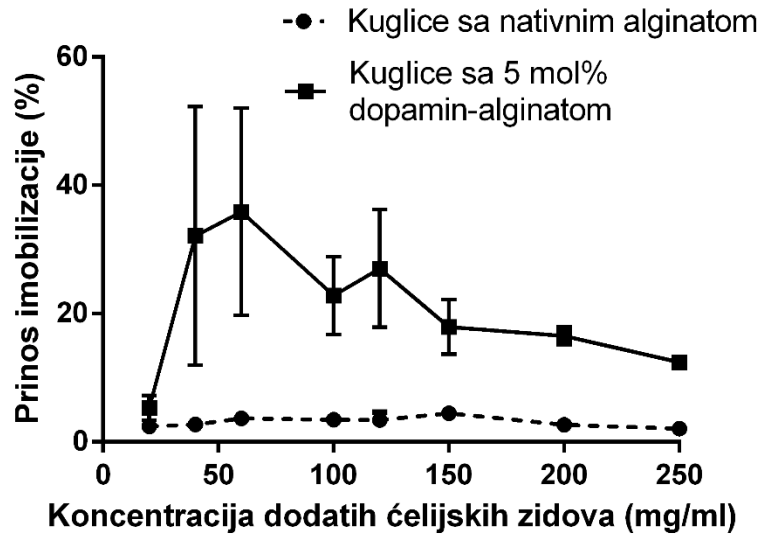
U prethodno objavljenim rezultatima, rađene su imobilizacije prečišćenog enzima u nativnom alginatu, pri čemu su utvrđeni kao optimalni uslovi korišćenje 2 % rastvora (w/v) alginata i 0,05 M CuSO_4 , kao jonskog umreživača. [236] U drugoj studiji su utvrdili kao optimalne uslove korišćenje 2 % (w/v) alginata, 2 % (w/v) CaCl_2 , uz mešanje enzima i alginata u odnosu 1:4, sa efikasnošću imobilizacije od $88,1 \pm 2,4$ % za protein i $93,3 \pm 1,1$ % za enzime. [203] U našem istraživanju imobilizacije ćelijskih zidova sa zakačenim enzimom, efikasnost imobilizacije je iznosila 100 %, pošto nije detektovana enzimaska aktivnost u ispicima nakon imobilizacije. Iz dobijenih rezultata zaključujemo da nije došlo do curenja enzima iz dopamin-alginatne kuglice, verovatno usled toga što je enzim već bio kovalentno vezan za ćelijske zidove.



Slika 29: Optimizacija imobilizacije ćelijskih zidova sa lakazom u alginatnim i dopamin-alginatnim kuglicama, uz variranje koncentracije dodatih ćelijskih zidova sa lakazom, prikazana kroz zavisnost specifične aktivnosti lakaze u odnosu na koncentraciju dodatih ćelijskih zidova

4.4.2. Prinos imobilizacije

Variranjem koncentracije dodatih ćelijskih zidova je takođe praćen uticaj na prinos imobilizacije. Prinos imobilizacije je određen za imobilizaciju u nativnom alginatu i dopamin-alginatu, uzimajući u obzir da je prinos imobilizacije definisan kao odnos specifične aktivnosti imobilizovanog enzima i ukupne količine dodatog enzima tokom imobilizacije. Kao što se vidi sa Slike 30, povećanjem koncentracije ćelijskih zidova sa lakazom (više od 50 mg/mL), dolazi do smanjenja prinosa imobilizacije, što može biti objašnjeno povećanim difuzionim ograničenjima unutar kuglica, kao i potencijalnim prekoračenjem kapaciteta imobilizacije kuglica. Ako se sa iste slike uporede prinosi imobilizacije, vidi se znatno povećanje prinosa imobilizacije u modifikovanom alginatu u odnosu na nativan alginat. Prinos se povećao od 2,5 do 16 puta, u zavisnosti od dodate koncentracije ćelijskih zidova sa enzimom. Ovi rezultati mogu biti objašnjeni boljom poroznošću umreženog dopamin-alginata, usled smanjene molekulske mase reakcijom perjodatne oksidacije. Još jedan razlog može da bude i bolje “bubrenje” alginata usled uvedenih pozitivno naelektrisanih, amino grupa. Prisustvo novih, naelektrisanih grupa i aromatičnih prstenova može da dovede do boljeg zadržavanja imobilizovanog enzima unutar kuglice, kao i povećane lokalne koncentracije supstrata, usled interakcija između dopamina u modifikovanom alginatu. Svi navedeni faktori mogu da dovedu do veće koncentracije enzima i supstrata unutar kuglica, kao i do smanjenih difuzionih ograničenja, koja se često javljaju kod imobilizovanih enzima u alginatu.



Slika 30: Zavisnost prinosa imobilizacije od koncentracije dodatih ćelijskih zidova sa lakazom prilikom imobilizacije u nativnom alginatu i dopamin-alginatu

Nakon sagledavanja navedenih parametara imobilizacije, uslovi koji su uzeti kao optimalni za sve naredne imobilizacije su sledeći: smeša alginata/dopamin-alginata (u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5 sa 2 mM CuCl_2) i ćelijskih zidova sa lakazom, u finalnim koncentracijama od 2,7% i 150 mg/mL, navedenim redom, je ukapavana u 2 % CaCl_2 . Pripremljene kuglice su bile mehanički stabilne i dalje su korišćene za eksperimente.

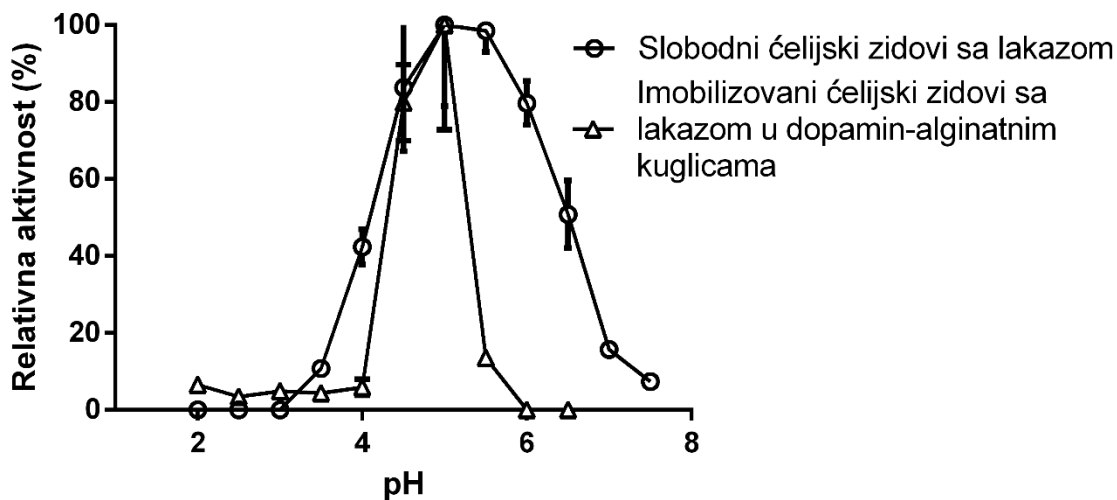
Pored alginatnih i dopamin-alginatnih kuglica sa ćelijskim zidovima sa lakazom, pripremljene su kuglice od istih materijala u koje su imobilizovani ćelijski zidovi bez lakaze (dobijeni liziranjem ćelija koje su transformisane sa praznim pCTCON2 vektorom). Ovako pripremljene kuglice su korišćene prilikom dekolizacije boja, kao kontrola.

4.5. Karakterizacija slobodnih i imobilizovanih ćelijskih zidova

Nakon što se u prethodnim eksperimentima pokazalo da imobilizovani ćelijski zidovi sa lakazom u dopamin-alginatnim kuglicama imaju veću enzimsku aktivnost u odnosu na one imobilizovane u alginatnim kuglicama, u sledećim eksperimentima su samo dopamin-alginatne kuglice korišćene. Okarakterisani su slobodni i imobilizovani ćelijski zidovi sa lakazom. Ispitan je uticaj pH i temperature na njihovu enzimsku aktivnost, a takođe su im određeni i kinetički parametri.

4.5.1. Određivanje pH optimuma

Da bi se odredio optimalan pH za slobodne i imobilizovane ćelijske zidove, enzimaska aktivnost je određivana u pH opsegu od 2,0 do 7,5 u različitim puferima. Rezultati pokazuju da je optimalan pH i za slobodne i imobilizovane ćelijske zidove pH 5. (Slika 31)



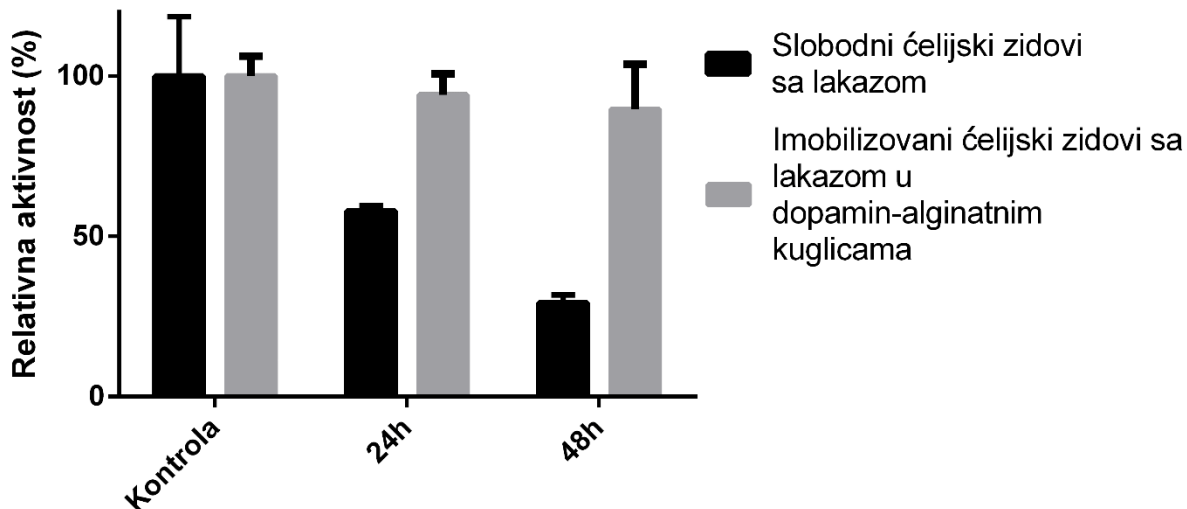
Slika 31: Uticaj pH vrednosti na aktivnost slobodnih i imobilizovanih ćelijskih zidova sa lakazom

Optimalna pH sredina za imobilizovane enzime u alginatu je često blago pomerenka ka kiselom regionu u odnosu na slobodan enzim, zbog prisustva negativnih naelektrisanja u njegovoj strukturi. [237] Međutim, kod predstavljene imobilizacije nije došlo do značajne promene u pH optimumu za imobilizovan enzim, pretpostavlja se jer dopamin-alginat pored negativnog naelektrisanja sadrži i pozitivno naelektrisanje u svojoj strukturi.

4.5.2. Određivanje pH stabilnosti

Određena je enzimaska stabilnost slobodnih i imobilizovanih ćelijskih zidova sa lakazom, u puferu u kome je optimalna enzimaska aktivnost. U prethodnom eksperimentu je određeno da je to 0,1 M natrijum-acetatni pufer pH 5. pH stabilnost je određena merenjem enzimaska aktivnost nakon inkubacije slobodnih i imobilizovanih ćelijskih zidova u optimalnom puferu tokom 24 h i 48 h, na sobnoj temperaturi. Kao što se može videti na Slici 32, imobilizovani ćelijski zidovi sa lakazom su pokazali veću stabilnost u odnosu na slobodne. Povećana pH stabilnost imobilizovanih enzima se objašnjava vezivanjem enzima za imobilizacioni materijal, što smanjuje šansu da prilikom

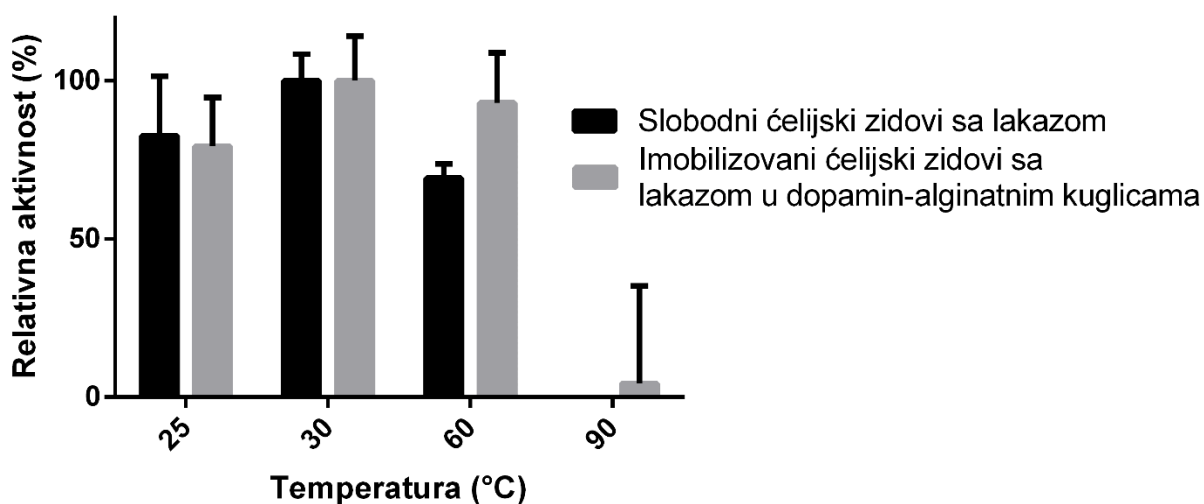
promene pH dođe do konformacione promene enzima, koja bi dovela do gubitka aktivnosti istog. [15]



Slika 32 : pH stabilnost slobodnih i imobilizovanih ćelijskih zidova sa lakazom, u optimalnom puferu (0,1 M natrijum-acetatni, pH 5)

4.5.3. Određivanje temperaturne stabilnosti

Temperaturna stabilnost imobilizovanih i slobodnih ćelijskih zidova sa enzimom je određena merenjem enzimske aktivnosti kuglica i ćelijskih zidova nakon 1 sata inkubacije na temperaturama od 25, 30, 60 i 90 °C, na optimalnom pH. Enzimska aktivnost je predstavljena kao relativna aktivnost, koristeći kao supstrat ABTS. Na Slici 33 je predstavljena zavisnost relativne aktivnosti u odnosu na temperaturnu inkubaciju na različitim temperaturama.



Slika 33 : Temperaturna stabilnost slobodnih i imobilizovanih ćelijskih zidova sa lakazom prikazana kao relativna aktivnost dobijena nakon 1 h inkubacije na 25, 30, 60 i 90 °C

Na temperaturi od 30 stepeni, slobodni i imobilizovani ćelijski zidovi sa lakazom su zadržali svoju maksimalnu enzimsku aktivnost. (Slika 33) Sa povećanjem temperature, došlo je do značajnijeg pada aktivnosti slobodne lakaze u odnosu na imobilizovanu, pa su tako na temperaturi od 60 °C, slobodni ćelijski zidovi sa lakazom zadržali 69 % svoje početne aktivnost, dok su imobilizovani zadržali čak 93 %. Do sada je u raznim studijama dokazano da se imobilizacijom lakaze postiže povećanje temperaturne stabilnosti, u odnosu na slobodan enzim. [15, 203, 238] Ovo se objašnjava tim da se imobilizacijom enzima onemogućava njegovo kretanje usled povećane temperature i kinetičke energije, pa se smanjuje mogućnost konformacionih promena enzima koje dovode do gubitka enzimske aktivnosti.

4.5.4. Određivanje kinetičkih parametara

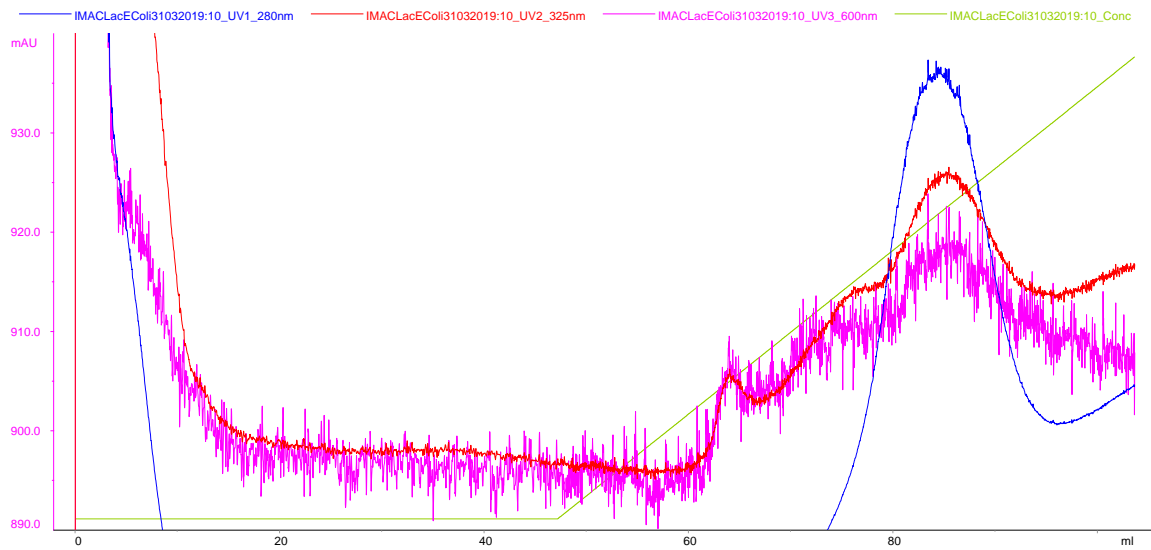
Kinetički parametri su određeni za slobodne i imobilizovane ćelijske zidove, koristeći ABTS kao supstrat, na sobnoj temperaturi. Enzimska aktivnost je merena po protokolu opisanom u poglavlju 3.5.1. Michaelis-Menten-ova konstanta (K_m) je iznosila 0,0125 mM za slobodne ćelijske zidove, dok je za imobilizovane iznosila 8,36 mM. Izračunata maksimalna brzina (V_{max}) je za slobodne ćelijske zidove sa lakazom iznosila 0,661 $\mu\text{mol}/\text{min}$, a za imobilizovane 0,0340 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Dobijena niža vrednost K_m za imobilizovan enzim je uzrokovana difuzionim ograničenjima usled imobilizacije, što je u skladu sa prethodnim studijama, gde je takođe dolazilo

do pada K_m vrednosti usled imobilizacije lakaze u Ca-alginatne kuglice, i samim tim smanjenog afiniteta lakaze za supstratom. [238, 239]

4.6. Proizvodnja lakaze u *Escherichia coli* BL21 soju, izolovanje i prečišćavanje

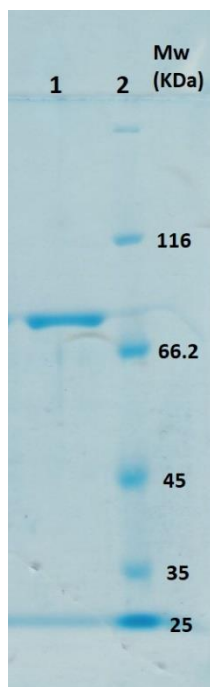
Nakon uspešnog kloniranja lakaze od strane Selin i saradnika, urađena je transformacija *E. coli*. Na osnovu njihovih optimizovanih uslova je postavljena fermentacija i urađena ekspresija proteina. Bakterija *E. coli* je jedna od najkorišćenijih za heterolognu ekspresiju proteina, jer pored toga što je jednostavna za gajenje, iz ovog organizma može da se dobije velika količina lakaze, kao što su pokazali u prethodnoj studiji. [229]

Nakon ekspresije proteina, dobijene ćelije su odvojene centrifugiranjem, a nakon toga ultrazvučno lizirane, kao što je opisano u poglavlju 3.3.4. Dobijeni supernatant je dodatno proceđen i nakon toga koncentrovan ultrafiltracijom, a samim tim je izvršen i prvi korak u prečišćavanju eksprimirane lakaze. Nakon toga je rađena afinitetna hromatografija, pošto je tokom kloniranja dodat His_6 tag na C-terminus, lakaza je mogla da se prečisti na afinitetnoj koloni (IMAC). Praćena je apsorbancu na tri talasne dužine: 280, 325 i 600 nm. Kao što se može videti na Slici 34, određen broj uzoraka je apsorbovao na tim talasnim dužinama i u njima je proveravana enzimska aktivnost lakaze.



Slika 34 : Prikaz hromatograma za lakazu eksprimiranu u *E. coli*, *BL21* soju, nakon afinitetne hromatografije

Nakona afinitetne hromatografije, uzorci koji su pokazali lakaznu aktivnost su analizirani SDS-PAGE analizom. Na elektroforezi se može uočiti jedna traka na molekularnoj masi od oko 70 kDa, što je veoma približno predviđenoj molekularnoj masi od 69,5 kDa. (Slika 35)

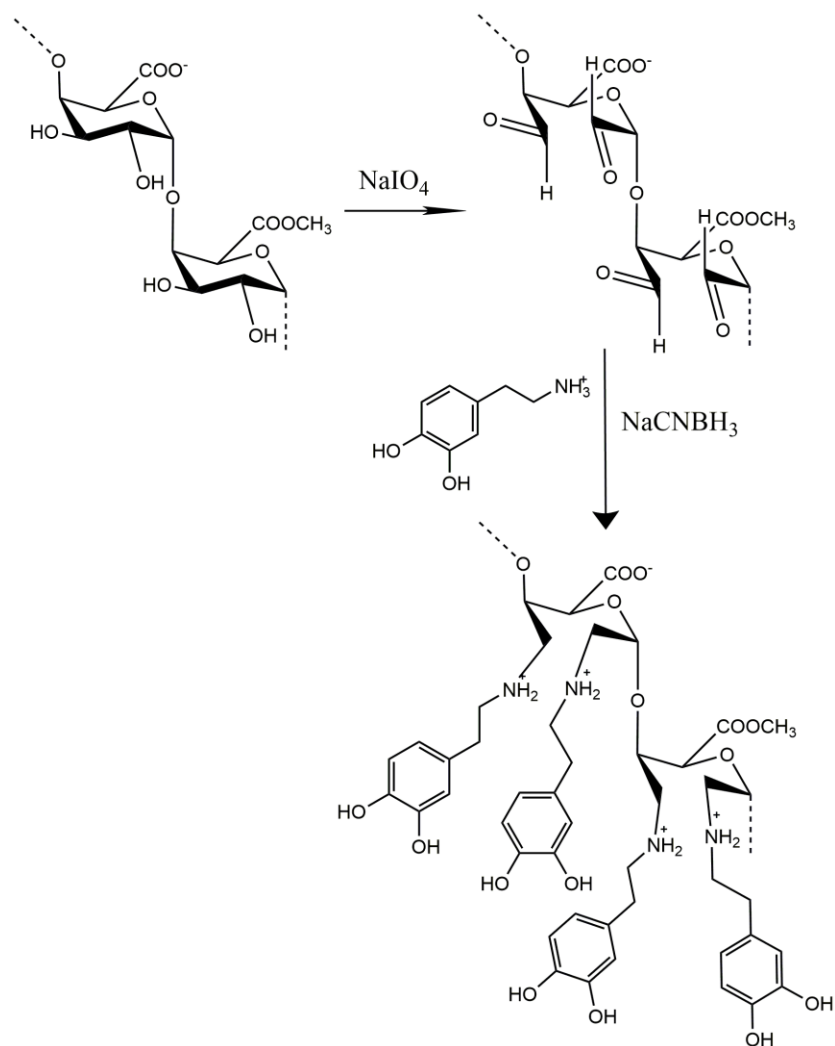


Slika 35: SDS PAGE hromatogram prečišćene lakaze iz *E. coli*: (1.) Lakaza nakon prečišćavanja na IMAC-u (2.) Proteinski marker različitih molekulskih masa

Nakon što je potvrđeno da je lakaza uspješno izolovana i prečišćena, proverena je njena enzimska aktivnost sa ABTS-om kao supstratom, u prisustvu bakra. Prethodno su Selin i saradnici pokazali da lakaza iz ovog izvora zahteva prisustvo bakra za aktivaciju enzima [229], i dobili enzimsku aktivnost izolovane lakaze od $2,9400 \pm 0,1700$ IU/mg. U našem radu je izolovana i prečišćena lakaza sa istim supstratom imala aktivnost od $7,90 \pm 0,62$ IU/mg, što ukazuje na 2,7 puta veću aktivnost u odnosu na prethodnu studiju i na bolje rezultate ekspresije i prečišćavanja.

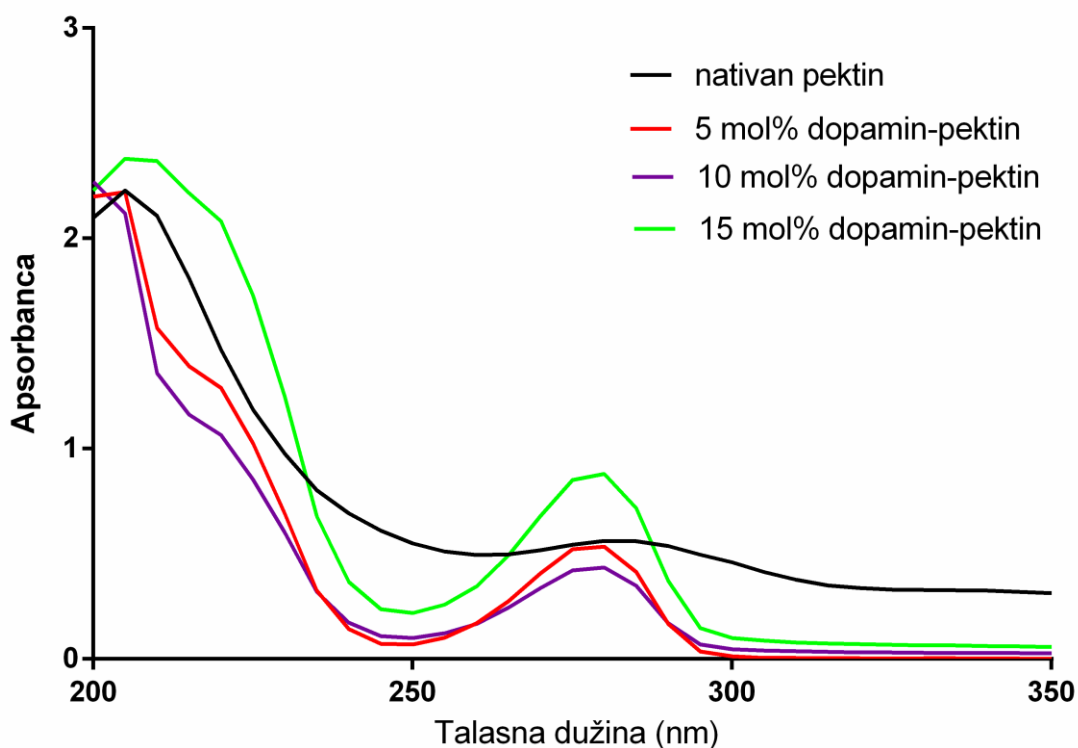
4.7. Sinteza i karakterizacija dopamin-pektina

Pektin je prvobitno modifikovan u reakciji perjodatne oksidacije, a nakon toga je izvršena reduktivna aminacija u prisustvu dopamin-hidrohlorida i cijanoborhidrida. Perjodatna oksidacija je izvršena pri različitim molarnim odnosima natrijum-perjodata i ponavljajuće glikozidne jedinice: 5, 10 i 15 mol%, tako da su finalno dobijeni oksidovani pektini različitog stepena oksidacije. Formirane aldehidne grupe su dalje reagovala u reakciji reduktivne aminacije, dajući sekundarne amino grupe sa dopaminom. Izvršene reakcije su prikazane na Šemi 2.



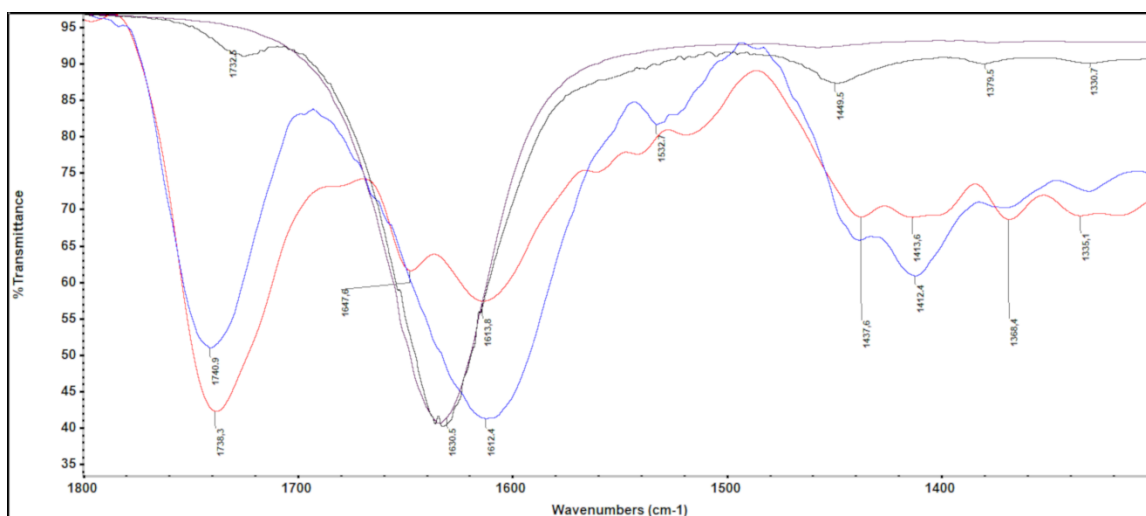
Šema 2: Reakcija sinteze dopamin-alginata u reakcijama perjodatne oksidacije i reduktivne aminacije

Hemijski sintetisani dopamin-pektini su okarakterisani UV-Vis spektroskopijom, kao i snimanjem FTIR i ^1H NMR spektara. Snimanjem UV-Vis spektara modifikovanog pektina u opsegu talasnih dužina od 200 do 350 nm, uočeno je postojanje apsorpcionog pika na talasnoj dužini od 280 nm, koji potiče od fenolne grupe vezanog dopamina. (Slika 36) Snimanjem UV-Vis spektra nativnog pektina, nije uočen apsorpcioni maksimum na 280 nm, usled odsustva hromofore koja bi mogla da apsorbuje na toj talasnoj dužini. Na Slici 36 se takođe vidi da sa porastom količine dodatog perjodata dolazi do povećanog stepena oksidacije pektina, a samim tim i do povećanog broja vezanih dopaminskih grupa za postojeće aldehidne grupe pektina, što se odražava povećanjem apsorbance na 280 nm.



Slika 36: UV-Vis spektri nativnog i modifikovanih dopamin-pektina

Snimanjem FT-IR spektara nativnog i modifikovanog pektina je dodatno okarakterisan sintetisan polimer i potvrđena je uspešnost modifikacije.



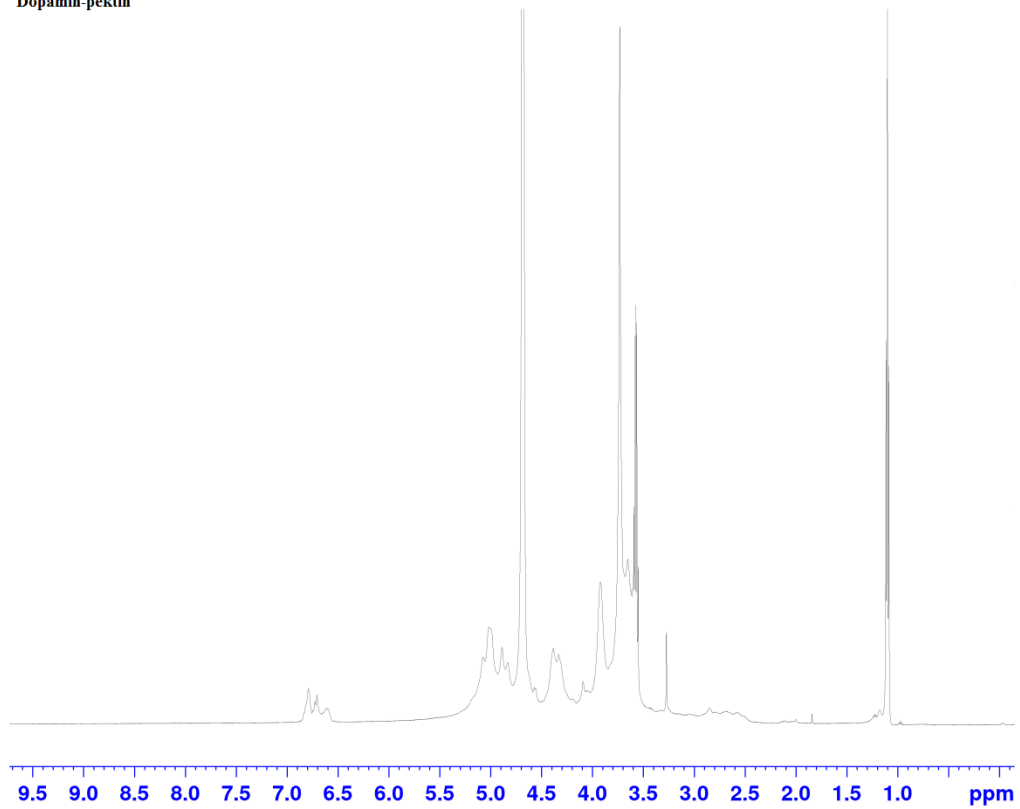
Slika 37: FT-IR spektri nativnog pektina (crveno obeležen), 15 mol% dopamin-pektina (plavo obeležen), 15 mol% dopamin-pektina odmah nakon enkapsulacije lakaze (crno obeležen) i 48 sati nakon enkapsulacije lakaze (ljubičasto obeležen) u regionu od 1800 do 1300 cm^{-1}

FT-IR spektri nativnog pektina, 15 mol% dopamin-pektina, 15 mol% dopamin-pektina odmah nakon enkapsulacije lakaze i 48 sati nakon enkapsulacije lakaze su prikazani na Slici 37. Najznačajnije promene se mogu videti u regionu između 1800 i 1550 cm^{-1} , koje mogu da potiču od C = O “stretching” vibracija estara ($\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$) i slobodne hidroksilne grupe ($\sim 1612 \text{ cm}^{-1}$). Modifikacijom pektina je došlo do povećanog sadržaja slobodnih karboksilnih grupa sa $41,2 \pm 1,8$ % na $73,4 \pm 1,2$ %. Ovo se može objasniti potencijalnom hidrolizom estarskih veza ili spontanom oksidacijom aldehidnih grupa do karboksilnih grupa na poziciji C-3.

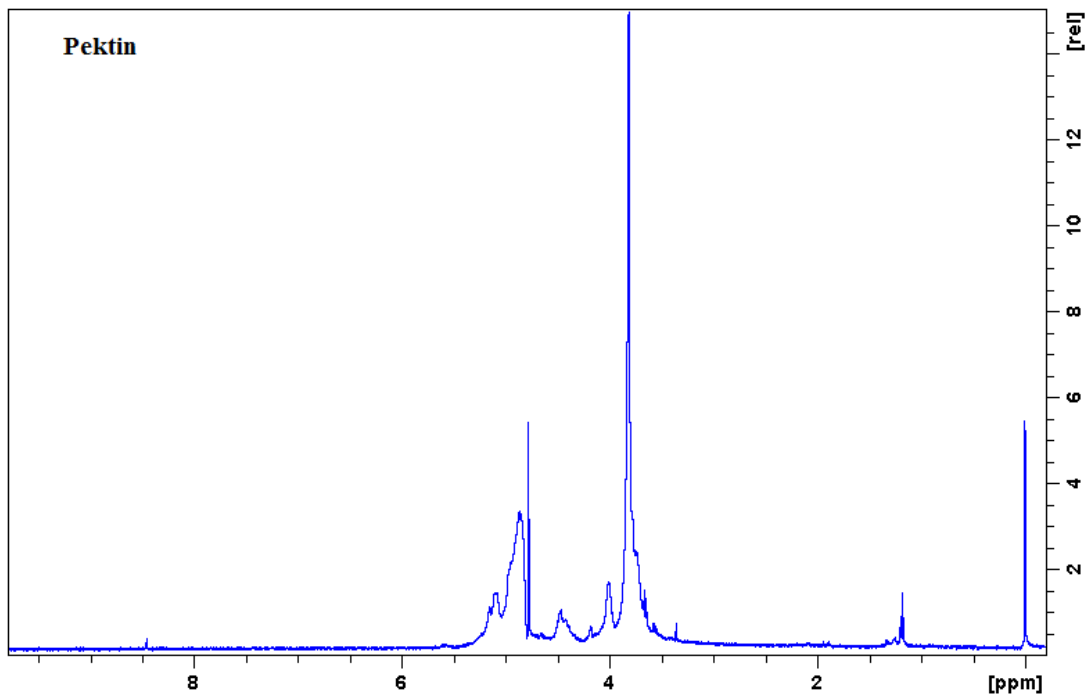
Sličan efekat je dobijen kod prethodno modifikovanih polisaharida. [240, 241] Inkorporacija aromatičnog dopaminskog prstena u pektinski lanac može da se detektuje prisustvom pika od C-C vibracija koje potiču od istežanja u fenolovom prstenu [241] [242] ($\sim 1520 \text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1412 \text{ cm}^{-1}$). Umrežavanje dopamin-pektina tokom imobilizacije lakaze je doprinelo povećanju sadržaja karboksilnih grupa na $97,5 \pm 1,0$ % i smanjilo prisustvo traka koje potiču od nemodifikovanog aromatičnog prstena, što ukazuje na delimičnu hidrolizu polisaharida i promene u molekulu dopamina usled reakcije umrežavanja. Druge značajne, strukturne promene kod kuglica sa imobilizovanom lakazom nisu primećene.

Snimljen ^1H NMR spektar dopamin-pektina (Slika 38) sadrži karakteristične pikove koji potiču od vodonikovih atoma aromatičnog prstena, u regionu od 6 do 8 ppm, za razliku od nativnog pektina koji ne sadrži ove pikove. (Slika 39)

Dopamin-pektin



Slika 38 : FT-IR spektar 10 mol% dopamin-pektina



Slika 39 : FT-IR spektar nativnog pektina

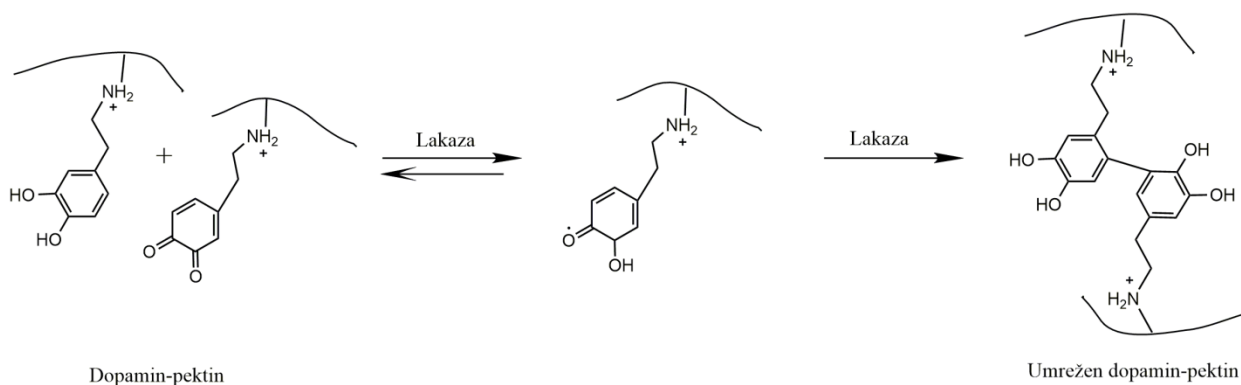
Strukturnim analizama je dokazana uspešnost modifikacije pektina dopaminom. Modifikacija pektina fenolnim jedinjenjima je rađena u cilju dobijanja materijala koji može da se umrežava hemijskim i enzimskim putem, u prisustvu enzima koji imaju fenolne supstrate. Formiranje hidrogelova je u slučaju ovakvog derivata moguće geliranjem u prisustvu kalcijuma ili kovalentnim umrežavanjem u prisustvu enzima, npr. lakaza.

U odnosu na prethodno modifikovan pektin dopaminom, gde je modifikacija rađena na karboksilnoj grupi [243], u ovom radu je pektin prvobitno oksidovan u prisustvu perjodata, a nakon toga je vršena reakcija sa dopaminom na novonastalim aldehidnim grupama. Na ovaj način su formirane stabilne, pozitivno naelektrisane amino grupe, a paralelno su zadržane negativne karboksilne grupe. Prethodno je na sličan način pektin modifikovan drugim fenolnim jedinjenjem, tiraminom [240], kada je prijavljeno da prisustvo pozitivnih i negativnih grupa u pektinu dovodi do povećanje sposobnosti adsorpcije enzima, ćelija i malih molekula. Ovom modifikacijom, pektin-dopamin bi takođe trebao da ima takve sposobnosti, koje su veoma bitne za tkivni inženjering, imobilizaciju i dostavu lekova [240], što je i dokazano kod pektina modifikovanih dopaminom preko karboksilne grupe. [244] Pored toga, zadržana slobodna karboksilna grupa u pektinu omogućava dodatan način za umrežavanje, pored umrežavanja preko dopamina, gde bi u prisustvu dvovalentnih katjona došlo do jonskog umreženja, što bi uticalo na poboljšanu stabilnost hidrogela. Možemo da zaključimo da modifikacija pektina dopaminom preko vicinalnih hidroksilnih grupa obezbeđuje pektinu istovremeno sposobnost oba načina umrežavanja, uz dodatno prisustvo različitih funkcionalnih grupa. U ovom slučaju su ove osobine iskorišćene za enzimsko umreženje lakazom, uz istovremenu, *in situ* imobilizaciju enzima, bez dodatnog jonskog umreživača. [240]

4.8. Imobilizacija dobijene lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama

Sintetisan dopamin-pektin je zbog sposobnosti enzimskih umrežavanja i građenja hidrogela korišćen za imobilizaciju prečišćene lakaze. Pretpostavljen mehanizam enzimskog umrežavanja sa lakazom je preko fenolnih grupa, njihovom oksidacijom, a zatim i radikalskim reakcijama koje dovode do kovalentnih umreženja između fenolnih subjedinica. (Slika 40) Fenoli i di-fenoli su samo neki od supstrata za lakazu, a do sada je utvđen mehanizam reakcije gde lakaza katalizuje oksidaciju i formiranje slobodnih radikala na fenolnim krajevima, koji se nakon toga kupluju i

formiranju C-C veze, di-dopa umreženjima. [245-247] U našem slučaju, mi smo želeli da imobilizujemo lakazu u dopamin-pektin mikrookuglicama, gde će umreživač da bude sama lakaza, a tokom formiranja kuglica bi se jedan deo enzima i zarobio unutar kuglice i na taj način imobilizovao.

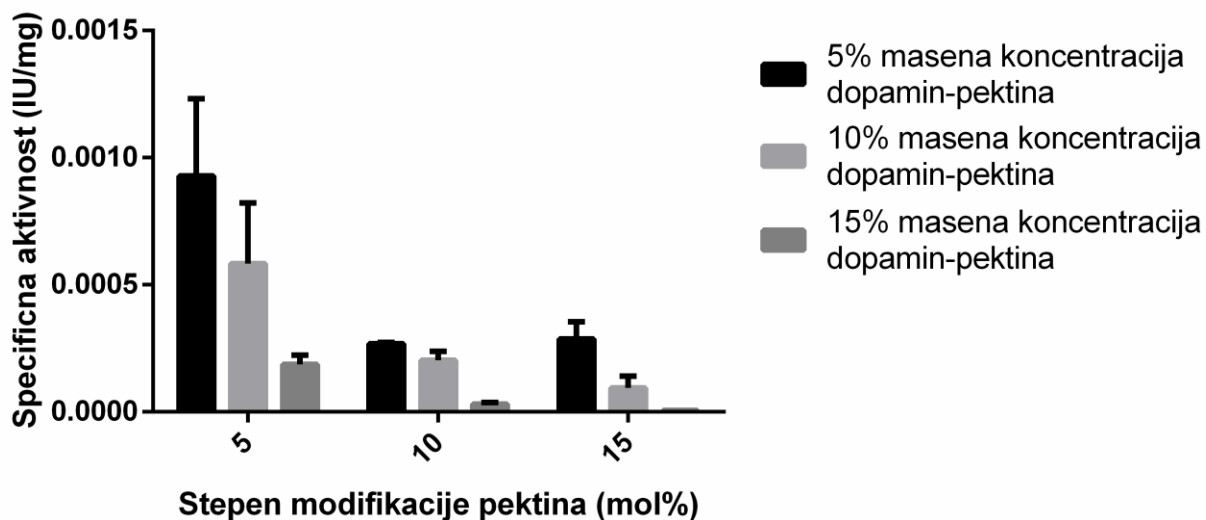


Slika 40: Pretpostavljen mehanizam umrežavanja dopamin-pektina u prisustvu lakaze preko dopaminskih jedinica

Reakcija imobilizacije lakaze i umrežavanja dopamin-pektina, se odvija u emulziji, pri čemu se smeša rastvorenog polimera u odgovarajućem puferu, sa dodatim enzimom, ukapava u lako mineralno ulje, koje se meša na magnetnoj mešalici. Na ovaj način se dobija emulzija vodenog rastvora pektin-dopamina u ulju, pri čemu veličina vodenih kapljica zavisi od viskoznosti pripremljenog dopamin-pektinskog rastvora sa enzimom, kao i od brzine mešanja rastvora u koji se ukapava dobijena smeša. Povećanjem brzine mešanja dolazi do smanjenja veličine kapljica, tako da je tokom svih eksperimenata brzina držana konstantnom. Određen vremenski period je bio potreban da dođe do polimerizacije unutar formiranih vodenih kapljica, a indikator da je do polimerizacije dopamin-pektina došlo je bila promena boje rastvora u narandžasto-braon boju, koja je karakteristična za boju oksidovanog fenola. Oksidacija zakačenog dopamina za pektin katalizovana lakazom se vršila metodom radikalskog umrežavanja. U odsustvu lakaze nije došlo do formiranja mikrookuglica, tj. reakcija radikalskog umrežavanja nije bila moguća bez prisustva katalizatora.

Da bismo dobili kuglice sa optimalnim osobinama, varirana je kocentracija dodavanog dopamin-pektina, pri čemu su testirani modifikovani pektini sa različitim stepenom modifikacije, a takođe je varirana i količina dodatog enzima. Korišćeni su dopamin-pektini različitog stepena modifikacije (5, 10 i 15 mol%) u različitim masenim koncentracijama, pa je tako finalna

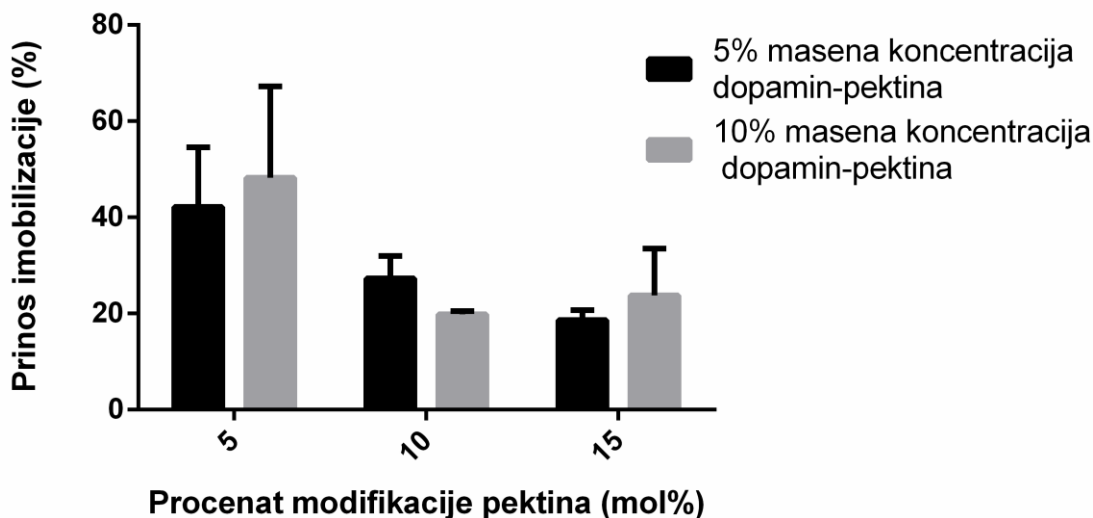
koncentracija dopamin-pektina u smeši sa enzimom i puferom iznosila 5, 10 i 15 % (w/v). Kao što se može videti na Slici 41 najveća specifična aktivnost je dobijena sa 5 mol% dopamin-pektinom, finalne masene koncentracije od 5 % (w/v).



Slika 41: Zavisnost specifične aktivnosti imobilizovane lakaze od: (1) stepena modifikacije pektina (5, 10 i 15 mol%), (2) masene koncentracije dodatog dopamin-pektina (5, 10 i 15 %)

Pri istim uslovima je određen i prinos imobilizacije, i kao što se može videti na prikazanom grafiku (Slika 42), najveći stepen imobilizacije je takođe dobijen sa 5 mol% dopamin-pektinom, finalne masene koncentracije od 5 % (w/v). Iz dobijenih podataka, na osnovu izračunate specifične aktivnosti imobilizovanog enzima i prinosa imobilizacije, zaključujemo da je prilikom imobilizacije lakaze u dopamin pektinu najbolje koristiti 5 mol% dopamin-pektin, pripremljen u finalnoj masenoj koncentraciji od 5 % (w/v). Moguće je da veći stepen modifikacije pektina (10 i 15 mol%) ima uticaj na integritet polimera, usled prethodno izvršene perjodatne oksidacije, sprečavajući formiranje kompaktnog hidrogela, što ima negativan uticaj na prinos imobilizacije i specifičnu aktivnost imobilizata. Ovaj efekat se može objasniti uticajem perjodatne oksidacije na neke osobine polimera, kao što su fleksibilnost i dužina lanca, rastvorljivost, sposobnost geliranja, itd. [248] Ovaj efekat je ispitivan na alginatu i hitozanu i utvrđeno je da polimeri sa većim stepenom perjodatne oksidacije pokazuju značajno smanjenje dužine lanca. [248] Sa povećanjem stepena oksidacije alginata dolazi do smanjenja njegove molekulske mase, sve do stepena oksidacije od 10 mol%, kada ostaje ista. [249] Takođe, sposobnost geliranja slabi sa povećanim

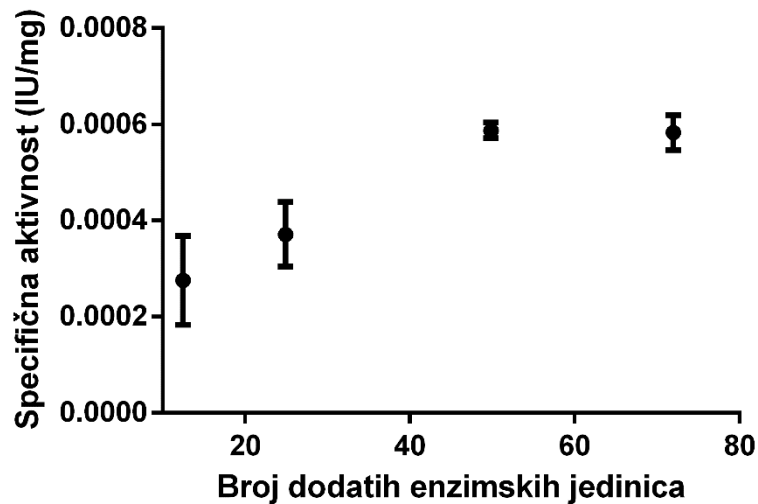
stepenom oksidacije, pa tako polimeri sa stepenom oksidacije većim od 10 mol% ne pokazuju sposobnost geliranja sa jonima kalcijuma. [249]



Slika 42: Zavisnost prinosa imobilizacije (%) od procenta modifikacije dopamin-pektina (5, 10 i 15 mol%)

Kada su optimizovani procenat modifikacije korišćenog pektina, kao i njegova masena koncentracija u smeši koja se ukapava u ulje, proveren je i uticaj dodatog enzima na imobilizaciju istog. Varirane su različite koncentracije prečišćene lakaze (1,385 mg/mL; 2,77 mg/mL; 5,54 mg/mL i 8 mg/mL), što je u ukupnoj smeši iznosilo 12,5, 25, 50 i 72 dodatih enzimskih jedinica lakaze, koje su mešane sa polimerom neposredno pre ukapavanja u ulje. Na Slici 43 se može videti da sa dodatkom 50 IU enzima se dostiže plato i daljim povećanjem dodavane koncentracije enzima ne dolazi do povećanja specifične aktivnosti imobilizovane lakaze. Na osnovu dobijenih rezultata je odlučeno da se u daljim eksperimentima dodaje 50 enzimskih jedinica lakaze.

Finalno je utvrđeno da se optimalne karakteristike imobilizovane lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama dobijaju prilikom korišćenja 5 mol% modifikovanog dopamine-pektina, u finalnoj masenoj koncentraciji od 5 %, sa 50 IU dodate lakaze. Za sve sledeće eksperimente su pripremane kuglice na isti način, u triplicatu, da bi merenja bila statistički značajna. Dobijene kuglice su bile braonkaste boje, koja potiče od umreženog dopamin-pektina, što je bio još jedan dokaz da je došlo do uspešnog umreženja dopaminskih jedinica koje su vezane za pektin. Takođe je i određena veličina kuglica na optičkom mikroskopu i ona je iznosila $9 \pm 2 \mu\text{m}$.

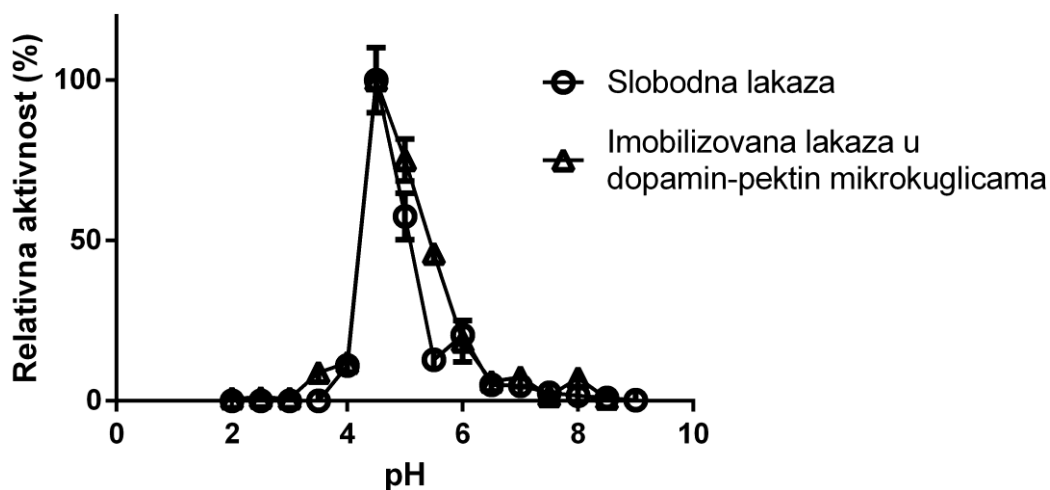


Slika 43: Zavisnost specifične aktivnosti imobilizovane lakaze u dopamin-pektin kuglicama u zavisnosti od broja dodatih enzimskih jedinica lakaze (12,5, 25, 50 i 72 IU)

4.9. Karakterizacija slobodne i imobilizovane lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama

4.9.1. pH optimum

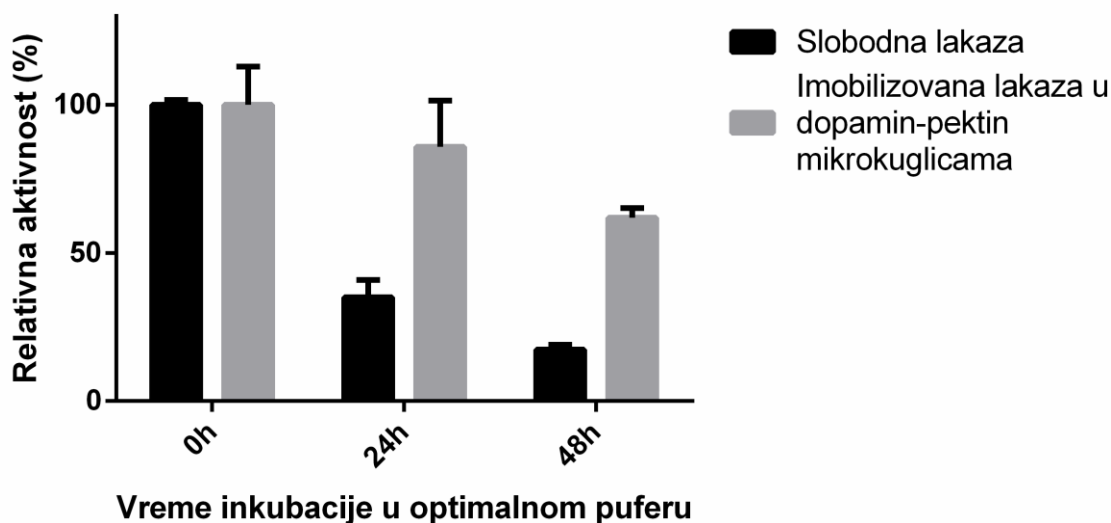
Određen je uticaj pH vrednosti na enzimsku aktivnost kod slobodne lakaze i lakaze imobilizovane u 5 mol% dopamin-pektinu. Merena je enzimska aktivnost u puferima pH vrednosti od 2,0 do 9,0, kao što je opisano u poglavljima 3.5.1. i 3.13.1. Relativna aktivnost je izražena u procentima, u odnosu na maksimalnu aktivnost, tj. na aktivnost pri optimalnom pH. Određeno je da je optimalan pH za slobodnu i imobilizovanu lakazu 4,5 (Slika 44), dok je imobilizovana lakaza pokazala blago širi pH optimum, kao i veću aktivnost na vrednostima pH 5,0 i 5,5. Sličan pH optimum slobodne i imobilizovane lakaze može da bude rezultat prisustva oba naelektrisanja, pozitivnog i negativnog. Ovo nije bio slučaj u prethodnim studijama gde je lakaza imobilizovana u različitim materijalima: agar-agar-u, poliakrilamidu ili želatinoznom gelu, sa pH optimumom od 7,0, 3,0 i 6,0, navedenim redom. Iz navedenih rezultata je utvrđeno da različit pH optimum imobilizovane lakaze zavisi od prirode i strukture matriksa u koji je imobilizovana. [179]



Slika 44: Zavisnost relativne enzimske aktivnosti slobodne lakaze i lakaze imobilizovane u dopamin-pektin mikrokruglicama, od pH vrednosti rastvora

4.9.2. pH stabilnost

Određena je pH stabilnost slobodne i imobilizovane lakaze u optimalnom puferu, 0,1 M natrijum-acetatni pufer pH 4,5. Slobodan i imobilizovan enzim su inkubirani u optimalnom puferu tokom 0, 24 i 48 h, na sobnoj temperaturi. Nakon perioda inkubacije, određena je enzimska aktivnost slobodnog i imobilizovanog enzima i preračunata na relativnu, u odnosu na maksimalnu aktivnost (0 h inkubacije). Kao što se može videti na Slici 45, nakon 24 h, slobodan enzim je izgubio oko 65 % svoje početne aktivnosti, dok je imobilizovan izgubio samo 15 %, dok je nakon 48 h slobodan enzim izgubio 86 %, a imobilizovan enzim 38 % svoje početne aktivnosti.

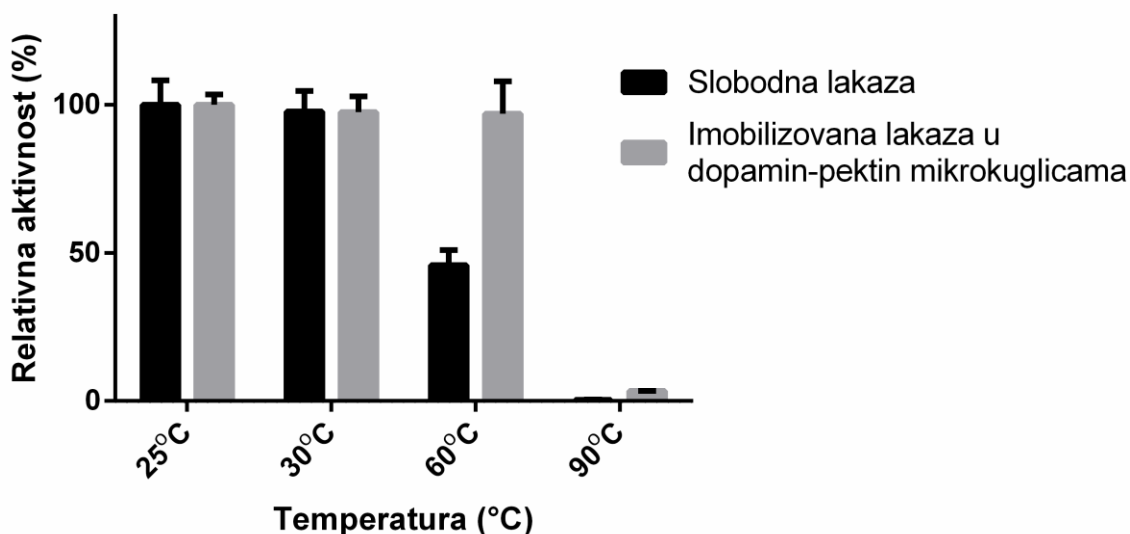


Slika 45: Prikaz relativne aktivnosti slobodne i imobilizovane lakaze u 5 % mol dopamin-pektin mikrokglicama nakon 0, 24 i 48 h inkubacije u optimalnom puferu

Može se zaključiti da imobilizovan enzim pokazuje veću pH stabilnost u odnosu na slobodan, što se objašnjava vezivanjem enzima za imobilizacioni matriks, a samim tim je manja verovatnoća da će tokom određenog vremenskog perioda pH rastvora uticati na konformacionu promenu enzima. [15] U prethodnim studijama je dokazano da se imobilizovanjem lakaze povećava njena stabilnost, pa na ovaj način može uspešno da se zadrži visoka katalitička aktivnost lakaza tokom dužeg vremenskog perioda, i da se samim tim smanje troškovi u industrijskim procesima. [250, 251]

4.9.3. Temperaturna stabilnost

Poređena je temperaturna stabilnost slobodne lakaze i lakaze imobilizovane u 5 mol% dopamin-pektin mikrokglicama. Slobodna i imobilizovana lakaza su inkubirane na različitim temperaturama u periodu od 1 sata, u optimalnom puferu. Temperature na kojima je vršena inkubacija su 25, 30, 60 i 90 °C. Nakon perioda inkubacije, slobodan i imobilizovan enzim su hlađeni 5 minuta na ledu, nakon čega je merena enzimska aktivnost sa ABTS-om, po već navedenim protokolima. Grafički su prikazane relativne aktivnosti slobodne i imobilizovane lakaze nakon inkubacije na različitim temperaturama. (Slika 46)



Slika 46: Zavisnost relativne aktivnosti slobodne i imobilizovane lakaze u 5 mol% dopamin-pektin mikrokruglicama nakon inkubacije od 1 sata na temperaturama od 25, 30, 60 i 90°C

Na Slici 46 se može videti da slobodan i imobilizovan enzim na temperaturama od 25 i 30 °C zadržavaju maksimalnu aktivnost. Sa povećanjem temperature (60 °C), slobodan enzim gubi 55 % svoje početne aktivnosti, dok imobilizovan enzim i dalje zadržava maksimalnu aktivnost. Navedeni rezultati nam sugerišu da imobilizacijom enzima, matriks čini potporu enzimu i štiti ga od konformacionih promena koje bi bile izazvane povećanom temperaturom, dok kod slobodnog enzima opada enzimska aktivnost sa povećanjem temperature usled denaturacije i narušavanja tercijarne strukture proteina. [252]

Povećana termalna stabilnost imobilizovane lakaze u različitim matriksima, u odnosu na slobodnu lakazu, je do sada potvrđena u mnogim radovima. [15, 179, 203, 238, 253] Pa je tako na primer lakaza iz *Tramete versicolor* imobilizovana u agar-agaru, poliakrilamidu i želatinu, i nakon 1 sata inkubacije na 60 °C je zadržala $69,54 \pm 3,6$, $73,05 \pm 3,9$ i $63,07 \pm 4,3$ % relativne aktivnosti, navedenim redom. [179] Lakaza iz istog izvora je prethodno imobilizovana u agaroznim kuglicama i umreženim enzimskim agregatima (crosslinked enzyme aggregates – CLEA). Nakon 1 sata na 30 °C su slobodna lakaza, lakaza u agaroznim kuglicama i lakaza u CLEA zadržale 100, 70 i 88% svoje početne aktivnosti, navedenim redom. [229] Ako uporedimo našu imobilizovanu lakazu u dopamin-pektin mikrokruglicama, koja je pri istim uslovima zadržala maksimalnu aktivnost, možemo da kažemo da lakaza imobilizovana na ovaj način pokazuje

značajnu prednost, tako da bi novi modifikat, dopamin-pektin mogao da bude obećavajući matriks za imobilizaciju enzima.

4.9.4. Kinetički parametri

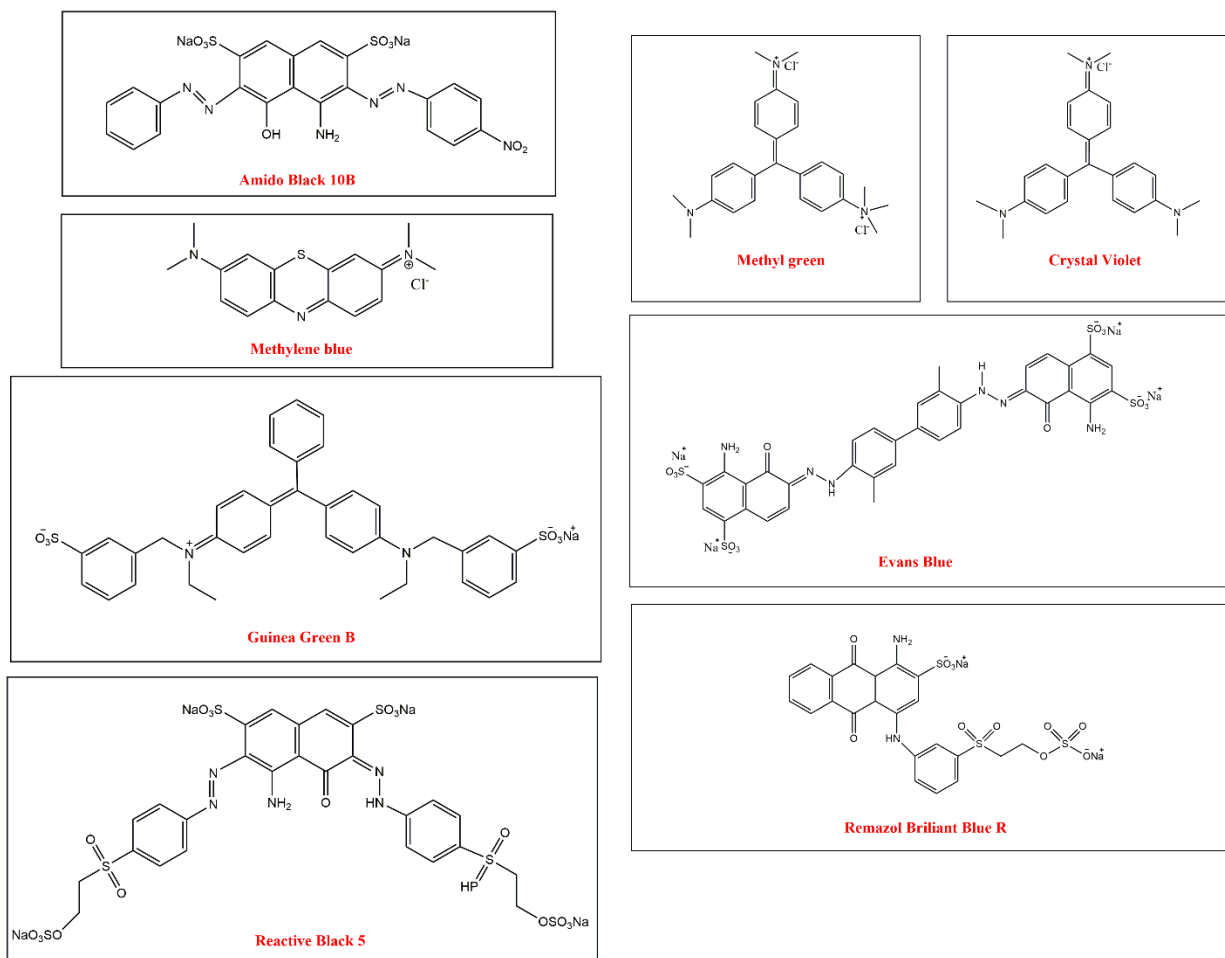
Određeni su kinetički parametri, K_m (Michaelis-Menten-ina konstanta) i V_{max} (maksimalna brzina reakcije), za slobodan i imobilizovan enzim u 5 mol% dopamin-pektinu. Merena je enzimska aktivnost sa različitim koncentracijama supstrata (ABTS) i nakon toga su iz dobijenih podataka izračunati navedeni parametri. Utvrđeno je da se i slobodna i imobilizovana lakaza ponašaju u skladu sa Michaelis-Menteninom kinetikom. K_m vrednost za slobodnu lakazu je iznosila $0,06340 \pm 0,005877$ mM, a za imobilizovanu lakazu $0,5861 \pm 0,1658$ mM. Povećanje K_m vrednosti za imobilizovanu lakazu je očekivano, javlja se kod velikog broja imobilizovanih enzima, i dešava se zbog difuzionih ograničenja usled poroznosti matriksa. Samim tim supstrat ne može dovoljno brzo da difunduje kroz pore polimera i da dođe do enzima koji je imobilizovan u njemu. Dobijena V_{max} za slobodan enzim je iznosila $7,216 \pm 0,1374$ $\mu\text{Mmin}^{-1}\text{mL}^{-1}$, dok je za imobilizovan iznosila $0,7211 \pm 0,07246$ $\mu\text{Mmin}^{-1}\text{mL}^{-1}$. Imobilizacija lakaze je dovela do smanjenje maksimalne brzine reakcije, što je takođe bilo za očekivati. Povećanje K_m i smanjenje V_{max} za imobilizovan enzime u odnosu na slobodne je prethodno objašnjeno sternom zaklonjenošću katalitičkog mesta enzima, kao i difuzionim ograničenjima supstrata i proizvoda enzimske reakcije, od strane matriksa za polimerizaciju. [169] Brzina hemijske reakcije opada sa povećanjem rastojanja između površine matriksa i imobilizovanog enzima i odražava se na vrednosti kinetičkih parametara enzimske reakcije. [254]

4.10. Dekolorizacija boja imobilizovanom lakazom

Nakon što je izvršena imobilizacija prečišćene lakaze u dopamin-pektin mikrokuglicama i ćelijskih zidova sa lakazom u dopamin-alginat kuglicama, cilj je bio ispitati potencijal ovakvih biokatalizatora za dekolozaciju različitih boja. Lakaza iz različitih izvora, imobilizovana u raznovrsnim matriksima, je do sada ispitana za uklanjanje boja, gde je u većoj ili manjoj meri pokazivala potencijal. [15, 203-206, 255, 256]

4.10.1. Dekolorizacija boja imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lakazom u dopamin-alginatnim kuglicama

Za testiranje sposobnosti imobilizovanih ćelijskih zidova sa lakazom za uklanjanje boja, izabrane su tekstilne boje iz različitih grupa: Amido Black 10B, Methylene Blue, Guinea Green, Reactive Black 5, Methyl green, Evans Blue, Crystal Violet i Remazol Brilliant Blue. (Slika 47) Kuglice su inkubirane u boji tokom 48 časova, bez dodataka redoks medijatora. Tokom 48 časova su uzimani alikvoti čija je apsorbancija merena i računata relativna dekolozacija. Vrednosti za relativnu dekolozaciju u određenim satima su dobijene oduzimanjem dobijenih vrednosti za kontrolne kuglice (kuglice sa ćelijskim zidovima bez lakaze, sa eksprimiranim praznim pCTCON2 vektorom) od vrednosti dobijenih za kuglice sa ćelijskim zidovima sa lakazom. Provera je rađena na ovaj način, da bi dekolozacija poticala samo od enzimskog uklanjanja boja, a ne i od adsorpcije za samu kuglicu.

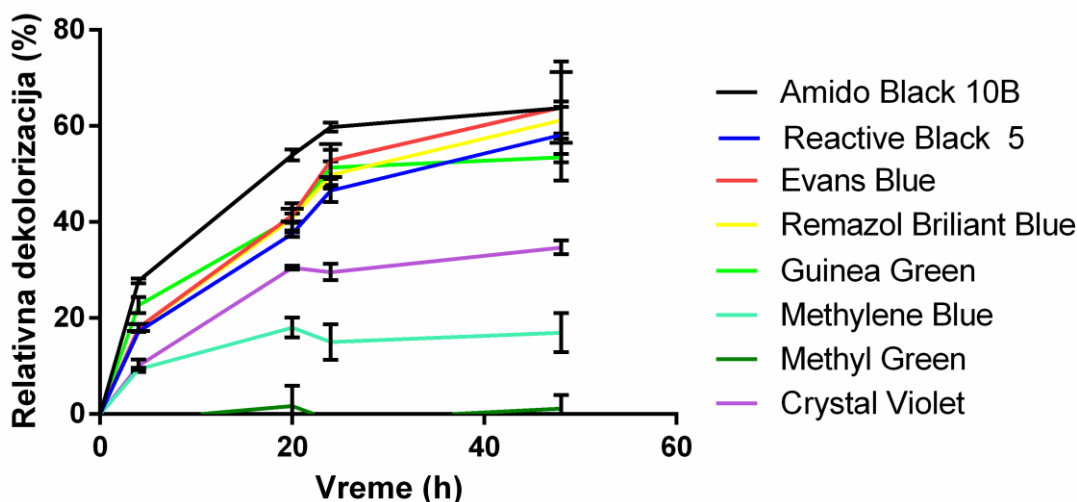


Slika 47: Strukturne formule korišćenih tekstilnih boja

Na Slici 48 su prikazani dobijeni rezultati i kao što se može videti najveći stepen dekolorizacije tokom 48 časova je dobijen za boje Amido Black 10B i Evans Blue, $63,8 \pm 9,7 \%$ i $63,9 \pm 7,4 \%$, navedenim redom. Primenjen biokatalizator se nije pokazao uspešnim za boju Methyl Green, pa je nakon 48 sati dekolorizacije vrednost za relativnu dekolorizaciju iznosila 0 %. Imobilizovani ćelijski zidovi sa lakazom su se pokazali efikasni i kod uklanjanja boja Reactive Black 5 (RB5) i Remazol Brilliant Blue (RBBR), za koje je stepen dekolorizacije nakon 48 h iznosio $58,2 \pm 5,8 \%$ i $61,3 \pm 3,9 \%$, navedenim redom. Za dekolorizaciju boja RB5 i RBBR je prethodno testirana lakaza iz *M. thermophila*, imobilizovana na Sepa-kuglicama EC-EP3, koja u odsustvu redoks medijatora nije pokazala sposobnost dekolorizacije, dok je uz njegov dodatak dostigla 60% dekolorizacije početne boje. [204] Oni su dokazali da je u slučaju dekolorizacije RB5 boje neophodan redoks medijator, jer RB5 boja najverovatnije ima sterne smetnje zbog kojih je otežan pristup $-NH_2$ i $-OH$ grupama, koje najčešće napada lakaza. U našem radu se lakaza pokazala kao

najefikasnija za dekolorizaciju Evans Blue boje, a ona je prethodno testirana i u drugim studijama. [257-259] Pardo i saradnici su testirali dekolorizaciju ove boje lakazom iz *Trametes villosa*, gde su pokazali da je lakaza nakon 3 h uspela da ukloni 49 % boje. Oni su utvrdili da prisustvo dve hidroksilne grupe favorizuje oksidaciju ove boje. [258]

Kada uporedimo sa prethodnim studijama, možemo da zaključimo da je lakaza iz *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 na ćelijskim zidovima kvasca, imobilizovana u dopamin-alginatu pokazala obećavajuća svojstva za uklanjanje boja.

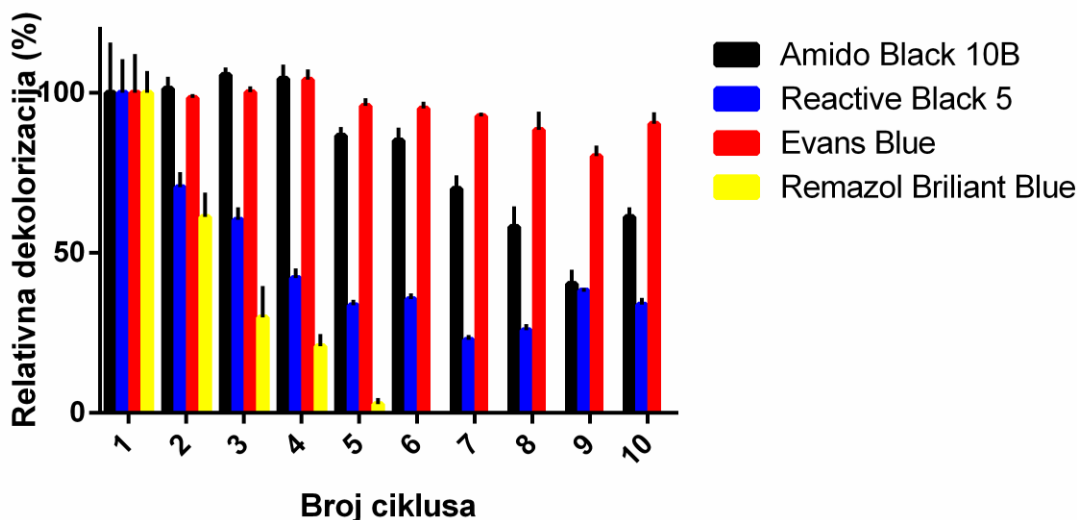


Slika 48: Praćenje dekolorizacije različitih boja sa imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lakazom, tokom 48 h, prikazano kao relativna dekolorizacija (%)

4.10.2. Ponovna upotreba imobilizovanih ćelijskih zidova sa lakazom za dekolorizaciju boja

Nakon što je dokazan potencijal imobilizovanih ćelijskih zidova sa lakazom za dekolorizaciju boja Amido Black 10B, Evans Blue, Remazol Brilliant Blue i Reactive Black 5, ispitana je i ponovna upotreba ovih biokatalizatora u višekratnom tretmanu dekolorizacije boja. Velika prednost imobilizovanih enzima je mogućnost njihovog odvajanja iz reakcione smeše i njihove ponovne upotrebe u novom procesu.

Sposobnost ponovne upotrebe je ispitivana tokom 10 ciklusa obezbojavanja od po 48 časova. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 49.



Slika 49: Ponovna upotreba dopamin-alginatnih kuglica sa ćelijskim zidovima sa lakazom za degradaciju boja Amido Black 10B, Reactive Black 5, Evans Blue i Remazol Brilliant Blue. Dekolorizacija je praćena u 10 ciklusa od po 48 sati.

Nakon 10 ciklusa od po 48 sati, imobilizovani ćelijski zidovi sa lakazom u kalcijum-dopamin-alginatnim kuglicama su zadržali 90 % svoje aktivnosti za dekolorizaciju boje Evans Blue, 61 % za Amido Black 10B i 33 % za Reactive Black 5. Što se tiče boje Remazol Brilliant Blue, imobilizovana lakaza je izgubila enzimsku aktivnost već nakon 5. ciklusa. Na Slici 49 se može videti postepeni pad stepena dekolorizacije od 1. do 10. ciklusa. Ovaj pad se može objasniti postepenom inaktivacijom enzima, ili difuzionim problemima supstrata i proizvoda, uzrokovanih smanjenjem veličine pora imobilizacionog matriksa. [205]

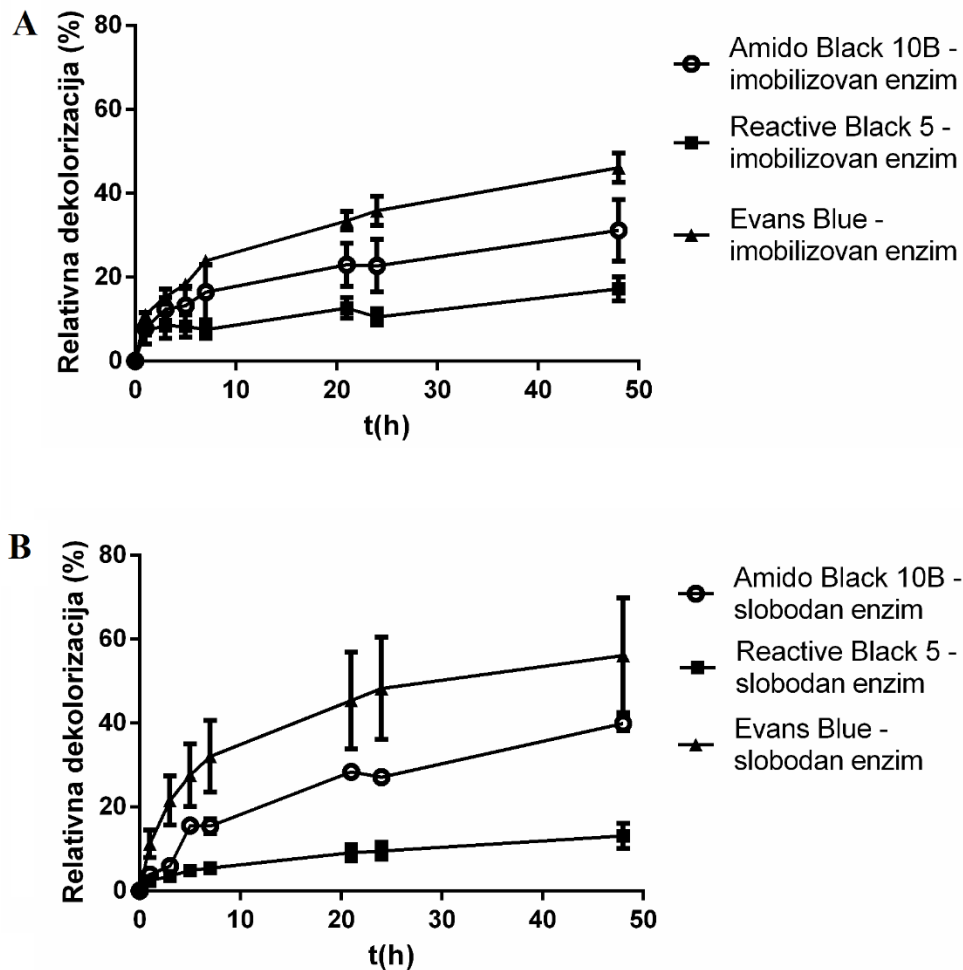
Ponovna upotreba imobilizovanih enzima je veoma bitan aspekt industrijske primene usled omogućenog jednostavnog odvajanja biokatalizatora od ostatka smeše i njegove ponovne upotrebe. Ponovna upotreba istog biokatalizatora u velikoj meri snižava cenu industrijskog procesa. Do sada je lakaza u velikoj meri ispitivana za ove svrhe, pa je tako lakaza iz različitih izvora imobilizovana u raznovrsnim matriksima i isprobana u višekratnim procesima dekolorizacije boja. [15, 16, 204, 206, 216, 218] Lakaza iz *C. gallica* je imobilizovana u Ca-alginatnim kuglicama i testirana je tokom 10 ciklusa dekolorizacije sledećih boja: Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Reactive Black 5 (RB5), Bismark Brown R (BBR) i Lanaset Grey G (LG) boje. Trajanje svakog ciklusa je bilo 24 sata i nakon 7 ciklusa su kuglice zadržale sposobnost dekolorizacije RB5 boje 50 % i RBBR boje 85 %. [203]

4.10.3. Dekolorizacija boja imobilizovanom lakazom u mikrokuglicama dopamin-pektina

Izolovana i prečišćena lakaza iz *E. coli* je ispitivana za dekolorizaciju boja u slobodnom i imobilizovanom obliku. Za ispitivanje sposobnosti dekolorizacije su korišćene sledeće boje: Amido Black 10 B, Reactive Black 5 i Evans Blue. Cilj ovog istraživanja je bio ispitati sposobnost lakaze, imobilizovane na novom tipu matriksa, za ove svrhe.

Dekolorizacija navedenih boja je praćena tokom 48 časova. Meren je maksimum apsorbance u satima i nakon toga je računat procenat relativne dekolorizacije, po već objašnjenom postupku. Da bi se uporedila sposobnost dekolorizacije slobodne i imobilizovane lakaze, praćena je dekolorizacija sa imobilizovanom lakazom, ali i sa istom količinom slobodne lakaze, pri istim uslovima.

Sa Slike 50A može da se uoči da je imobilizovana lakaza u najvećoj meri uspela da dekolorizuje Evans Blue boju (46 % nakon 48 sati), dok je manji procenat dekolorizacije uočen za Amido Black 10 B i Reactive Black 5 boje (31 % i 17 %, navedenim redom). Kao što se može videti sa Slike 50B, slobodna lakaza je takođe u najvećoj meri uspela da dekolorizuje Evans Blue boju (56 % nakon 48 sati), dok je u manjoj meri dekolorizovala Amido Black 10B i Reactive Black 5 boje (39 % i 13 %, navedenim redom).



Slika 50: Dekolorizacija boja Amido Black 10B, Reactive Black 5 i Evans Blue sa: A) imobilizovanom lakazom u dopamin-pektin mikrokruglicama; B) slobodnom lakazom

Najmanju efikasnost je naš biokatalizator pokazao kod dekolorizacije boje Reactive Black 5. Do sada su razne studije vršile ispitivanja dekolorizacije ove boje lakazom. Uočeno je da je procenat dekolorizacije sa lakazom iz *Coriolopsis gallica* imobilizovanom u Ca-alginatnim kuglicama iznosi 31 % nakon 24 h [203], dok lakaza iz *M. thermophila* imobilizovana u Sepa kuglicama EC-EP3 nema uticaj na dekolorizaciju ove boje [204]. Iste rezultate su dobili i Murugesan i saradnici, gde lakaza iz korena gljive *P. sajor-caru* nije vršila dekolorizaciju ove boje. Oni su utvrdili da je neophodno prisustvo redoks medijatora HBT-a, u čijem prisustvu dolazi do transformacije plave u roza boju, koja se onda obezbojava. [215] Međutim, Zille i saradnici pokazuju da lakaza iz *Trametes villosa* uspešno dekolorizuje boju RB5 bez prisustva redoks medijatora [216], što potvrđuje i istraživanje Li i saradnika, koji su poredili oksidacionu

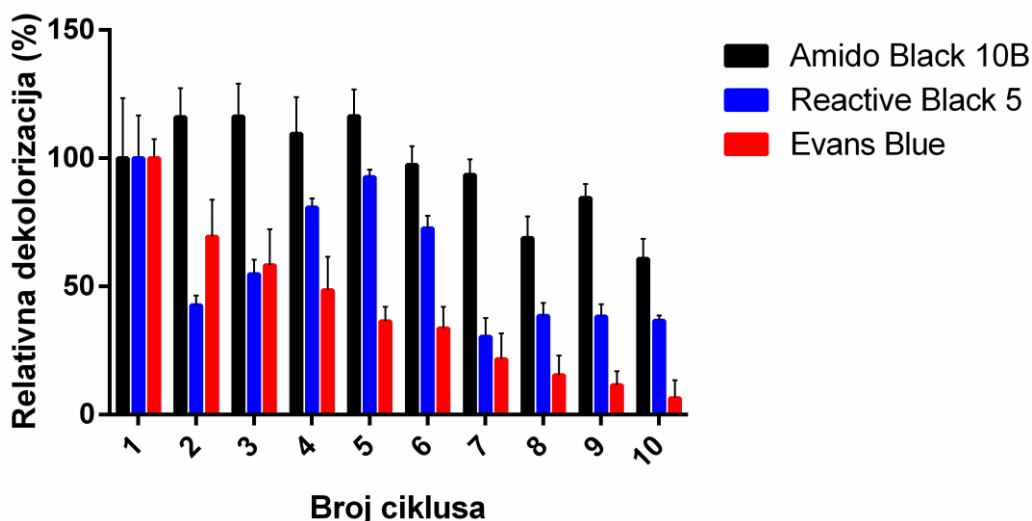
sposobnost lakaze u prisustvu različitih medijatora, i pokazali da redoks potencijal lakaze zavisi od porekla same lakaze. [260]

Deklorizacije Evans Blue boje je takođe ispitivana u raznim studijama [257, 258, 261] i pokazano je da je lakaza dobar biokatalizator za dekolorizaciju ove boje, što je potvrđeno i našim rezultatima. Pored ove boje, lakaza se pokazala uspešnom za deoklorizaciju Amido Black 10B boje. [14, 205, 262]

Iz dobijenih rezultata može da se utvrdi da je lakaza iz ovog izvora dobar katalizator za dekolorizaciju Amido Black 10B, Reactive Black 5 i Evans Blue boje. Efikasnost dekolorizacije ne može direktno da se uporedi sa prethodnim studijama, usled različitih eksperimentalnih uslova. Ono što može da se uoči je da testirane boje pokazuju različit stepen rezistentnosti na enzimsku konverziju sa lakazama različitog porekla, što može da bude objašnjeno nedovoljno visokim redoks potencijalom lakaze potrebnim za oksidaciju supstrata, ili niskom supstratnom specifičnošću za različite boje.

4.10.4. Ponovna upotreba mikrokuglica sa lakazom za dekolorizaciju boja

Ponovna upotreba mikrokuglica sa lakazom za dekolorizaciju ove tri boje je ispitana u 10 ciklusa dekolorizacije, od po 48 sati. Stepen dekolorizacije po ciklusima je prikazan na Slici 51.



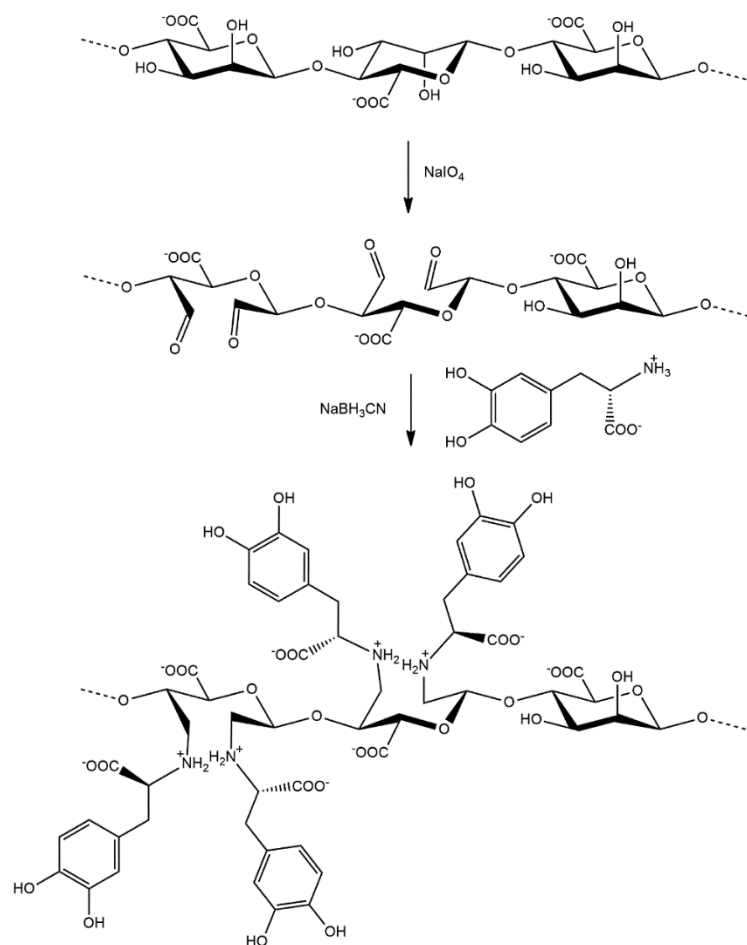
Slika 51: Ponovna upotreba mikrokuglica sa lakazom za dekolorizaciju boja Amido Black 10B, Reactive Black 5 i Evans Blue. Dužina ciklusa dekolorizacije je iznosila 48 sati.

Nakon 10 ciklusa od po 48 sati su kuglice i dalje zadržale svoje fizičke karakteristike i mogle su da uklone 60 % boje Amido Black 10B, 36 % boje Reactive Black 5 i samo 6 % boje Evans Blue. Tokom ovih 10 ciklusa mikrokuglice nisu značajno promenile svoju boju, što nam pokazuje da nema značajne apsorpcije boja za imobilizacioni matriks. Razlozi za postepeno smanjenje stepena dekolorizacije po ciklusima su prethodno već spomenuti. Smanjenje pora imobilizacionog matriksa tokom procesa dekolorizacije je moglo da dovede do smanjenja difuzije supstrata i proizvoda, tokom nekoliko ciklusa korišćenja. [205] Još jedan razlog može biti i potencijalna inaktivacija enzima. Uočen je i uticaj “curenja” enzima iz alginatnih kuglica tokom ispiranja kuglica između ciklusa [263], što je u ovoj studiji potencijalno optimizovano korišćenjem mikrokuglica pektina, a ne klasičnih kalcijum-pektinskih kuglica.

U studiji gde je korišćena lakaza iz *Myceliophthora thermophila* imobilizovana na ugljeničnim nanocevima, nakon jednog ciklusa od 2 h, procenat uklonjene RB5 boje je iznosio 62,73 %, nakon 2. ciklusa je stepen dekolorizacije iznosio skoro duplo manje (33,18 %), a nakon samo 4 ciklusa je pao na 6,89 %. [264] Može da se utvrdi da je imobilizovana lakaza nakon 4 ciklusa od po 2 sata, zadržala 10,98 % svoje početne aktivnosti, dok je naša imobilizovana lakaza nakon 10 ciklusa od po 48 sati zadržala čak 36 % svoje početne aktivnosti. Poboljšan stepen ponovne upotrebe lakaze imobilizovane u dopamin-pektin mikrokuglicama bi mogao da bude potencijalna prednost u tretmanima dekolorizaciji boja.

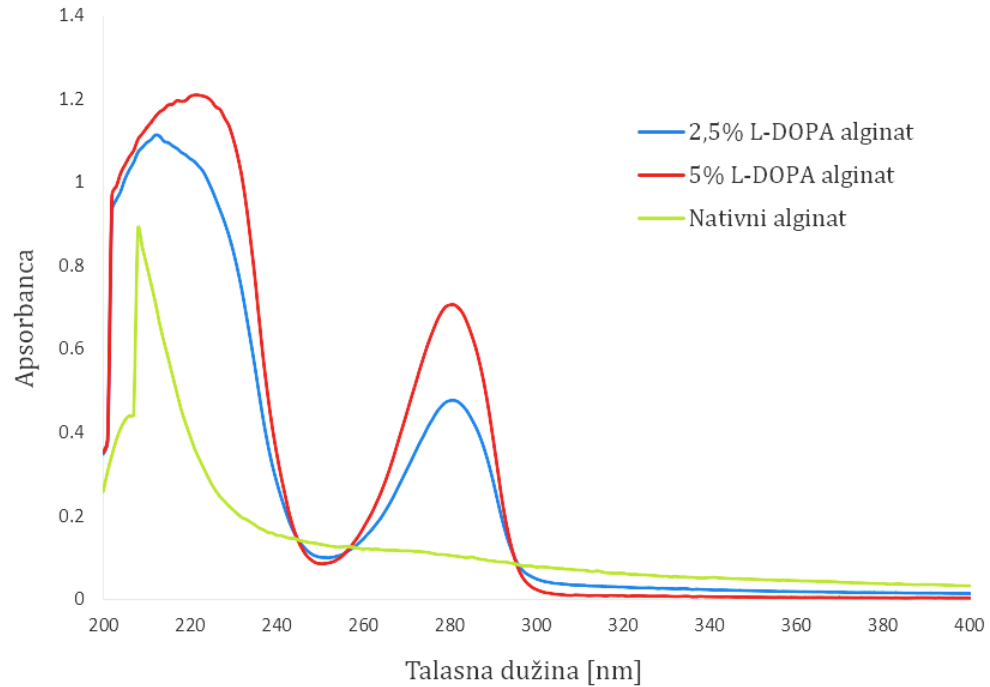
4.11. Sinteza i karakterizacija L-DOPA-alginata

U cilju modifikacije alginata L-DOPA-om, alginat je u prvom koraku oksidovan reakcijom perjodatne oksidacije sa različitim molarnim odnosima perjodata i alginata: 2,5 i 5,0 mol%. Formirane aldehidne grupe su bile ciljane grupe za sledeći korak modifikacije - reduktivnu aminaciju natrijum-cijanoborhidridom i L-DOPA-om. Finalno je bio cilj dobiti alginat sa zakačenom L-DOPA-om za novostvorene aldehidne grupe, preko formiranja sekundarnih amino grupa. (Šema 3)



Šema 3: Reakcija modifikacije alginata perjodatnom oksidacijom i reduktivnom aminacijom u prisustvu L-DOPA-e i natrijum-cijanoborhidrida

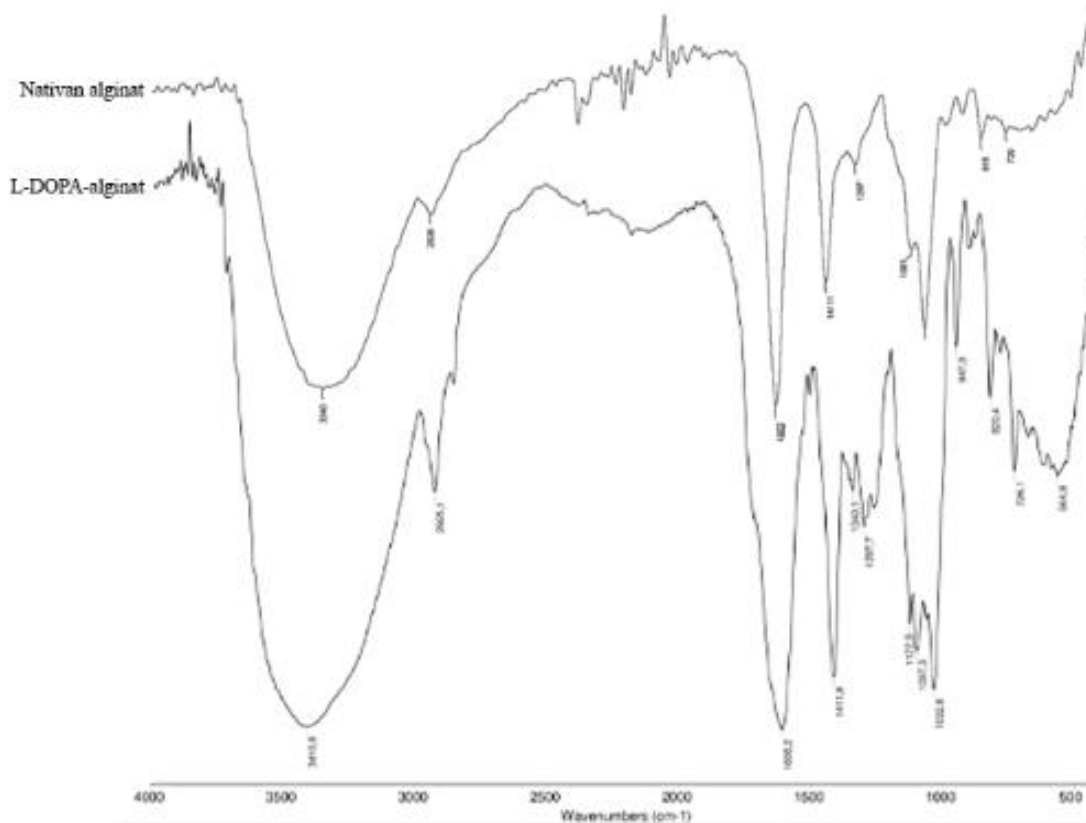
Sintetisani derivati alginat su okarakterisani UV-Vis spektroskopijom, kao i snimanjem FTIR spektara. Snimanjem UV-Vis spektara modifikovanog alginata u opsegu talasnih dužina od 200 do 350 nm, uočeno je postojanje apsorpcionog pika na talasnoj dužini od 280 nm, koji potiče od uvedene fenolne grupe molekula L-DOPA, a kog nema na spektru nativnog pektina, usled odsustva hromofore koja bi mogla da apsorbuje na toj talasnoj dužini. (Slika 52)



Slika 52: UV-Vis spektri L-DOPA-alginata i nativnog alginata

Sa Slike 52 se takođe uočava da sa porastom količine dodatog perjodata dolazi do povećanog stepena oksidacije alginata, a samim tim i do povećanog broja vezanih L-DOPA molekula, što se odražava povećanjem apsorbance na 280 nm.

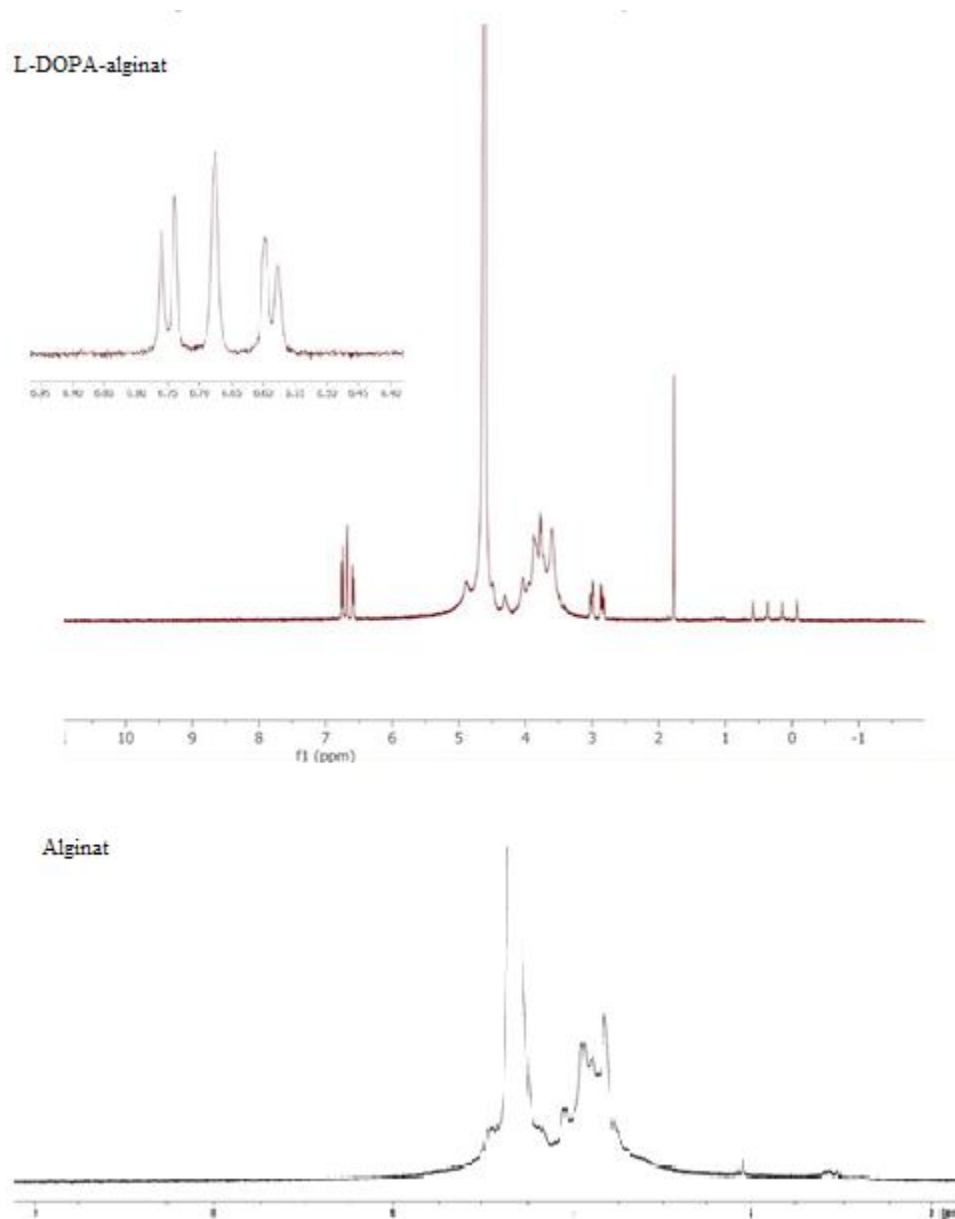
Pored UV-Vis spektroskopije, L-DOPA-alginat je okarakterisan i snimanjem FT-IR spektara.



Slika 53: FT-IR spektri nativnog alginata i L-DOPA-alginata

Na Slici 53 su prikazani FT-IR spektri nativnog alginata i 5 mol% L-DOPA-alginata. Usled preklapanja većine karakterističnih traka za molekul L-DOPA sa trakama nativnog alginata (kao što su npr. trake koje potiču od sekundarne amino grupe, a preklapaju se sa širokom trakom hidroksilne grupe), ovom metodom nije moguće sa sigurnošću potvrditi uspešnost modifikacije. Slaba traka na oko 1500 cm^{-1} može da potiče od ar C-C vibracija aromatičnog prstena L-DOPA.

Da bismo dodatno okarakterisali sintetisan derivat i potvrdili uspešnost modifikacije, snimljen je i ^1H NMR spektar 5 mol% L-DOPA alginata, koji je upoređen sa spektrom nativnog alginata. Kao što se može videti na Slici 54, na hemijskim pomeranjima 6,59, 6,68 i 6,75 ppm se nalaze pikovi poreklom od tri aromatična protona iz L-DOPA, kojih nema na spektru nativnog alginata. Ovom metodom je uspešno dokazano uvođenje L-DOPA u strukturu alginata. Takođe, odsustvo pika između 9 i 10 ppm pokazuje da nema slobodnih aldehidnih grupa, tj. da su sve aldehidne grupe nastale perjodatnom oksidacijom reagovala u reakciji reduktivnog aminovanja.

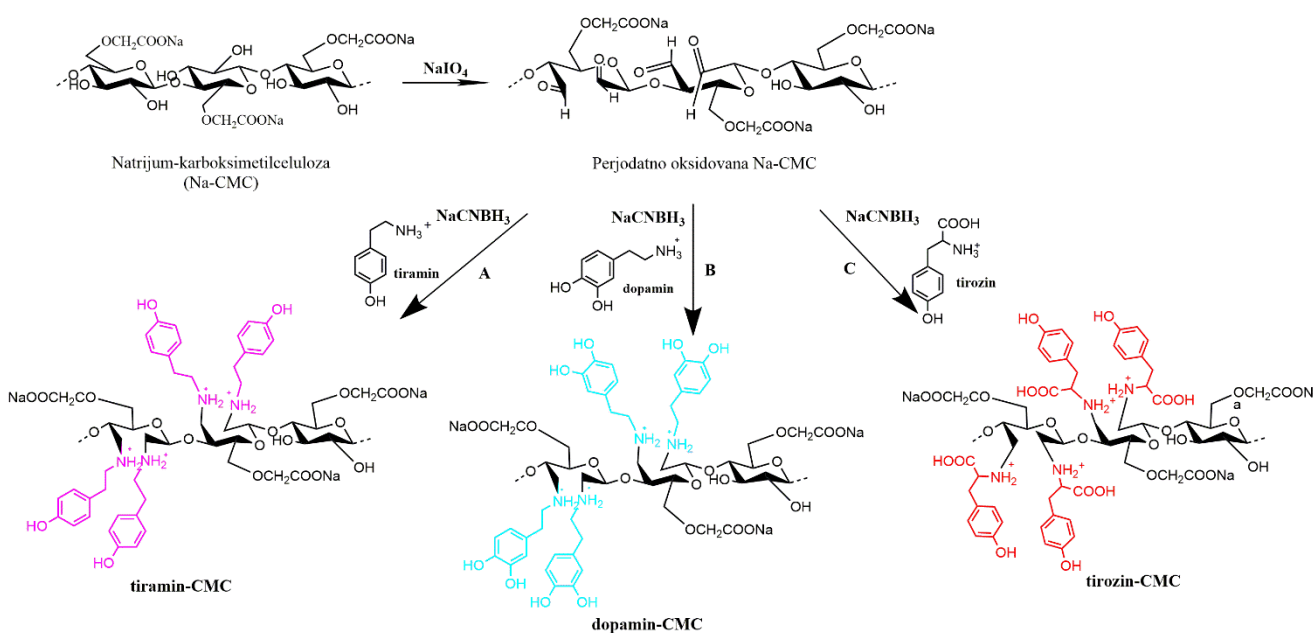


Slika 54: ¹H NMR spektar 5 mol% L-DOPA alginata i nativnog alginata

4.12. Sinteza i karakterizacija derivata karboksimetilceluloze i tiramina, tirozina i dopamina

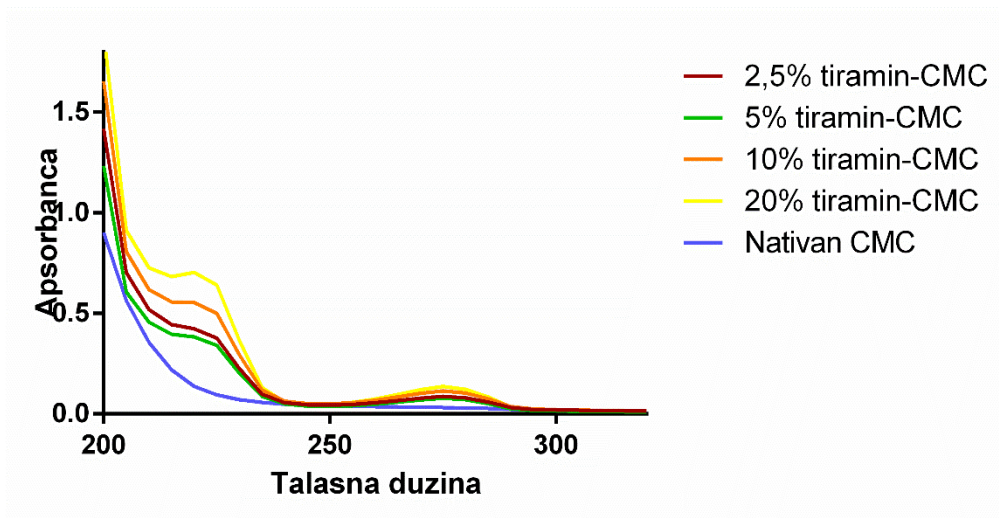
U cilju modifikacije karboksimetilceluloze (CMC) različitim fenolnim jedinjenjima, CMC je u prvom koraku oksidovan reakcijom perjodatne oksidacije sa različitim molarnim odnosima perjodata i CMC-a: 2,5, 5,0, 10,0 i 20,0 mol%. Formirane aldehidne grupe su bile ciljane grupe za sledeći korak modifikacije - reduktivnu aminaciju natrijum-cijanoborhidridom i tiraminom/tirozinom/dopaminom. Finalno je bio cilj dobiti CMC sa zakačenim nekim od

navedenih fenolnih jedinjenjem na novostvorene aldehidne grupe, preko formiranja sekundarnih amino grupa. (Šema 4)

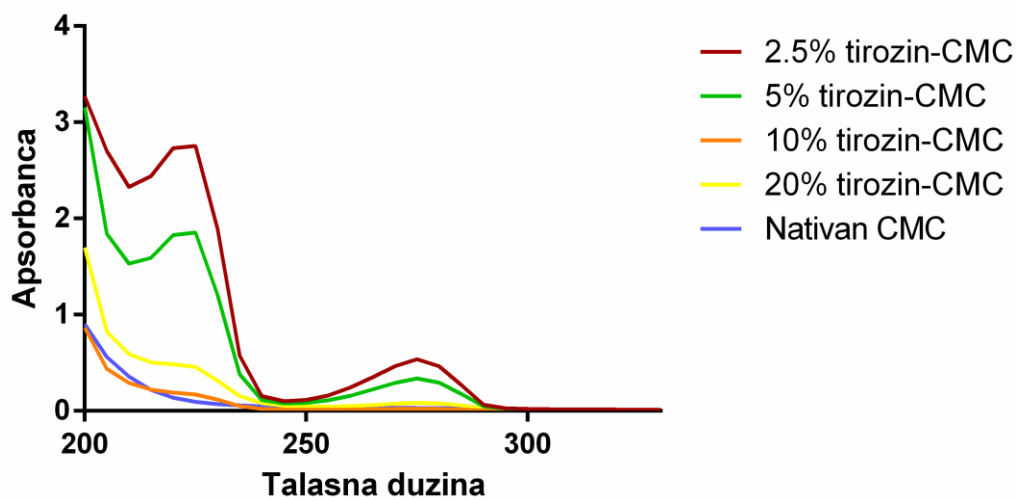


Šema 4: Modifikacija CMC-a prvobitno perjodatnom oksidacijom, a zatim reduktivnom aminacijom sa nekim od navedenih fenola: A - tiramin, B - dopamin i C - tirozin.

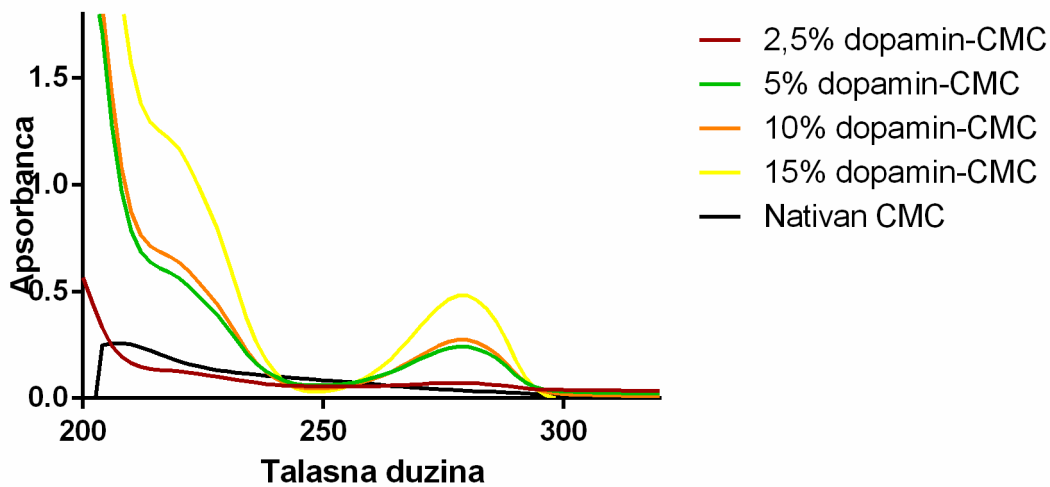
Hemijski sintetisani derivati CMC-a su okarakterisani UV-Vis spektroskopijom, kao i snimanjem FTIR spektara. Snimanjem UV-Vis spektara modifikovane CMC u opsegu talasnih dužina od 200 do 350 nm, uočeno je postojanje apsorpcionog pika na talasnoj dužini od 280 nm, koji potiče od uvedenih fenolnih grupa koje potiču od tiramina (Slika 55), tirozina (Slika 56) i dopamina. (Slika 57) Snimanjem UV-Vis spektra nativnog pektina, nije uočen apsorpcioni maksimum na 280 nm, usled odsustva hromofore koja bi mogla da apsorbuje na toj talasnoj dužini. Na Slici 55, 56 i 57 se takođe može uočiti da sa porastom količine dodatog perjodata dolazi do povećanog stepena oksidacije CMC-a, a samim tim i do povećanog broja vezanih fenolnih grupa za postojeće aldehidne grupe CMC-a, što se odražava povećanjem apsorbanse na 280 nm.



Slika 55: UV-Vis spektri nativne i modifikovane tiramin-karboksimetilceluloze sa različitim stepenom modifikacije

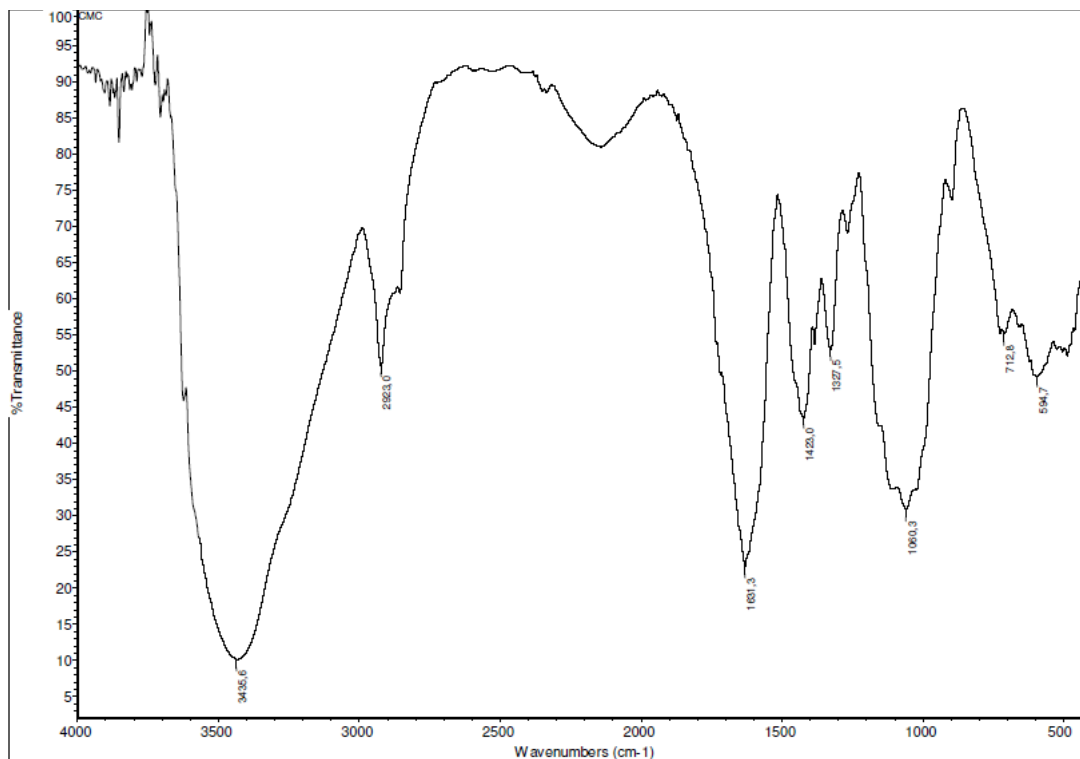


Slika 56: Uv-Vis spektri nativne i modifikovane tirozin-karboksimetilceluloze sa različitim stepenom modifikacije

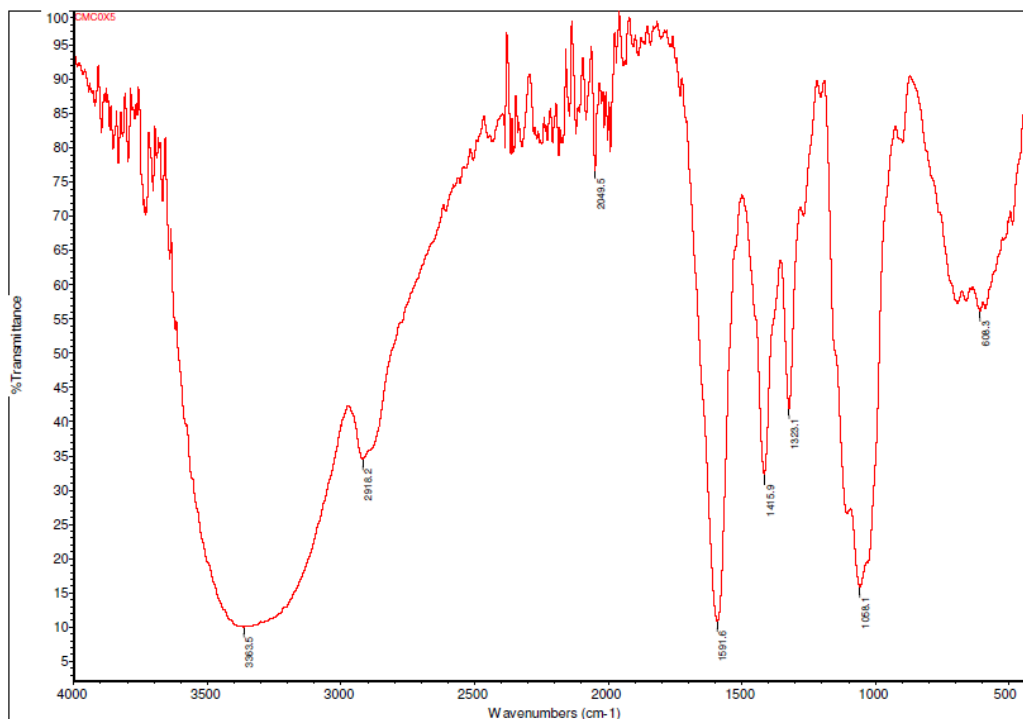


Slika 57: Uv-Vis spektri nativne i modifikovane dopamin-karboksimetilceluloze sa različitim stepenom modifikacije

Snimani su FTIR spektri nativne karboksimetilceluloze i njenih derivata: 20 mol% tiramin-CMC, 20 mol% tirozin-CMC i 5 mol% dopamin-CMC.



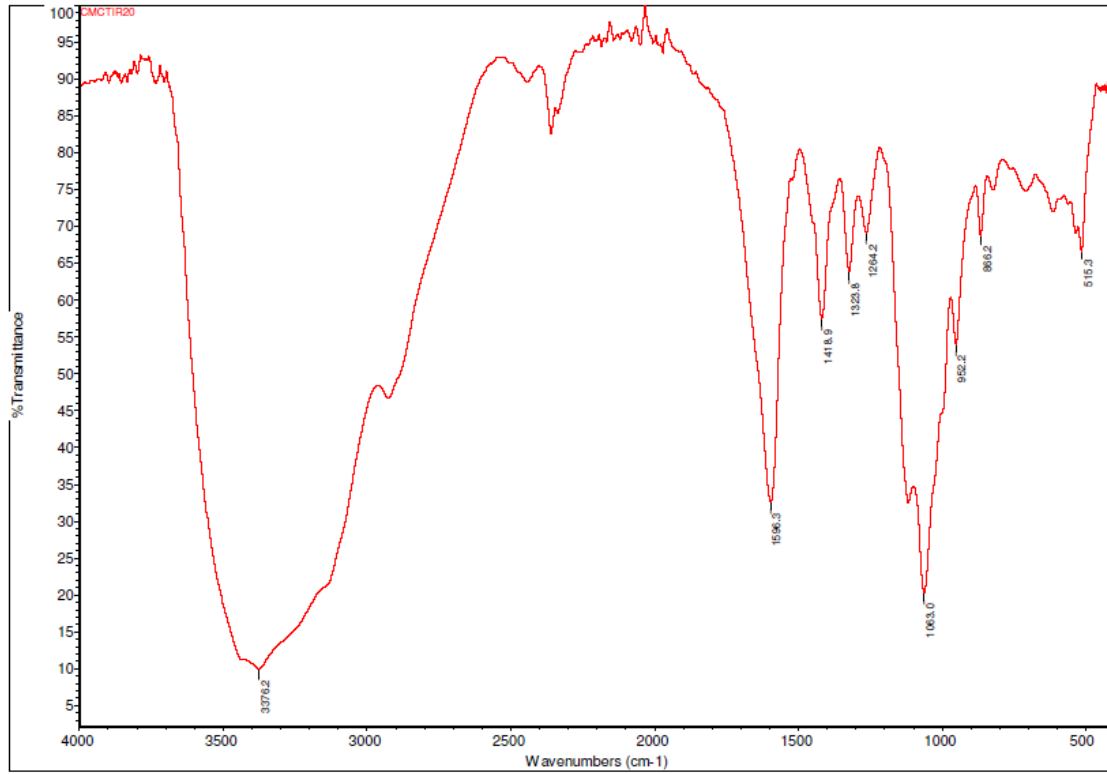
Slika 58: FT-IR spektar nativne karboksimetilceluloze



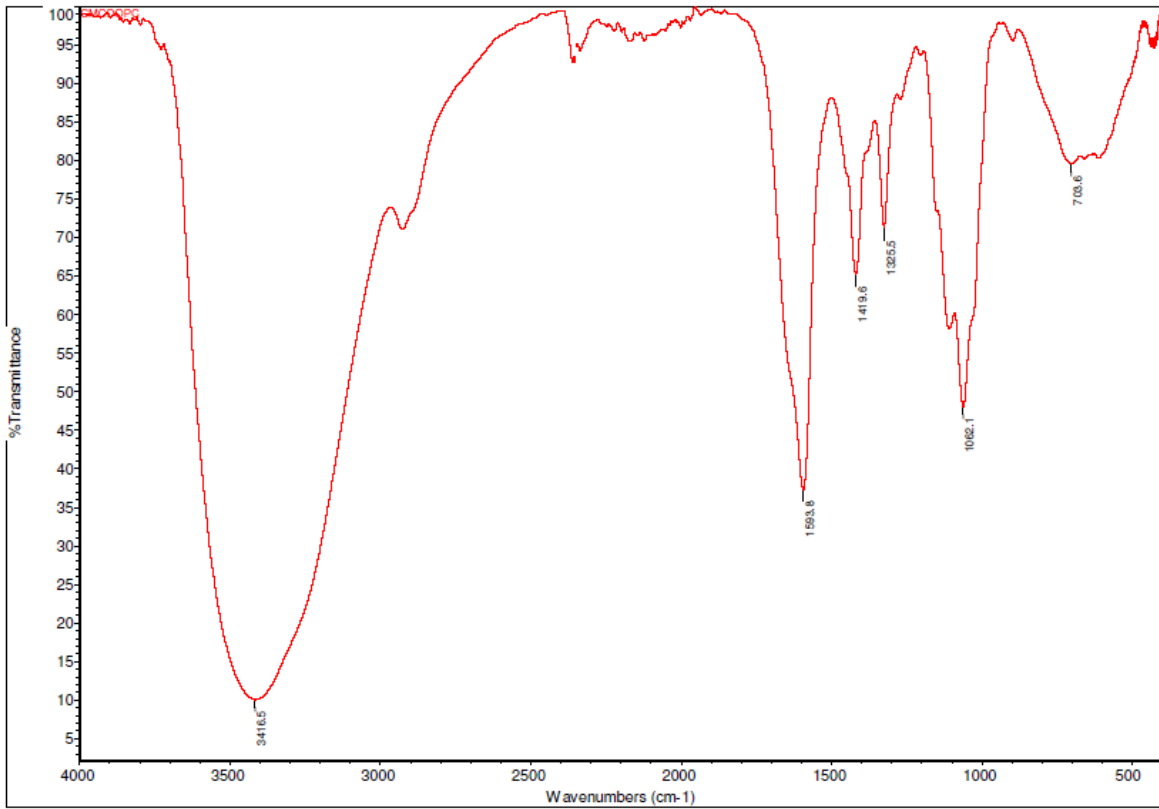
Slika 59: FTIR spektar perjodatno oksidovane karboksimetilceluloze (5 mol%)

Na FTIR spektru native CMC možemo da uočimo karakteristične pikove- vibraciona -OH, u regionu $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, C-H valencione vibracije na oko 2918 cm^{-1} , najintenzivniji pik koji potiče od karboksilne grupe na oko 1590 cm^{-1} , O-H deformacione vibracije u ravni između 1300 cm^{-1} i 1450 cm^{-1} i na 1058 cm^{-1} CH-O-CH “stretching” vibraciju.

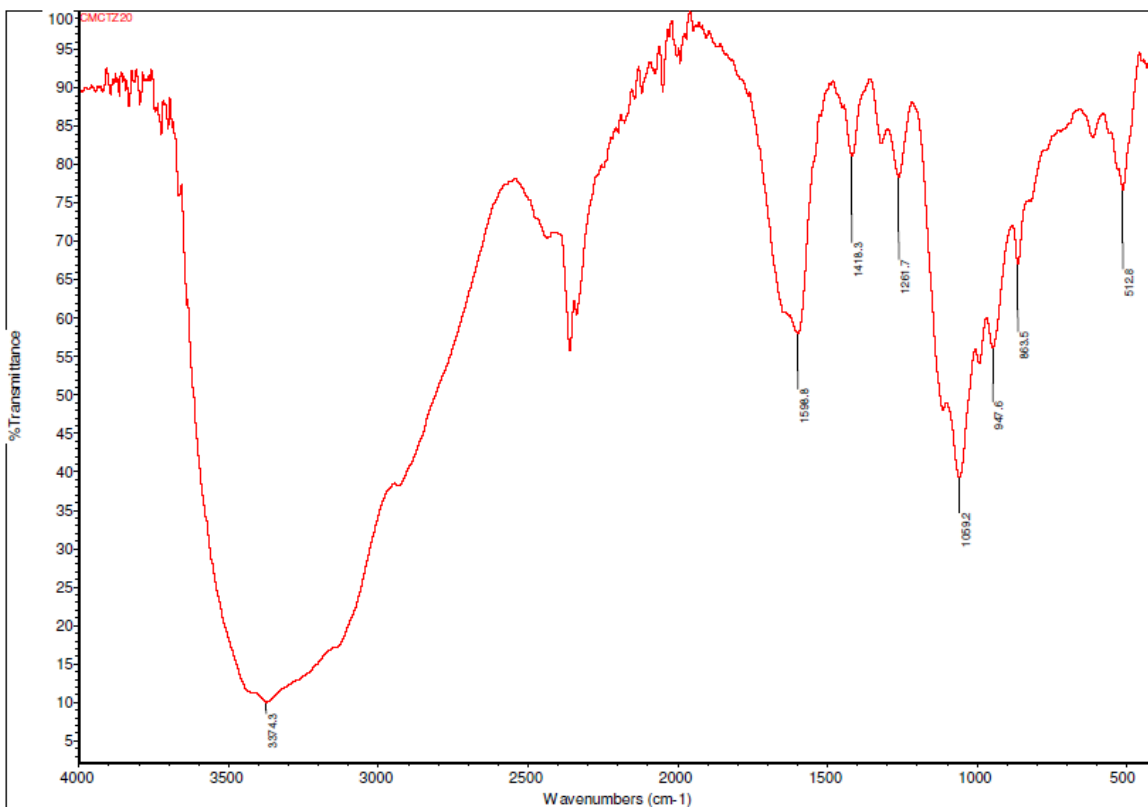
Ako uporedimo spektre native i perjodatno oksidovane CMC, možemo da uočimo da su svi pikovi intenzivniji kod oksidovanog oblika i da imamo promenu u regionu od $2000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$. Za dokazivanje prisustva aldehidne grupe, očekuju se dva pika slabijih intenziteta: jedan na 1736 cm^{-1} , koji potiče od C=O valencione vibracije kod aldehida i drugi na oko 895 cm^{-1} , koji potiče od hemiacetala, nastalog između aldehidnih grupa. Navedeni pikovi mogu biti dokaz prilikom perjodatne oksidacije i formiranja aldehidnih grupa. [265], iako su i prethodna istraživanja naglasila problematiku dokazivanja aldehidne grupe ovom metodom, zbog reakcija aldehida sa vodom i drugim funkcionalnim grupama, usled čega dolazi do preklapanja sa pikovima alkoholnih grupa.



Slika 60: FTIR spektar 20 mol% tiramin-CMC-a



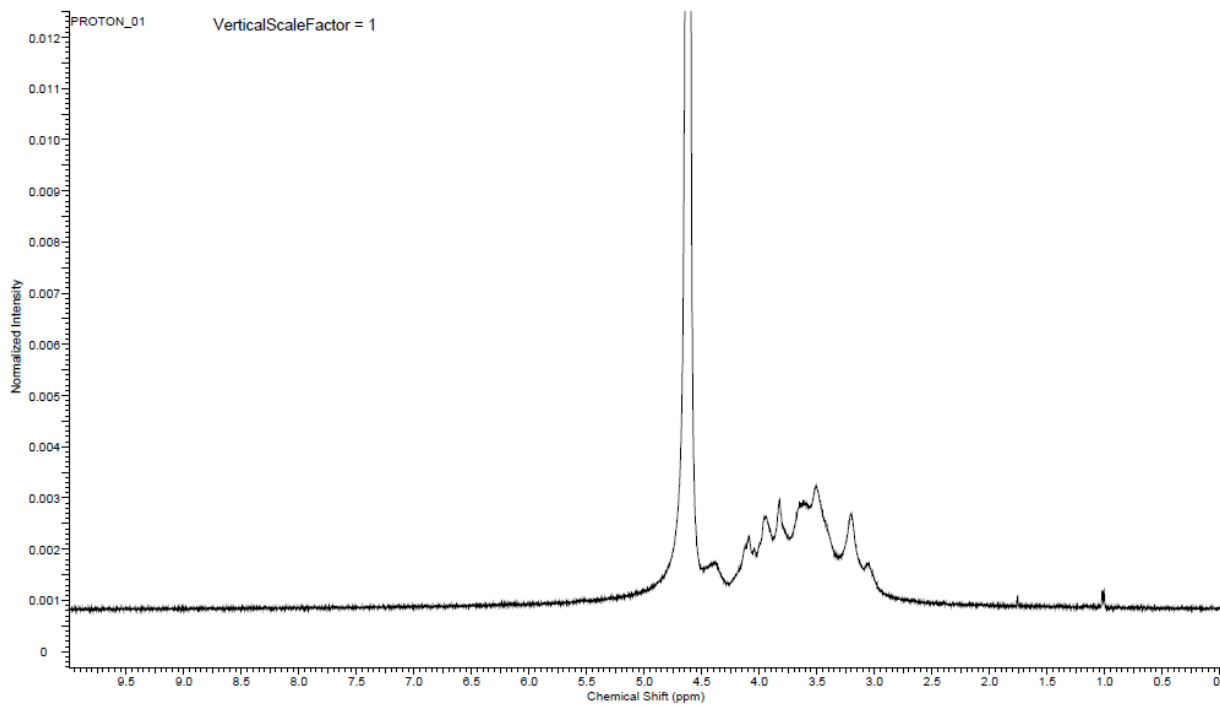
Slika 61: FTIR spektar 5 mol% dopamin-CMC-a



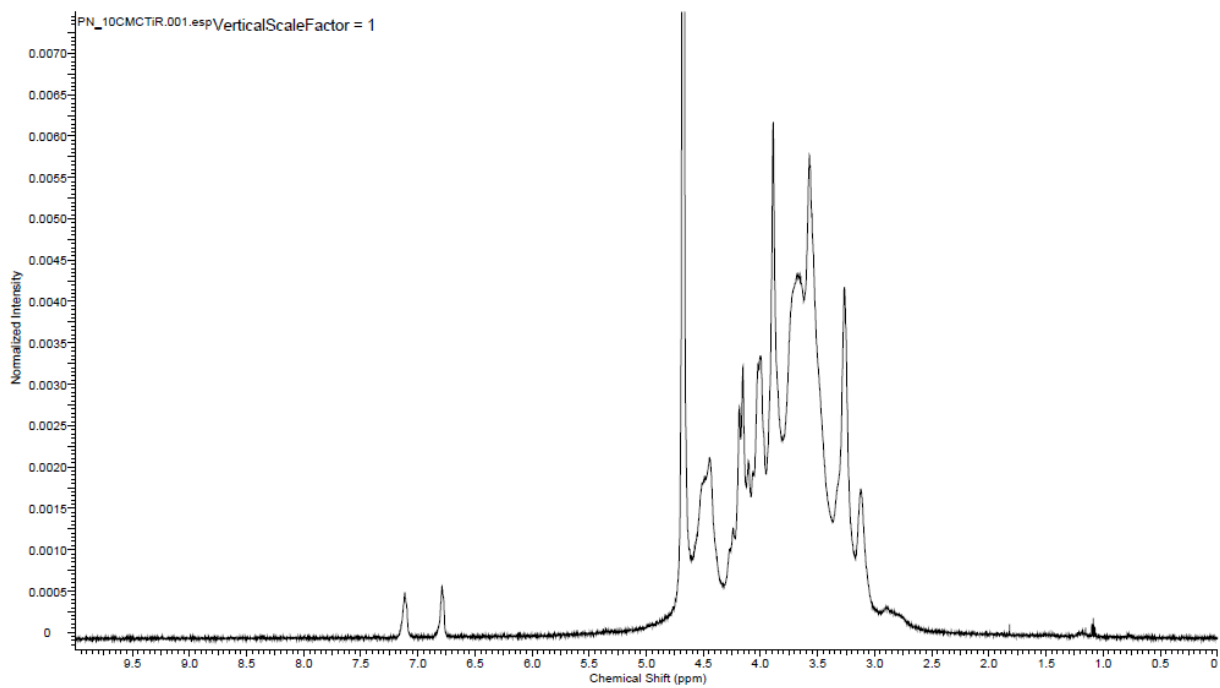
Slika 62: FTIR spektar 20 mol% tirozin-CMC-a

Na Slikama 60, 61 i 62, nema uočljivih razlika u odnosu na spektar nemodifikovane karboksimetilceluloze (Slika 58), osim što imamo smanjenje intenziteta pika na oko 1590 cm^{-1} , koji je karakterističan za COO^- grupu, pa sa ovim pretpostavljamo da je došlo do vezivanja fenola za karboksilnu grupu. Na FTIR spektrima modifikovanog alginata se ne uočava pik na 1532 cm^{-1} koji potiče od C-C strečing vibracija u prstenu [232], koji bi bio dokaz za prisustvo aromatičnih prstenova, usled preklapanja sa pikom karboksilne grupe.

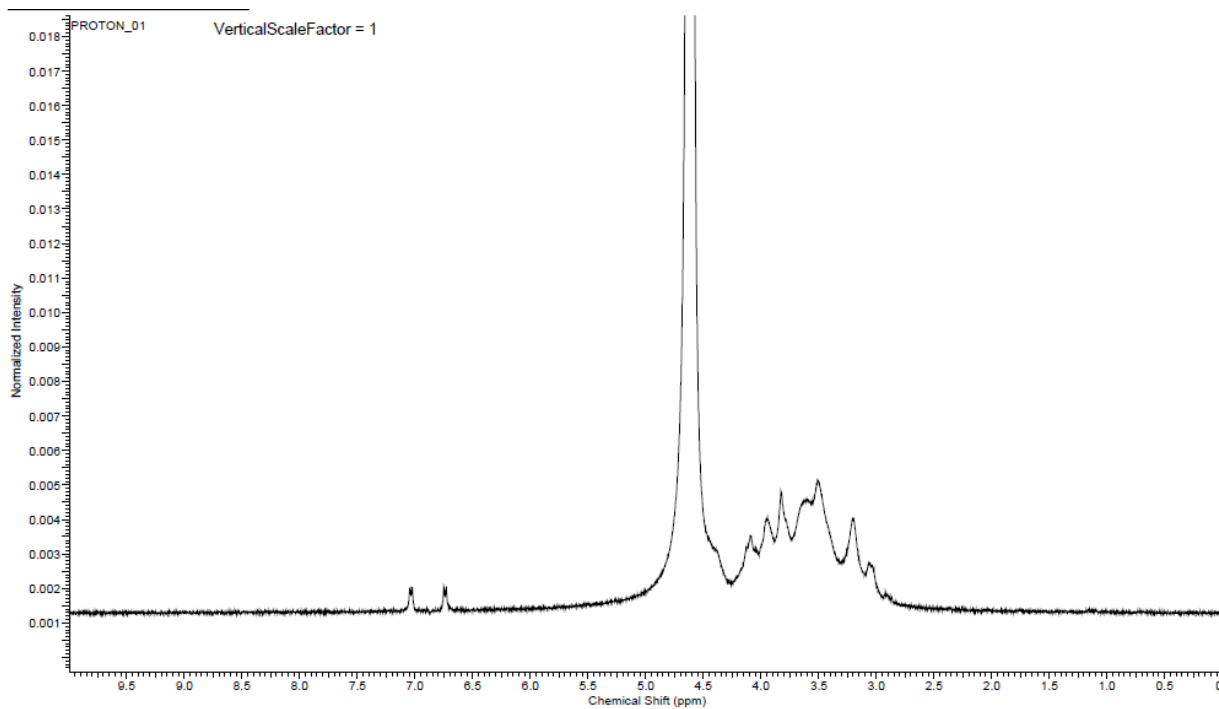
Snimljeni su i ^1H NMR spektri modifikata karboksimetilceluloze, da bi se dodatno potvrdila uspešnost modifikacije CMC-a fenolnim jedinjenjima.



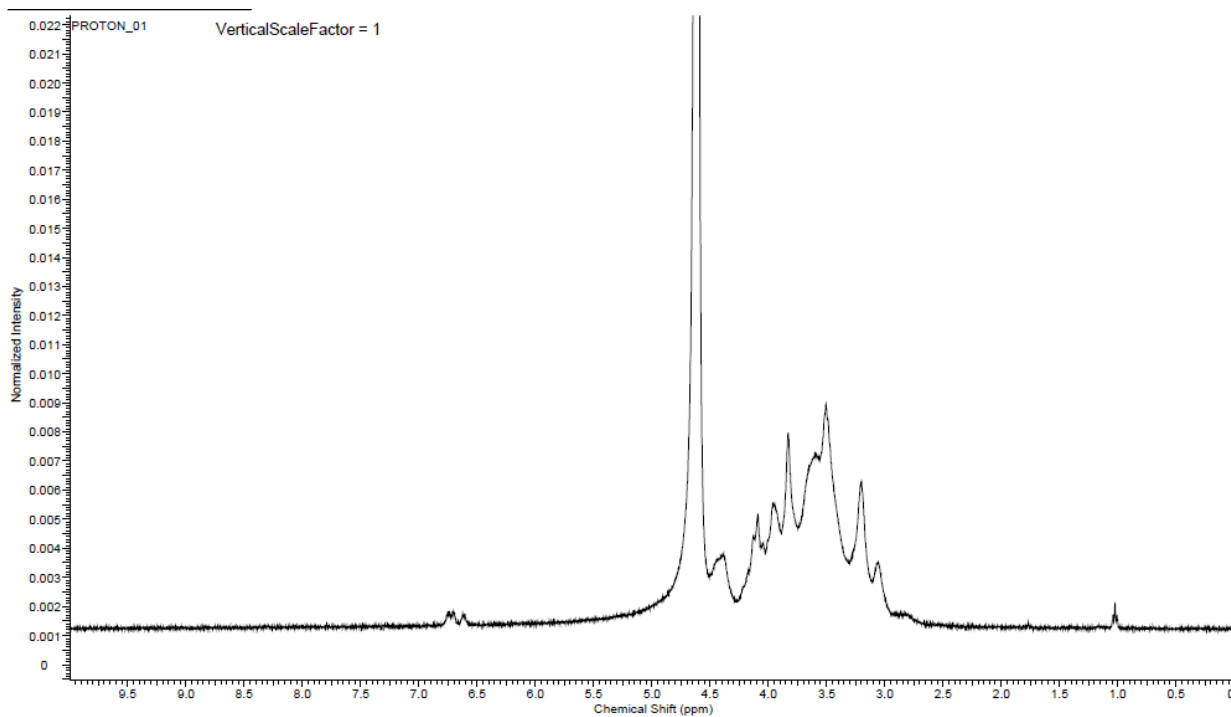
Slika 63: ^1H NMR spektar native karboksimetilceluloze



Slika 64: ^1H NMR spektar 10 mol% tiramin-CMC



Slika 65: ^1H NMR spektar 5 mol% tirozin-CMC



Slika 66: ^1H NMR spektar 10 mol% dopamin-CMC

Na osnovu ^1H NMR spektara dobijenih derivata karboksimetilceluloze sa zakačenim različitim fenolnim jedinjenjima (tiramin, tirozin i dopamin), možemo potvrditi uspešnost modifikacije,

usled postojanja pikova u region od 6 do 8 ppm, karakterističnih za vodonikove atome aromatičnog prstena. (Slike 64, 65, 66) Za razliku od fenolnih derivata CMC-a, spektar nativnog CMC-a ne pokazuje navedene pikove. (Slika 63)

4.13. Geliranje dobijenih derivata CMC-a

4.13.1. Geliranje u prisustvu vodonik-peroksida i peroksidaze iz rena

Enzimsko umrežavanje polisaharida sa ciljem dobijanja hidrogelova je ispitano u prisustvu enzima peroksidaze iz rena (HRP). Budući da su u ovom radu sintetisani fenolni derivati polisaharida, enzim sa kojim je rađeno umrežavanje je bio iz grupe fenol-oksidaza, ne bi li se umrežavanje lanca vršilo preko zakačenih fenolnih grupa. Ovaj način umrežavanja tiraminskih derivata polimera je prethodno ispitan i dokazan kao uspešan. [241]

Umrežavanje je ispitivano sa tiramin-, tirozin-karboksimetilcelulozom, po već navedenim uslovima. U slučaju tiramin-karboksimetilceluloze je došlo do stvaranja hidrogela. (Slika 67)



Slika 67: Uspešno gelirana tiramin-karboksimetilceluloze u prisustvu peroksidaze iz rena i vodonik-peroksida

Geliranjem tirozin-karboksimetilceluloze nismo dobili hidrogel, uprkos optimizaciji uslova (koncentraciji dodate peroksidaze, koncentraciji dodatog vodonik-peroksida, promeni masene koncentracije rastvora polimera). Mogući razlog za sprečenu oksidaciju tirozina i samim tim i

geliranje polimera je sterna zaklonjenost i nemogućnost vezivanja supstrata za aktivno mesto enzima. Pri ispitivanju oksidacije tirozina dvema različitim peroksidazama (mangan-peroksidaza i HRP), utvrđena je mnogo veća efikasnost mangan-peroksidaze u odnosu na HRP. [266] Razlog za slabu efikasnost oksidacije tirozina HRP-om je sterna smetnja, koja sprečava “dobro prijanjanje” aromatičnog prstena tirozina za aktivno mesto enzima. Ovo se može objasniti različitim enzimskim mehanizmom, gde je u slučaju HRP-a mehanizam oksidacije takav da je neophodno vezivanje supstrata za enzim (kontaktna hidroliza), dok se oksidacija mangan-peroksidazom odigrava indirektnom katalizom.

4.13.2. Geliranje u prisustvu natrijum-perjodata u baznoj sredini

Usled literaturnih podataka o oksidaciji katehola u prisustvu natrijum-perjodata, i potencijalne dalje radikalske polimerizacije kateholskih derivata, isprobano je umrežavanje dopaminskog derivata ovom metodom. [247] Odmah nakon mešanja rastvora polimera sa baznim rastvorom perjodata je došlo do promene boje u narandžastu, a nakon toga do promene u braon boju i do formiranja gela. (Slika 68)



Slika 68: Uspešno formiran hidrogel 5 mol% dopamin-karboksimetilceluloze u prisustvu natrijum-perjodata u baznoj sredini

4.13.3. Geliranje modifikata CMC-a u prisustvu neorganskih soli

Geliranje tiraminskih i tirozinskih derivata CMC-a je takođe ispitivano i sa dodatkom soli barijuma (II), gvožđa (II) i aluminijuma (III). Uz dodatak navedenih soli su se dobijani talozi koji su bili nerastvorni u vodi. Isprobano je njihovo rastvaranje u EDTA, gde je usled kompleksiranja

katjona došlo do rastvaranja dobijenih taloga. Da bi se sprečilo rastvaranje u helirajućim rastvorima, pored taloženja katjonima, istovremeno je vršeno i enzimsko umrežavanje sa HRP-om i vodonik-peroksidom. Ovako dobijeni gelovi su bili nerastvorni u EDTA ili su se nakon dužeg vremena rastvarali.

4.14. Elektrospining dopamin-karboksimetilceluloze i dopamin-alginata

Elektrospining metodom su pravljena nanovlakna od različitih modifikata dopamin-karboksimetilceluloze i dopamin-alginata. Urađena je optimizacija uslova pripreme rastvora polimera, kao i uslova samog elektrospininga. Pre elektrospininga su vodeni rastvori polimera mešani sa PEG-om, Tritonom X-100 i DMSO da bi se dobila željena tekstura koja može lepo da se izvlači u niti, a da pri tom ne dolazi do kapljanja rastvora ili prekidanja niti. Dokazano je da alginat ne može sam da se elektrospiniuje, verovatno zbog nedostatka preplitanja lanca i krutosti lanca alginata. Na početku je za elektrospinoвање alginat mešan sa glicerolom, ne bi li se povećala njegova fleksibilnost usled ometanja jakih inter- i intramolekulskih vodoničnih veza lanca. [267, 268] Danas se za ovu svrhu alginat meša sa drugim biokompatibilnim polimerima, kao što su polietilenglikol (PEG), polietilenoksid (PEO) ili polivinil-alkohol (PVA). [269] Pored mešanja sa drugim polimerima, sposobnost elektrospinoavanja poboljšava se i dodatkom sufraktanata koji smanjuju površinski napon, kao što su Triton X-100, lecitin, itd. [268] Često se u smešu za elektrospining dodaje i DMSO, kao korastvarač za poboljšanje strukture. Korišćenjem DMSO dolazi do dipol-dipol interakcija između alginatnog lanca i molekula dimetil-sulfoksida, što dovodi do slabljenja interakcija unutar alginatnog lanca i samim tim do olakšanog spinoavanja. [270] Dokazano je da mešanje male količine Tritona X-100 i DMSO-a sa smešom za spinoavanje nema uticaj na strukturu nanovlakana, kao i da je njihovo uklanjanje veoma lako tokom procesa ispiranja vlakana. Pored toga, većina DMSO-a ispari tokom procesa elektrospinoavanja. [270]

U odnosu na native polimere, njihovi dopaminski derivati su pokazali bolju sposobnost elektrospinoavanja. Povećanje stepena modifikacije je dovelo do smanjenja molekulske mase alginata, pa je bilo moguće koristiti rastvor polimera veće masene koncentracije u odnosu na natičan alginat, koji je pri toj koncentraciji bio veoma viskoznan i samim tim nije mogao da se spiniuje. Takođe je pokazano da sa modifikacijama alginata može doći do ometanja inter- i intramolekulskih vodoničnih veza između karboksilnih i hidroksilnih grupa alginata, koje su

odgovorne za krutost alginata i njegovo otežano spinovanje, pa je samim tim spinovanje alginata bilo olakšano. [268] Ovo je dokazano kod sulfonovanog alginata, čija masena koncentracija u rastvoru za spinovanje je povećana na čak 50 %. [271]

4.14.1. Umrežavanje nanovlakana

Alginat, CMC, PEG, sve komponente koje su korišćene za pripremu nanovlakana su rastvorne u vodenim rastvorima, što je oprečno potrebama tkivnog inženjeringa. Materijali za tkivni inženjering treba da budu otporni u vodenoj sredini (medijumi za gajenje ćelija, ljudski organizam, itd.) Jedan od načina za poboljšanje otpornosti nanomaterijala je njihovo umrežavanje.

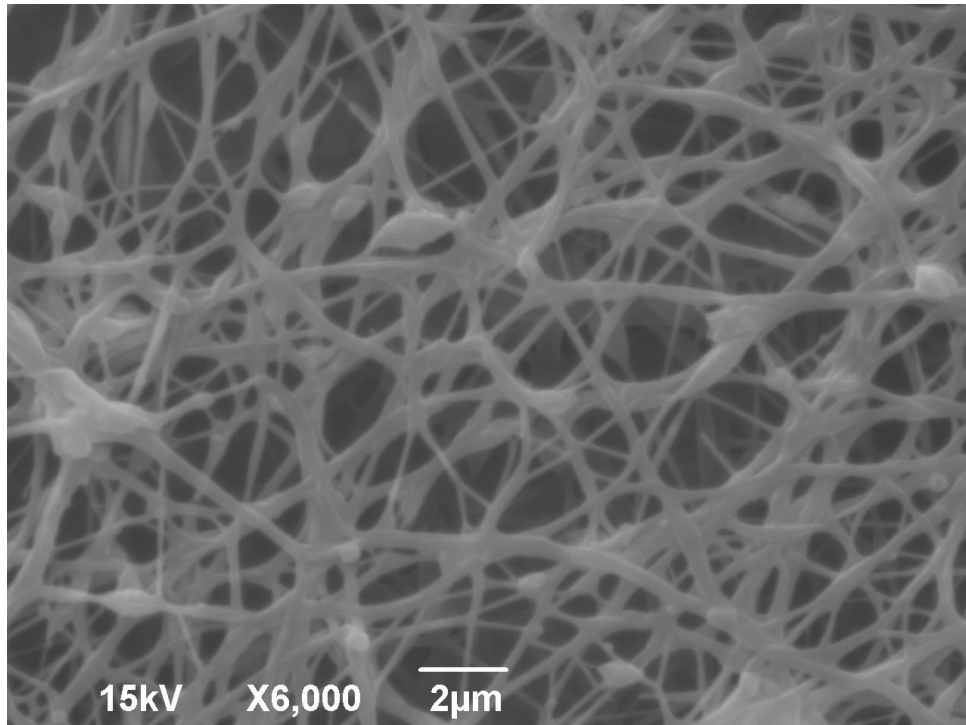
Dobijena vlakna su prvobitno snimana na optičkom mikroskopu, da bi se potvrdilo njihovo prisustvo. Nakon toga su ispirana i umrežavana prvo u rastvoru barijuma, a zatim i u prisustvu natrijum-perjodata, ne bi li se dobila vlakna koja nisu rastvorna u vodi. Neophodna svojstva nanovlakana za potrebe tkivnog inženjeringa, pored biokompatibilnosti, su otpornost u vodenim rastvorima i netoksičnost. Klasično umrežavanje vlakana alginata je u praksi najčešće rađeno sa dvovalentnim katjonima, gde dolazi do vezivanja kalcijuma i karboksilnih grupa alginata i formiranja gela. Ovako umrežena vlakna su se pokazala kao neotporna na rastvore soli i rastvore sa helirajućim agensima, gde dolazi do njihovog raspadanja usled izmene jona i “izvlačenja” kalcijumovih jona iz alginatnog gela. Ovaj problem je uspešno rešen dvostrukim umrežavanjem nanovlakana, gde se nakon jonskog umrežavanja vrši dodatno kovalentno umrežavanje. [270] Da ne bi došlo do degradacije polimera koji je inače rastvoran u vodi tokom procesa kovalentnog umrežavanja, osmišljena je strategija dvostrukog umrežavanja, gde se prvo vrši jonsko umrežavanje nanovlakana, koja su onda stabilna za sledeću reakciju kovalentnog umrežavanja.

Iz navedenih naloga je u ovom radu nakon inkubacije vlakana u rastvoru barijuma rađeno i dodatno umrežavanje natrijum-perjodatom. Na ovaj način je došlo do kovalentnog umrežavanja alginata preko vezanog dopamina. Ovakav način umrežavanja kateholskih derivata polimera je do sada rađen u praksi i pokazao se kao pouzdan metod za formiranje hidrogelova. [247, 272, 273] Pored formiranja stabilnih, kovalentnih veza, prednost korišćenja perjodatnog umrežavanja je i što nema upotrebe toksičnih umreživača, koji bi dalje onesposobili vlakna za gajenje ćelija. Do sada kao kovalentni umreživači alginata najčešće korišćeni epihlorhidrin, glutaraldehid, heksametilen-diizocijanat (HMDI) i hidrazid adipinske kiseline (ADA). [270] Međutim korišćenje ovih umreživača zahteva postojanje ekstremnijih uslova (veoma bazna ili kisela sredina, prisustvo

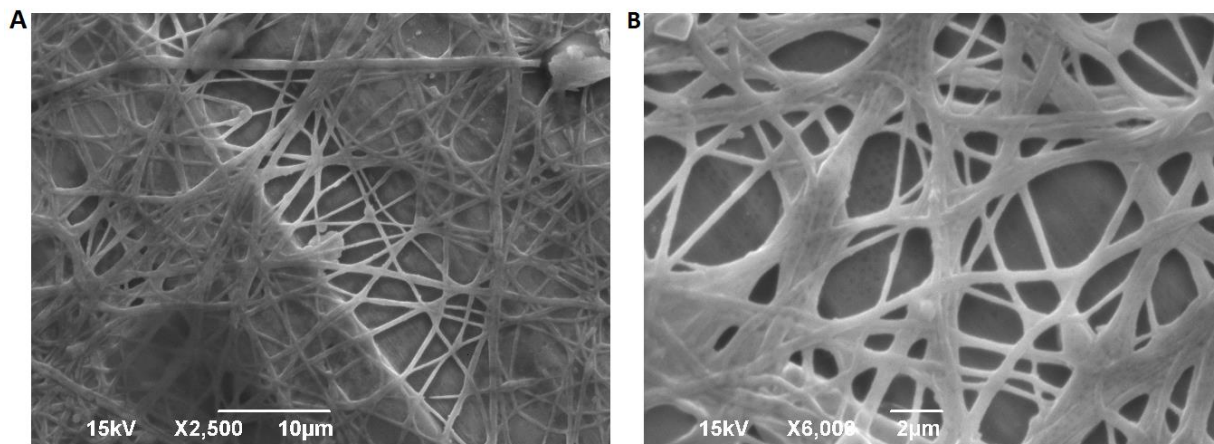
organskih rastvarača zbog smanjenje rastvorljivosti u vodi, itd.), koji mogu da dovedu do potencijalnih oštećenja nanovlakana.

4.14.2. Karakterizacija nanovlakana na SEM

Nanovlakna dobijena od 10 mol% i 20 mol% dopamin-alginata su pokazala veću otpornost na ispiranja od 10 mol% dopamin-karboksimetilceluloze, zbog čega su dopamin-alginatna vlakna dalje okarakterisana SEM mikroskopijom. (Slika 69 i Slika 70)

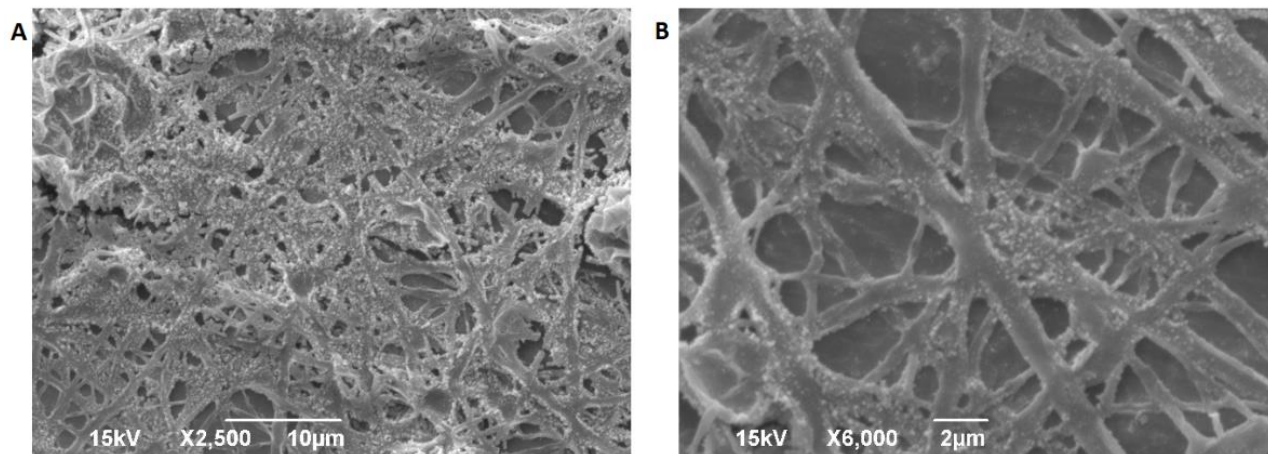


Slika 69: Nanovlakna 10 mol% dopamin-alginata dobijena elektrospining metodom i slikana na SEM-u



Slika 70: Nanovlakna 20 mol% dopamin-alginata dobijena elektrospining metodom i slikana na SEM-u sa uvećanjem: a) 2500 i b) 6000 puta

Na Slici 71 se može videti kako izgledaju vlakna dobijena od 20 mol% dopamin-alginata nakon umrežavanja natrijum-perjodatom. U poređenju sa vlaknima koja nisu dodatno umrežavana (Slika 70), može se jasno uočiti promena u strukturi, gde više nemamo jasno razdvojena vlakna, već je došlo do njihovog umrežavanja i “spajanja”. Ovakva vlakna su pokazala nerastvorljivost u vodenim rastvorima i dalje su korišćena za gajenje ćelija.

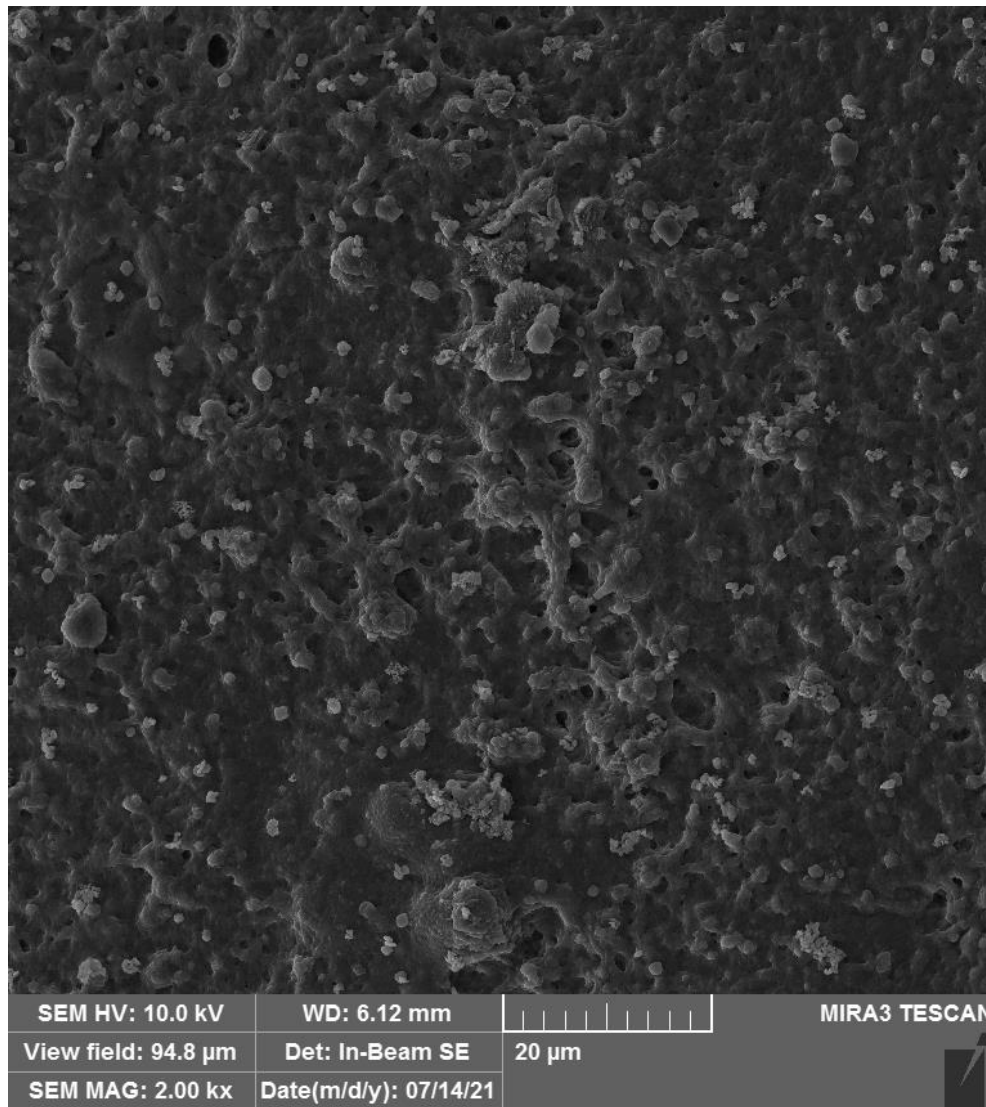


Slika 71: SEM fotografija umreženih nanovlakana 20 mol% dopamin-alginata sa natrijum-perjodatom, sa uvećanjem: a) 2500 i b) 6000 puta

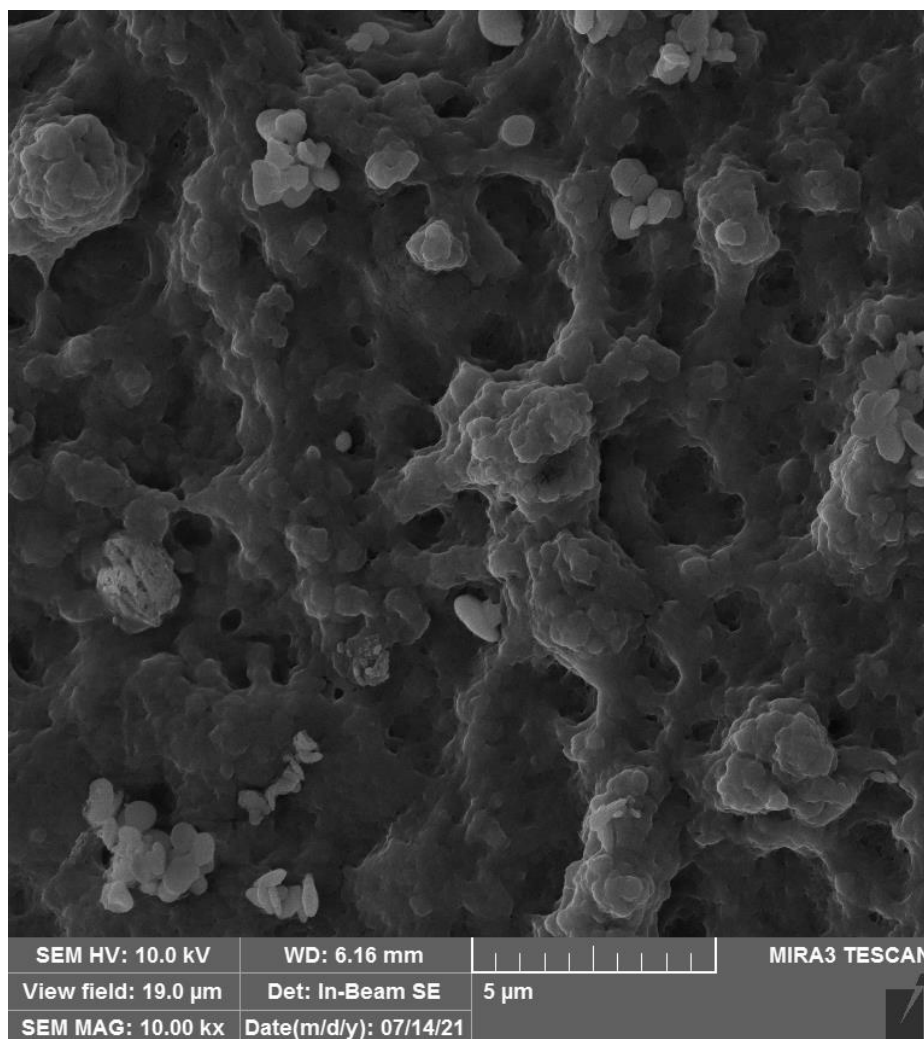
Smanjenje veličine pora kod umreženog uzorka može da se objasni stvaranjem dodatnih veza između nanovlakana i samim tim nastaje gušća mreža koja je rezultat unakrsnog povezivanja. Ovakvo ponašanje prilikom umrežavanja nanovlakana je prethodno uočeno i u drugim studijama. [274, 275]

4.15. Gajenje ćelija na nanovlaknima

Nakon umrežavanja nanovlakana barijumom i perjodatom, dobijena nanovlakna su pripremana za gajenje humanih ćelija po protokolu koji je naveden u sekciji 3.16. Dobijena vlakna sa ćelijama su snimana na elektronskom mikroskopu, da bi se dokazalo prisustvo ćelija na vlaknima. Na mikroskopskim snimcima (Slike 72 i 73) se vide ćelije i struktura skafolda sa porama.



Slika 72: SEM fotografija sa manjim uvećanjem nanovlakana 20 mol% dopamin-alginata sa ćelijama



Slika 73: SEM fotografija sa većim uvećanjem nanovlakana 20 mol% dopamin-alginata sa ćelijama

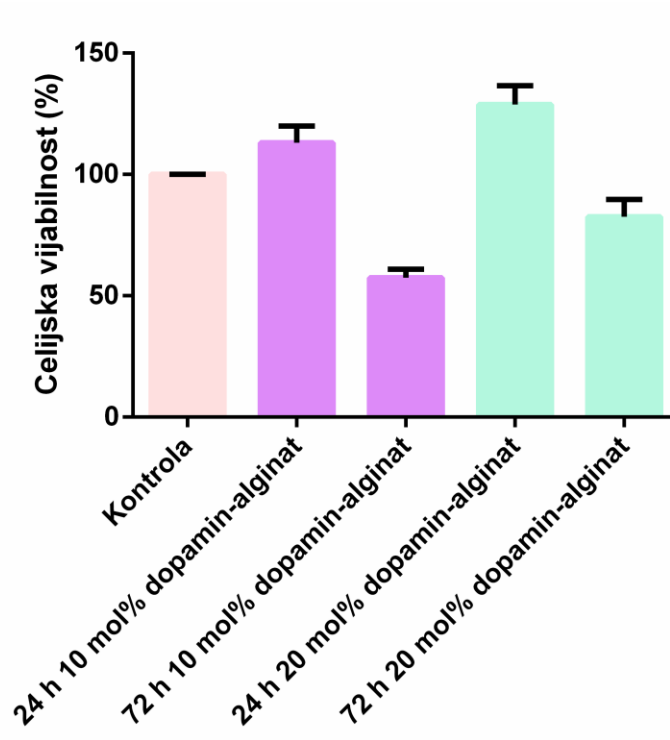
Da bi sisarske ćelije preživele, veoma je bitna njihova adhezija za matriks, koja ima uticaj na ćelijsku funkciju u dvodimenzionalnom i trodimenzionalnom mikrokruženju. Alginat, kao veoma hidrofilan polisaharid, je pokazao nemogućnost adhezije ćelija, jer ne može da apsorbuje serumske protein. Iz ovog razloga se modifikovani alginati koriste u tkivnom inženjeringu, pa je tako npr. kovalentnim vezivanjem peptida za alginat postignuta adhezija ćelija, i njihova proliferacija na nanovlaknima. [269]

4.15.1. MTT esej

Testiranje citotoksičnosti pripremljenih nanovlakana kao skafolda (scaffold) za gajenje ćelija je ispitano standardizovanim MTT protokolom. (Laboratory for Bioengineering protocol CB-005) MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum bromid) je u vodi rastvorna

tetrazolijum so, koja ima mogućnost konverzije u metabolički aktivnim ćelijama, do ljubičastog, u vodi nerastvornog porizvoda, reakcijom redukcije sa enzimom dehidrogenazom. Finalni proizvod, formazan, ne može da prođe kroz ćelijsku membranu, što dovodi do njegovog taloženja u zdravim ćelijama. Promena boje ćelija je indikator vijabilosti ćelija.

Zdrave ćelije fibroblasta izolovane iz pleure pluća, MRC-5 aplicirane su na skafolde, a citotoksičnost je određivana 24 i 72 h nakon zasejavanja. Nakon 24 h ćelije pokazuju povećanu proliferaciju u odnosu na kontrolne ćelije. Međutim, nakon 72 h od zasejavanja ćelijska vijabilnost opada. Razlog može biti degradacija skafolda gde jedna od primenjenih komponenti u produkciji skafolda poseduje određenu toksičnost ili pak odvajanje ćelija sa skafolda tokom njegove degradacije, što je verovatniji proces jer bi se slična ćelijska vijabilnost očekivala već nakon 24 h. Jedan od zaključaka jeste da je potrebno uraditi dodatne modifikacije skafolda, u smislu dobijanja polimera sa smanjenom rastvorljivošću u vodi, kako bi zasejane ćelije imale vremena da proliferišu i prorastu skafold čineći tkivo.



Slika 74: MTT esej ćelijske vijabilnosti ćelija zasejanih na: 10 mol% dopamin-alginatu, 20 mol% dopamin-alginatu, nakon 24 i 72 h

5. Zaključci

Modifikacije alginata, pektina i karboksimetilceluloze fenolnim jedinjenjima su izvršene prvobitnom perjodatnom oksidacijom, uz stvaranje dialdehidnih grupa. Nakon toga su oksidovani derivati polimera dalje podvrgnuti reduktivnoj aminaciji u prisustvu različitih fenolnih supstrata (tiramin, tirozin, dopamin i L-DOPA) i natrijum-cijanoborhidrida kao redukcionog sredstva. Dobijeni su polimerni derivati sa zakačenim fenolnim komponentama, preko novostvorenih, stabilnih amino grupa.

Uspešnost modifikacija je ispitivana UV-Vis, FTIR i ^1H NMR spektroskopijom. Snimanjem UV-Vis spektara u opsegu talasnih dužina od 200 do 350 nm, uočena je pojava apsorpcionog maksimuma na talasnoj dužini od 280 nm kod svih dobijenih derivata, koji potiče od vezanih fenolnih grupa. UV-Vis spektri nativnog pektina, alginata i CMC-a ne poseduju apsorpcioni maksimum na ovoj talasnoj dužini, usled odsustva hromofore koja bi mogla da apsorbuje na toj talasnoj dužini. Variranjem količine dodatog perjodata u prvom koraku sinteze je došlo do povećanog stepena oksidacije, a samim tim i do povećanog broja vezanih fenolnih grupa, što se odražava povećanjem apsorbanse na 280 nm.

FT-IR spektroskopijom se uspešnost modifikacija nije mogla sa sigurnošću potvrditi, usled preklapanja većine karakterističnih traka za fenole i amine sa trakama nativnih polisaharida. Zbog toga je karakterizacija dodatno rađena snimanjem ^1H NMR spektara. Snimljeni ^1H NMR spektri fenolnih derivata alginata, pektina i CMC-a imaju karakteristične pikove koji potiču od vodonikovih atoma aromatičnog prstena, u regionu od 6 do 8 ppm, za razliku od spektara nativnih polisaharida koji ne sadrže ove pikove. Sa ovim je jasno dokazano prisustvo fenolnih grupa.

Ispitana je sposobnost dobijenih derivata da grade hidrogelove, u prisustvu enzima (lakaze; peroksidaze iz rena i vodonik-peroksida), kao i u prisustvu različitih katjona (kalcijum, aluminijum, gvožđe) i u prisustvu natrijum-perjodata.

Enzimsko umrežavanje fenolnih derivata polisaharida sa ciljem dobijanja hidrogelova je ispitivano u prisustvu enzima koji pripadaju grupi fenol-oksidaza (peroksidaze i lakaze), da bi se umrežavanje vršilo preko zakačenih fenolnih grupa. Umrežavanje tiramin- i tirozin-karboksimetilceluloze je rađeno u prisustvu HRP/ H_2O_2 . Tiraminski derivati su uspešno gradili

hidrogelove, dok tirozinski nisu pokazali sposobnost građenja hidrogela. Moguć razlog za sprečenu oksidaciju tirozina peroksidazom, a samim tim i sprečeno geliranje polimera, je sterna zaklonjenost i nemogućnost vezivanja supstrata za aktivno mesto ovog enzima.

Geliranje tiraminskih i tirozinskih derivata CMC-a je rađeno u prisustvu soli barijuma (II), gvožđa (II) i aluminijuma (III). Nastali su talozi, koji se nisu rastvarali u vodi, ali su se rastvarali u prisustvu helirajućih agenasa. Da bi se sprečilo rastvaranje u helirajućim rastvorima, koje bi eventualno ometalo dalju primenu, rađeno je i dodatno umrežavanje enzimom. Ovakvi hidrogelovi su bili otporni na dejstvo helirajućih agenasa.

Dopaminski derivat CMC-a, kao i derivati alginata i pektina su uspešno gradili hidrogelove u prisustvu natrijum-perjodata, u baznoj sredini, dajući karakterističnu braon boju gela. Brza reakcija geliranja, pri jednostavnim i jeftinim uslovima, je bila razlog da se ovaj način geliranja iskoristi u reakciji polimerizacije dobijenih nanovlakana.

Lakaza poreklom iz *Streptomyces cyaneus* je uspešno eksprimirana na površini *Saccharomyces cerevisiae* kvasca. Čelije kvasca sa eksprimiranom lakazom na površini su pokazivale enzimsku aktivnost sa ABTS-om kao supstratom, dok čelije prethodno transformisane praznim pCTCON2 vektorom nisu imale enzimsku aktivnost. Sa ciljem povećanja enzimske aktivnosti, izvršeno je liziranje ćelija kvasca organskim rastvaračem, pri čemu je došlo do razaranja ćelijskog zida i ispuštanja unutrašnjeg sadržaja ćelije. Dobijeni ćelijski zidovi sa zakačenom lakazom su pokazali 310 puta veću enzimsku aktivnost od celih ćelija sa lakazom.

Da bi se ćelijski zidovi sa enzimom mogli koristiti u bač sistemima, pri čemu bi bilo olakšano njihovo odvajanje od smeše, izvršena je njihova imobilizacija u kalcijum-alginatnim kuglicama. Pored nativnog alginata, kao imobilizacioni matriks je korišćen i dopamin-alginat. Osim formiranja kuglica u prisustvu katjona, kod dopaminskog derivata je očekivano i dodatno, kovaletno umrežavanje polimera, preko dopaminskih molekula u prisustvu lakaze. Ispitivan je uticaj dodatnog umreženja kuglica na stabilnost kuglica, kao i biokatalitičku aktivnost imobilizovanog enzima.

Pokazalo se da ćelijski zidovi sa lakazom imobilizovani u dopamin-alginatu, imaju 2 puta veću specifičnu aktivnost u odnosu na one imobilizovane u nativnom alginatu. Zbog toga su u daljim eksperimentima korišćeni samo imobilizati sa dopamin-alginatom.

Imobilizovani ćelijski zidovi su pokazali veću stabilnost na optimalnom pH za lakazu, u odnosu na neimobilizovane. Sa povećanjem temperature je došlo do značajnijeg pada aktivnosti slobodne lakaze u odnosu na imobilizovanu, pa su tako nakon 1 h inkubiranja na temperaturi od 60 °C, slobodni ćelijski zidovi sa lakazom zadržali 69 % svoje početne aktivnost, dok su imobilizovani zadržali čak 93 %. Određeni su i kinetički parametri za imobilizovane i slobodne ćelijske zidove. Dobijena niža vrednost K_m za imobilizovan enzim je uzrokovana difuzionim ograničenjima nastalim usled prisustva imobilizacionog matriksa, što je u skladu sa prethodnim studijama, gde je takođe dolazilo do pada K_m vrednosti usled imobilizacije lakaze u Ca-alginatne kuglice.

Imobilizovani ćelijskih zidova sa lakazom su testirani za uklanjanje tekstilnih boja: Amido Black 10B, Methylene Blue, Guinea Green, Reactive Black 5, Methyl green, Evans Blue, Crystal Violet i Remazol Brilliant Blue. Kuglice su inkubirane u boji tokom 48 časova, bez dodataka redoks medijatora. Najveći stepen dekolorizacije je dobijen za boje Amido Black 10B i Evans Blue, $63,8 \pm 9,7$ % i $63,9 \pm 7,4$ %, navedenim redom. Primenjen biokatalizator se nije pokazao uspešnim za boju Methyl Green, dok je za boje Reactive Black 5 (RB5) i Remazol Brilliant Blue (RBBR), stepen dekolorizacije nakon 48 h iznosio $58,2 \pm 5,8$ %, $61,3 \pm 3,9$ %, navedenim redom.

Ispitana je sposobnost ponovne upotrebe u uzastopnim ciklusima dekolorizacije boje. Nakon 10 ciklusa od po 48 sati, imobilizovani ćelijski zidovi sa lakazom u kalcijum-dopamin-alginatnim kuglicama su zadržali 90% svoje aktivnosti za dekolorizaciju boje Evans Blue, 61% za Amido Black 10B i 33% za Reactive Black 5.

Lakaza iz istog izvora je eksprimirana i u *E. coli*, a nakon toga izolovana i prečišćena. Dobijeni enzim je imao enzimsku aktivnost od $7,90 \pm 0,62$ IU/mg, što je 2,7 puta veća aktivnost u odnosu na prethodnu studiju sa lakazom iz istog izvora. Prečišćena lakaza je dalje imobilizovana u dopamin-pektin mikrokuglicama, metodom enzimske polimerizacije u emulziji. Na ovaj način je u smeši enzima i polimera došlo do formiranja mikrokuglica, umrežavanjem dopaminskih krajeva pektina lakazom sa istovremenim zarobljavanjem enzima unutar mikrokuglica.

Karakterizacijom imobilizovane i slobodne lakaze je utvrđeno da je nakon 24 h stajanja u optimalnom puferu, slobodan enzim izgubio oko 65 % svoje početne aktivnosti, dok je imobilizovan izgubio samo 15 %. Nakon 48 h slobodan enzim je izgubio čak 86 %, a imobilizovan enzim samo 38 % svoje početne aktivnosti. Ispitana je i temperaturna stabilnost slobodnog i

imobilizovanog enzima. Utvrđeno je da slobodan enzim gubi 55 % svoje početne aktivnosti nakon inkubacije od 1 sata na 60 °C, dok imobilizovan enzim i dalje zadržava maksimalnu aktivnost. Imobilizacijom enzima, matriks štiti enzim od konformacionih promena koje bi bile izazvane povećanom temperaturom, dok kod slobodnog enzima opada enzimska aktivnost sa povećanjem temperature usled denaturacije i narušavanja terciarne strukture proteina. Određeni su i kinetički parametri, gde je utvrđeno da dolazi do povećanja K_m i smanjenje V_{max} za imobilizovan enzim u odnosu na slobodan.

Izolovana i prečišćena lakaza iz *E. coli* je ispitivana za dekolorizaciju boja (Amido Black 10 B, Reactive Black 5 i Evans Blue) u slobodnom i imobilizovanom obliku. Imobilizovana lakaza je nakon 48 sati uspela da dekolorizuje 46 % boje Evans Blue, dok je manji procenat dekolorizacije uočen za Amido Black 10 B i Reactive Black 5 boje (31 % i 17 %, navedenim redom). Slobodna lakaza je takođe u najvećoj meri uspela da dekolorizuje Evans Blue boju (56 %), dok je u manjoj meri dekolorizovala Amido Black 10B i Reactive Black 5 boje (39 % i 13 %, navedenim redom).

Mikrokuglice sa lakazom su korišćene u 10 uzastopnih ciklusa dekolorizacije, ne bi li se ispitala sposobnost njihove ponovne upotrebe. Nakon 10 ciklusa od po 48 sati su kuglice i dalje zadržale svoje fizičke karakteristike i mogle su da uklone 60 % boje Amido Black 10B, 36 % boje Reactive Black 5 i 6 % boje Evans Blue. Neimobilizovan enzim nije mogao biti ponovno upotrebljen, usled nemogućnosti njegovog odvajanja iz reakcione smeše, što i jeste jedna od glavnih prednosti korišćenja imobilizovanih enzima u procesima bioremedijacije.

Derivati dopamin-karboksimetilceluloze i dopamin-alginata su korišćeni za proizvodnju nanovlakana, elektrospining metodom. Urađena je optimizacija uslova pripreme rastvora polimera, kao i uslova samog elektrospininga. Vodeni rastvori polimera su mešani sa PEG-om, Tritonom X-100 i DMSO da bi se dobila željena tekstura koja može lepo da se izvlači u niti.

Dopaminski derivati su pokazali bolju sposobnost elektrospinoavanja u odnosu na native polimere. Povećanjem stepena modifikacije je došlo do smanjenja molekulske mase polimera, pa je bilo moguće koristiti rastvor veće masene koncentracije u odnosu na nativan, koji je pri toj koncentraciji veoma viskoznan i ne može da se spinuje. Kod modifikovanog alginata takođe može da dođe do ometanja inter- i intramolekulskih vodoničnih veza između karboksilnih i hidroksilnih grupa, odgovornih za krutost alginata i njegovo otežano spinovanje, što takođe olakšava proces elektrospinoavanja.

Dobijena nanovlakna su se pokazala rastvornim u vodi, što nije povoljno za svrhe tkivnog inženjeringa. Materijali koji služe kao skele za gajenje ćelija bi trebali da budu nerastvorni u vodenoj sredini (u medijumima za gajenje ćelija, fiziološkom rastvoru, itd.) Da bi se sprečilo njihovo raspadanje u vodenoj sredini, potrebno je umrežiti ih. Nakon što su dobijena vlakna snimana na elektronskom mikroskopu, urađeno je njihovo umrežavanje jonima barijuma, a zatim i u prisustvu natrijum-perjodata. Klasično umrežavanje vlakana alginata je u praksi najčešće rađeno sa dvovalentnim katjonima, međutim ovako umrežena vlakna su se pokazala kao neotporna na rastvorenje soli i rastvorenje sa helirajućim agensima, gde dolazi do njihovog raspadanja usled izmene jona i “izvlačenja” kalcijumovih jona iz alginatnog gela. Ovaj problem je uspešno rešen dvostrukim umrežavanjem, gde se nakon jonskog umrežavanja vrši dodatno kovalentno umrežavanje.

Nanovlakna dopamin-CMC-a nisu pokazala toliku mehaničku otpornost kao nanovlakna dopamin-alginata, pa su dalji eksperimenti rađeni samo sa dopamin-alginatnim nanovlaknima. Nakon umrežavanja dopamin-alginatnih nanovlakana je na SEM-u mogla da se vidi jasna razlika u strukturi, gde više nemamo jasno razdvojena vlakna, već je došlo do njihovog umrežavanja i “spajanja”. Ovakva vlakna su pokazala nerastvorljivost u vodenim rastvorima i dalje su korišćena za gajenje ćelija. Urađena je priprema nanovlakana i kultivacija ćelija fibroblasta izolovane pleure pluća (MRC-5). Na mikroskopskim snimcima se mogu videti ćelije, kao i struktura polimerne skele sa porama, što nam je potvrda da je ovakav materijal dobar matriks za gajenje ćelija, koji svojom nanostrukturom imitira ekstracelularni matriks.

Ispitana je citotoksičnost pripremljenih skafolda standardizovanim MTT testom ćelijske vijabilnosti. Zdrave ćelije fibroblasta izolovane pleure pluća MRC-5 su aplicirane na pripremljena nanovlakna, i njihova citotoksičnost je određivana tokom 24 i 72 h, u odnosu na kontrolnu probu. Ćelije su nakon 24 h pokazale povećanu proliferaciju u odnosu na kontrolne ćelije, dok je nakon 72 h vijabilnost počela da opada. Pretpostavljen razlog za ovakav efekat je eventualno odvajanje ćelija sa skafolda, tokom njegove potencijalne degradacije, a samim tim bi bilo potrebno dodatno optimizovati stabilnost nanovlakana, kako ne bi došlo do njihovog rastvaranja, da bi zdrave ćelije imale dovoljno vremena da proliferišu i prorastu skafold, dajući tkivo.

6.Literatura

1. Cascone, S. and G. Lamberti, *Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review*. International Journal of Pharmaceutics, 2020. **573**: p. 118803.
2. Dave, P.N. and A. Gor, *Chapter 3 - Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials: Recent Trends and Their Applications*, in *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications*, C. Mustansar Hussain, Editor. 2018, Elsevier. p. 36-66.
3. Pawar, S.N. and K.J. Edgar, *Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications*. Biomaterials, 2012. **33**(11): p. 3279-3305.
4. Theagarajan, R., et al., *Alginates for Food Packaging Applications*. 2019. p. 205-232.
5. Lopes da Silva, J. and M.A. Rao, *Pectins: Structure, functionality, and uses*. Food Polysaccharides and Their Applications, 2006. **160**: p. 353-411.
6. Kanikireddy, V., et al., *Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **164**: p. 963-975.
7. Mahinroosta, M., et al., *Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications*. Materials Today Chemistry, 2018. **8**: p. 42-55.
8. Stock, U.A. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: current state and prospects*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 443-51.
9. Vasita, R. and D.S. Katti, *Nanofibers and their applications in tissue engineering*. Int J Nanomedicine, 2006. **1**(1): p. 15-30.
10. Bilal, M. and H. Iqbal, *Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **130**.
11. Zdarta, J., et al., *A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility*. 2018. **8**(2): p. 92.
12. Mate, D.M. and M. Alcalde, *Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology*. Microb Biotechnol, 2017. **10**(6): p. 1457-1467.
13. Prajapati, H.V., Minocheherhomji, F.P, *Laccase - A Wonder Molecule : A Review of its Properties and Applications*. Int. J. Pure App. Biosci., 2018. **6**(1): p. 766-773.
14. Mandic, M., et al., *Identification and Characterization of New Laccase Biocatalysts from Pseudomonas Species Suitable for Degradation of Synthetic Textile Dyes*. Catalysts, 2019. **9**(7): p. 629.
15. Bagewadi, Z.K., S.I. Mulla, and H.Z. Ninnekar, *Purification and immobilization of laccase from Trichoderma harzianum strain HZN10 and its application in dye decolorization*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017. **15**(1): p. 139-150.
16. Sharma, D., et al., *A novel laccase from newly isolated Cotyldia pannosa and its application in decolorization of synthetic dyes*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015. **4**(4): p. 661-666.
17. Ahmed, E.M., *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review*. Journal of Advanced Research, 2015. **6**(2): p. 105-121.
18. Chai, Q., Y. Jiao, and X. Yu, *Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them*. Gels (Basel, Switzerland), 2017. **3**(1): p. 6.
19. Hennink, W.E. and C.F. van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(1): p. 13-36.

20. Barbucci, R., G. Leone, and A. Vecchiullo, *Novel carboxymethylcellulose-based microporous hydrogels suitable for drug delivery*. J Biomater Sci Polym Ed, 2004. **15**(5): p. 607-19.
21. Fekete, T., et al., *Synthesis and characterization of superabsorbent hydrogels based on hydroxyethylcellulose and acrylic acid*. Carbohydrate polymers, 2017. **166**: p. 300-308.
22. Bessonov, I.V., et al., *Fabrication of hydrogel scaffolds via photocrosslinking of methacrylated silk fibroin*. Biomed Mater, 2019. **14**(3): p. 034102.
23. Choi, J.R., et al., *Recent advances in photo-crosslinkable hydrogels for biomedical applications*. BioTechniques, 2019. **66**(1): p. 40-53.
24. Mironi-Harpaz, I., et al., *Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(5): p. 1838-1848.
25. Funami, T., et al., *Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations*. Food Hydrocolloids, 2007. **21**(4): p. 617-629.
26. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **944**: p. 62-73.
27. Bajpai, A.K., et al., *Responsive Polymers in Controlled Drug Delivery*. Progress in Polymer Science, 2008. **33**: p. 1088-1118.
28. Ibrahim, S.M., *Preparation and Properties of Carboxymethyl Cellulose (CMC)/Sodium alginate (SA) Blends Induced by Gamma Irradiation*. Journal of polymers and the environment, 2013. **v. 21**(no. 2): p. pp. 520-527-2013 v.21 no.2.
29. Sasaki, Y. and K. Akiyoshi, *Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications*. Chem Rec, 2010. **10**(6): p. 366-76.
30. Martínez-Ruvalcaba, A., E. Chornet, and D. Rodrigue, *Viscoelastic Properties of Dispersed Chitosan/Xanthan Hydrogels*. Carbohydrate Polymers, 2007. **67**: p. 586-595.
31. El-Sherbiny, I.M. and M.H. Yacoub, *Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges*. Glob Cardiol Sci Pract, 2013. **2013**(3): p. 316-42.
32. Kimura, T., et al., *Preparation of poly(vinyl alcohol)/DNA hydrogels via hydrogen bonds formed on ultra-high pressurization and controlled release of DNA from the hydrogels for gene delivery*. J Artif Organs, 2007. **10**(2): p. 104-8.
33. Stenekes, R., H. Talsma, and W. Hennink, *Formation of dextran hydrogels by crystallization*. Biomaterials, 2001. **22**: p. 1891-8.
34. Wichterle, O. and D. Lím, *Hydrophilic Gels for Biological Use*. Nature, 1960. **185**: p. 117.
35. Ranganathan, N., et al., *Synthesis and Properties of Hydrogels Prepared by Various Polymerization Reaction Systems*, in *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*, M.I.H. Mondal, Editor. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 1-25.
36. Dai, W.S. and T.A. Barbari, *Hydrogel membranes with mesh size asymmetry based on the gradient crosslinking of poly(vinyl alcohol)*. Journal of Membrane Science, 1999. **156**(1): p. 67-79.
37. Willmott, N., et al., *Adriamycin-loaded albumin microspheres: Preparation, in vivo distribution and release in the rat*. Biopharmaceutics & drug disposition, 1985. **6**: p. 91-104.
38. Yamamoto, M., et al., *Bone regeneration by transforming growth factor beta1 released from a biodegradable hydrogel*. J Control Release, 2000. **64**(1-3): p. 133-42.
39. Jameela, S.R. and A. Jayakrishnan, *Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of*

- mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle*. *Biomaterials*, 1995. **16**(10): p. 769-75.
40. Draye, J.P., et al., *In vitro release characteristics of bioactive molecules from dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films*. *Biomaterials*, 1998. **19**(1-3): p. 99-107.
 41. García, O., et al., *Optimization of a Laccase-Mediator Stage for TCF Bleaching of Flax Pulp*. 2003. **57**(5): p. 513-519.
 42. Sato, R., R. Noma, and H. Tokuyama, *Preparation of macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels using a suspension–gelation method*. *European Polymer Journal*, 2015. **66**: p. 91-97.
 43. Heck, T., et al., *Enzyme-catalyzed protein crosslinking*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2013. **97**(2): p. 461-475.
 44. Maddock, R.M.A., et al., *Enzyme-catalysed polymer cross-linking: Biocatalytic tools for chemical biology, materials science and beyond*. 2020. **111**(9): p. e23390.
 45. Nguyen, K.T. and J.L. West, *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*. *Biomaterials*, 2002. **23**(22): p. 4307-14.
 46. Reeves, R., et al., *Synthesis and Characterization of Carboxymethylcellulose-Methacrylate Hydrogel Cell Scaffolds*. *Polymers*, 2010. **2**(3): p. 252-264.
 47. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: Properties and biomedical applications*. *Progress in Polymer Science*, 2012. **37**(1): p. 106-126.
 48. Beata Łabowska, M., I. Michalak, and J. Detyna, *Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field – a review*, in *Open Chemistry*. 2019. p. 738.
 49. Smidsrød, O. and G. Skjåk-Bræk, *Alginate as immobilization matrix for cells*. *Trends in Biotechnology*, 1990. **8**: p. 71-78.
 50. Draget, K.I., G. Skjåk-Braek, and O. Smidsrød, *Alginate based new materials*. *International journal of biological macromolecules*, 1997. **21**(1-2): p. 47-55.
 51. Sun, J. and H. Tan, *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications*. *Materials (Basel)*, 2013. **6**(4): p. 1285-1309.
 52. LeRoux, M.A., F. Guilak, and L.A. Setton, *Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration*. *J Biomed Mater Res*, 1999. **47**(1): p. 46-53.
 53. Sikorski, P., et al., *Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium-alginate gels from fiber X-ray diffraction*. *Biomacromolecules*, 2007. **8**(7): p. 2098-103.
 54. Donati, I., et al., *New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels*. *Biomacromolecules*, 2005. **6**(2): p. 1031-40.
 55. Morch, Y.A., et al., *Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads*. *Biomacromolecules*, 2006. **7**(5): p. 1471-80.
 56. Grant, G.T., et al., *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model*. *FEBS Letters*, 1973. **32**(1): p. 195-198.
 57. Orive, G., et al., *Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules*. *Biomacromolecules*, 2005. **6**(2): p. 927-31.
 58. Lee, J. and K.Y. Lee, *Local and sustained vascular endothelial growth factor delivery for angiogenesis using an injectable system*. *Pharm Res*, 2009. **26**(7): p. 1739-44.
 59. Rinaudo, M., *Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate*. *TIP*, 2014. **17**(1): p. 92-96.

60. Samuel Rodriguez, R.T., Ashlyn Wheeler, Amy Nguyen, Jennifer Luong, Reza Mohammadi, Michael Alexander and Jonathan R.T. Lakey *Current Perspective and Advancements of Alginate-Based Transplantation Technologies*, in *Alginates - Recent Uses of This Natural Polymer*, L. Pereira, Editor. 2019 IntechOpen.
61. F. Gibbs, S.K.I.A.C.N.M.B., *Encapsulation in the food industry: a review*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 1999. **50**(3): p. 213-224.
62. Anandharamakrishnan, S.V.S.K.S.J.A.M.C., *Potential Application of Alginates in the Beverage Industry*, in *Alginates: Applications in the Biomedical and Food Industries*, S. Ahmed, Editor. 2019. p. 233-261.
63. Sun, J. and H. Tan, *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications*. Materials (Basel, Switzerland), 2013. **6**(4): p. 1285-1309.
64. Boonthekul, T., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2455-65.
65. McBride, C.A., et al., *Alginate dressings for donor sites of split-thickness skin grafts*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2018(6).
66. Koehler, J., F.P. Brandl, and A.M. Goepferich, *Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds*. European Polymer Journal **54**, 2018: p. 1-11.
67. He, S.L., et al., *Preparation and characterization of partially oxidized sodium alginate*. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2005. **22**: p. 1007-1011.
68. Yang, J.-S., Y.-J. Xie, and W. He, *Research progress on chemical modification of alginate: A review*. Carbohydrate Polymers, 2011. **84**(1): p. 33-39.
69. Kang, H.-A., M.S. Shin, and J.-W. Yang, *Preparation and characterization of hydrophobically modified alginate*. Polymer Bulletin, 2002. **47**(5): p. 429-435.
70. Carré, M.-C., et al., *Covalent coupling of a short polyether on sodium alginate: Synthesis and characterization of the resulting amphiphilic derivative*. Carbohydrate Polymers, 1991. **16**(4): p. 367-379.
71. Alban, S., A. Schauerte, and G. Franz, *Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates*. Carbohydrate Polymers, 2002. **47**(3): p. 267-276.
72. Ronghua, H., D. Yumin, and Y. Jianhong, *Preparation and in vitro anticoagulant activities of alginate sulfate and its quaterized derivatives*. Carbohydrate Polymers, 2003. **52**(1): p. 19-24.
73. Freeman, I., A. Kedem, and S. Cohen, *The effect of sulfation of alginate hydrogels on the specific binding and controlled release of heparin-binding proteins*. Biomaterials, 2008. **29**(22): p. 3260-8.
74. Shah, S.B., C.P. Patel, and H.C. Trivedi, *Fenton's reagent-initiated graft copolymerization of acrylonitrile onto sodium alginate*. Journal of Applied Polymer Science, 1994. **51**(8): p. 1421-1426.
75. Laurienzo, P., et al., *Synthesis and characterization of a novel alginate-poly(ethylene glycol) graft copolymer*. Carbohydrate Polymers, 2005. **62**(3): p. 274-282.
76. Yang, L., et al., *Amphiphilic cholesteryl grafted sodium alginate derivative: Synthesis and self-assembly in aqueous solution*. Carbohydrate Polymers, 2007. **68**(2): p. 218-225.
77. Broderick, E., et al., *The characterisation of a novel, covalently modified, amphiphilic alginate derivative, which retains gelling and non-toxic properties*. J Colloid Interface Sci, 2006. **298**(1): p. 154-61.

78. Galant, C., et al., *Altering associations in aqueous solutions of a hydrophobically modified alginate in the presence of beta-cyclodextrin monomers*. J Phys Chem B, 2006. **110**(1): p. 190-5.
79. Gattás-Asfura, K.M. and C.L. Stabler, *Chemoselective cross-linking and functionalization of alginate via Staudinger ligation*. Biomacromolecules, 2009. **10**(11): p. 3122-3129.
80. Banks, S.R., et al., *Chemical Modification of Alginate for Controlled Oral Drug Delivery*. Journal of agricultural and food chemistry, 2019. **67**(37): p. 10481-10488.
81. Hou, J., et al., *Enzymatically crosslinked alginate hydrogels with improved adhesion properties*. Polymer Chemistry, 2015. **6**(12): p. 2204-2213.
82. Schulz, A., et al., *Tyramine-conjugated alginate hydrogels as a platform for bioactive scaffolds*. Journal of biomedical materials research. Part A, 2019. **107**(1): p. 114-121.
83. Ugi, I., *The α -Addition of Immonium Ions and Anions to Isonitriles Accompanied by Secondary Reactions*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1962. **1**(1): p. 8-21.
84. Bu, H., et al., *Rheological and structural properties of aqueous alginate during gelation via the Ugi multicomponent condensation reaction*. Biomacromolecules, 2004. **5**(4): p. 1470-9.
85. Nunes, C., et al., *Occurrence of cellobiose residues directly linked to galacturonic acid in pectic polysaccharides*. Carbohydrate Polymers, 2012. **87**(1): p. 620-626.
86. Axelos, M.A.V. and J.F. Thibault, *CHAPTER 6 - The Chemistry of Low-Methoxyl Pectin Gelation*, in *The Chemistry and Technology of Pectin*, R.H. Walter, Editor. 1991, Academic Press: San Diego. p. 109-118.
87. Noreen, A., et al., *Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review*. International Journal of Biological Macromolecules, 2017. **101**.
88. OAKENFULL, D. and A. SCOTT, *Hydrophobic Interaction in the Gelation of High Methoxyl Pectins*. Journal of Food Science, 1984. **49**(4): p. 1093-1098.
89. Gawkowska, D., J. Cybulska, and A. Zdunek, *Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review*. Polymers, 2018. **10**: p. 762.
90. Sriamornsak, P. *Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review* 2007.
91. Thibault JF., R.M., *Physico-Chemical Properties of Pectins in the Cell Walls and After Extraction*, in *Advances in Pectin and Pectinase Research*, S.H. Voragen F., Visser R. , Editor. 2003., Springer: Dordrecht.
92. Axelos, M.A.V. and J.F. Thibault, *Influence of the substituents of the carboxyl groups and of the rhamnose content on the solution properties and flexibility of pectins*. International Journal of Biological Macromolecules, 1991. **13**(2): p. 77-82.
93. Braccini, I. and S. Pérez, *Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited*. Biomacromolecules, 2001. **2**(4): p. 1089-1096.
94. Chan, S.Y., et al., *Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology*. Carbohydrate Polymers, 2017. **161**: p. 118-139.
95. Huynh, U.T.D., et al., *Binding of Divalent Cations to Polygalacturonate: A Mechanism Driven by the Hydration Water*. The Journal of Physical Chemistry B, 2016. **120**(5): p. 1021-1032.
96. Munarin, F., et al., *Pectin-Based Injectable Biomaterials for Bone Tissue Engineering*. Biomacromolecules, 2011. **12**(3): p. 568-577.

97. Paharia, A., et al., *Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting*. AAPS PharmSciTech, 2007. **8**(1): p. 12.
98. Katav, T., et al., *Modified pectin-based carrier for gene delivery: Cellular barriers in gene delivery course*. Journal of Controlled Release, 2008. **130**(2): p. 183-191.
99. Ngouémazong, E.D., et al., *The Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Pectin: A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2015. **14**(6): p. 705-718.
100. Sriamornsak, P., N. Wattanakorn, and J. Nunthanid, *Mucoadhesion of pectin as evidence by wettability and chain interpenetration*. Carbohydrate Polymers, 2008. **74**: p. 458-467.
101. Munarin, F., M.C. Tanzi, and P. Petrini, *Advances in biomedical applications of pectin gels*. Int J Biol Macromol, 2012. **51**(4): p. 681-9.
102. Munarin, F., et al., *Mineral phase deposition on pectin microspheres*. Materials Science and Engineering: C, 2010. **30**(3): p. 491-496.
103. Bhatia, M., et al., *Chemical Modification of Pectins, Characterization and Evaluation for Drug Delivery*. Sci Pharm. Sci Pharm, 2008. **76**: p. 775-784.
104. Chen, J., et al., *Pectin Modifications: A Review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015. **55**(12): p. 1684-1698.
105. Fischer, A., et al., *Detection of Intramolecular Associations in Hydrophobically Modified Pectin Derivatives Using Fluorescent Probes*. Langmuir, 1998. **14**(16): p. 4482-4488.
106. Ralet, M.C., E. Bonnin, and J.F. Thibault, *Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases*. Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications, 2001. **753**(1): p. 157-166.
107. Rosenbohm, C., et al., *Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by 1H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties*. Carbohydr Res, 2003. **338**(7): p. 637-49.
108. Miralles-Houzelle, M.C., P. Hubert, and E. Dellacherie, *Hydrophobic Alkyl Chains–Pectin Conjugates. Comparative Study of Some Physicochemical Properties in Relation to Covalent Coupling vs Ionic Association*. Langmuir, 2001. **17**(5): p. 1384-1391.
109. Leroux, J., et al., *Emulsion stabilizing properties of pectin*. Food Hydrocolloids, 2003. **17**: p. 455-462.
110. Bhatia, M.S., et al., *Chemical Modification of Pectins, Characterization and Evaluation for Drug Delivery*. Scientia Pharmaceutica, 2008. **76**(4): p. 775-784.
111. Martinichen-Herrero, J.C., et al., *Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen Parmotrema mantiqueirensis Hale*. Carbohydrate Polymers, 2005. **60**(1): p. 7-13.
112. Fan, L., et al., *Synthesis and anticoagulant activity of pectin sulfates*. Journal of Applied Polymer Science, 2012. **124**(3): p. 2171-2178.
113. Gessa, C., et al., *The reduction of Fe(III) to Fe(II) and V(V) to V(IV) by polygalacturonic acid: A reduction and complexation mechanism of biochemical significance*. Inorganica Chimica Acta, 1983. **80**: p. L53-L55.
114. Bellú, S.E., et al., *Kinetics and mechanism of oxidation of apple pectin by CrVI in aqueous acid medium*. Journal of Physical Organic Chemistry, 2008. **21**(12): p. 1059-1067.
115. Suhas, et al., *Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent*. Bioresource Technology, 2016. **216**: p. 1066-1076.
116. Charpentier, D., et al., *New hydrophobically modified carboxymethylcellulose derivatives*. Carbohydrate Polymers, 1997. **33**(2): p. 177-186.

117. Pettignano, A., A. Charlot, and E. Fleury, *Carboxyl-functionalized derivatives of carboxymethyl cellulose: towards advanced biomedical applications*. Polymer Reviews, 2019. **59**(3): p. 510-560.
118. Barbucci, R., et al., *A new amido phosphonate derivative of carboxymethylcellulose with an osteogenic activity and which is capable of interacting with any Ti surface*. 2010. **95A**(1): p. 58-67.
119. Taubner, T., A. Synytsya, and J. Čopíková, *Preparation of amidated derivatives of carboxymethylcellulose*. International Journal of Biological Macromolecules, 2015. **72**: p. 11-18.
120. Anjali, T., *Modification of carboxymethyl cellulose through oxidation*. Carbohydrate Polymers, 2012. **87**(1): p. 457-460.
121. Rahman, M.S., et al., *Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose*. 2021. **13**(8): p. 1345.
122. Obele, C.M., et al., *Carboxymethyl cellulose and cellulose nanocrystals from cassava stem as thickeners in reactive printing of cotton*. Cellulose, 2021. **28**(4): p. 2615-2633.
123. Mirhosseini, H., et al., *Influence of pectin and CMC on physical stability, turbidity loss rate, cloudiness and flavor release of orange beverage emulsion during storage*. Carbohydrate Polymers, 2008. **73**(1): p. 83-91.
124. Oliveira, R.N., et al., *Absorbent polyvinyl alcohol–sodium carboxymethyl cellulose hydrogels for propolis delivery in wound healing applications*. 2017. **57**(11): p. 1224-1233.
125. Qi, P., et al., *Fabrication of calcium phosphate-loaded carboxymethyl cellulose non-woven sheets for bone regeneration*. Carbohydrate Polymers, 2018. **189**: p. 322-330.
126. Agis, H., et al., *Effects of carboxymethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose on the differentiation and activity of osteoclasts and osteoblasts*. 2010. **95A**(2): p. 504-509.
127. Namkaew, J., et al., *Carboxymethyl Cellulose Entrapped in a Poly(vinyl) Alcohol Network: Plant-Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering*. 2021. **26**(3): p. 578.
128. Aoshima, M. and Y. Jo, *Augmentation for Cell Spreading and Migration by A Soluble Fraction of Cotton-Derived Carboxymethyl Cellulose*. KOBUNSHI RONBUNSHU, 2013. **70**: p. 273-281.
129. Wu, X.J. and M.M.F. Choi, *An optical glucose biosensor based on entrapped-glucose oxidase in silicate xerogel hybridised with hydroxyethyl carboxymethyl cellulose*. Analytica Chimica Acta, 2004. **514**(2): p. 219-226.
130. Koetting, M.C., et al., *pH-responsive and enzymatically-responsive hydrogel microparticles for the oral delivery of therapeutic proteins: Effects of protein size, crosslinking density, and hydrogel degradation on protein delivery*. J Control Release, 2016. **221**: p. 18-25.
131. Pan, G., et al., *Thermo-responsive hydrogel layers imprinted with RGDS peptide: a system for harvesting cell sheets*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(27): p. 6907-11.
132. Almeida, H., M. Amaral, and P. Lobão, *Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2012. **2**: p. 1-10.
133. Alvarez-Lorenzo, C. and A. Concheiro, *Intelligent drug delivery systems: polymeric micelles and hydrogels*. Mini Rev Med Chem, 2008. **8**(11): p. 1065-74.
134. Gupta, P., K. Vermani, and S. Garg, *Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery*. Drug Discov Today, 2002. **7**(10): p. 569-79.

135. Bouhadir, K.H., E. Alsberg, and D.J. Mooney, *Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents*. *Biomaterials*, 2001. **22**(19): p. 2625-33.
136. Glinsky, V.V. and A. Raz, *Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets*. *Carbohydr Res*, 2009. **344**(14): p. 1788-91.
137. Du, S., et al., *Covalent Chitosan-Cellulose Hydrogels via Schiff-Base Reaction Containing Macromolecular Microgels for pH-Sensitive Drug Delivery and Wound Dressing*. 2019. **220**(23): p. 1900399.
138. Batista, R.A., et al., *Hydrogel as an alternative structure for food packaging systems*. *Carbohydrate Polymers*, 2019. **205**: p. 106-116.
139. Mohammed Fayaz, A., et al., *Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation*. *J Agric Food Chem*, 2009. **57**(14): p. 6246-52.
140. NORAJIT, K. and G.H. RYU, *PREPARATION AND PROPERTIES OF ANTIBACTERIAL ALGINATE FILMS INCORPORATING EXTRUDED WHITE GINSENG EXTRACT*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2011. **35**(4): p. 387-393.
141. Concha-Meyer, A., et al., *Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon*. *Food Control*, 2011. **22**: p. 485-489.
142. Roy, N., et al., *Biodegradation of PVP–CMC hydrogel film: A useful food packaging material*. *Carbohydrate Polymers*, 2012. **89**(2): p. 346-353.
143. Youssef, H.F., et al., *Antimicrobial packaging film based on biodegradable CMC/PVA-zeolite doped with noble metal cations*. *Food Packaging and Shelf Life*, 2019. **22**: p. 100378.
144. Queen, D., et al., *A dressing history*. *Int Wound J*, 2004. **1**(1): p. 59-77.
145. Cevher, A.D.S.a.E., *Biopolymers as Wound Healing Materials: Challenges and New Strategies*, in *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, R. Pignatello, Editor. 2011, InTech.
146. Huang, S. and X. Fu, *Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration*. *J Control Release*, 2010. **142**(2): p. 149-59.
147. Kamoun, E.A., E.S. Kenawy, and X. Chen, *A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings*. *J Adv Res*, 2017. **8**(3): p. 217-233.
148. Yadav, P., et al., *Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review*. *J Clin Diagn Res*, 2015. **9**(9): p. Ze21-5.
149. Aderibigbe, B.A. and B. Buyana, *Alginate in Wound Dressings*. *Pharmaceutics*, 2018. **10**(2): p. 42.
150. Tummalapalli, M., et al., *Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumin as bioactive agents*. *Int J Biol Macromol*, 2016. **82**: p. 104-13.
151. Andriotis, E.G., et al., *Development of Bio-Active Patches Based on Pectin for the Treatment of Ulcers and Wounds Using 3D-Bioprinting Technology*. *Pharmaceutics*, 2020. **12**(1).
152. Zhang, X., et al., *Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF)*. *International journal of nanomedicine*, 2018. **13**: p. 3897-3906.
153. Yang, S., et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors*. *Tissue Eng*, 2001. **7**(6): p. 679-89.

154. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering*. Chem Rev, 2001. **101**(7): p. 1869-79.
155. Říhová, B., *Immunocompatibility and biocompatibility of cell delivery systems*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000. **42**(1): p. 65-80.
156. Thomson, R.C., et al., *Guided tissue fabrication from periosteum using preformed biodegradable polymer scaffolds*. Biomaterials, 1999. **20**(21): p. 2007-18.
157. Yao, N.-z., C. Huang, and D.-d. Jin, *Evaluation of biocompatibility of a pectin/polyvinyl alcohol composite hydrogel as a new nucleus material*. Orthopaedic Surgery, 2009. **1**(3): p. 231-237.
158. Bhattarai, N., et al., *Alginate-Based Nanofibrous Scaffolds: Structural, Mechanical, and Biological Properties*. Advanced Materials, 2006. **18**(11): p. 1463-1467.
159. Bonino, C.A., et al., *Three-dimensional electrospun alginate nanofiber mats via tailored charge repulsions*. Small, 2012. **8**(12): p. 1928-36.
160. Agarwal, S., J. Wendorff, and A. Greiner, *Use of electrospinning technique for biomedical applications*. Polymer. Polymer, 2008. **49**: p. 5603-5621.
161. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(3): p. 325-347.
162. McCanless, J.D., et al., *Hematoma-inspired alginate/platelet releasate/CaPO₄ composite: initiation of the inflammatory-mediated response associated with fracture repair in vitro and ex vivo injection delivery*. J Mater Sci Mater Med, 2012. **23**(8): p. 1971-81.
163. de Vos, P., et al., *The association between in vivo physicochemical changes and inflammatory responses against alginate based microcapsules*. Biomaterials, 2012. **33**(22): p. 5552-5559.
164. Vanacker, J., et al., *Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells*. Biomaterials, 2012. **33**(26): p. 6079-85.
165. Jen, A.C., M.C. Wake, and A.G. Mikos, *Review: Hydrogels for cell immobilization*. 1996. **50**(4): p. 357-364.
166. Goh, C.H., P.W.S. Heng, and L.W. Chan, *Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications*. Carbohydrate Polymers, 2012. **88**(1): p. 1-12.
167. Chelpanova, T.I. and E.A. Efimtseva, *Alkaline phosphatase immobilization on spherical pectin gel particles*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2016. **52**(1): p. 36-42.
168. Durán, N., et al., *Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **31**(7): p. 907-931.
169. Rehman, H.U., et al., *Immobilization of pectin depolymerising polygalacturonase using different polymers*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **82**: p. 127-133.
170. Zhang, Y., J. Ge, and Z. Liu, *Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes*. ACS Catalysis, 2015. **5**(8): p. 4503-4513.
171. Kress, J., et al., *Enzyme accessibility and solid supports: which molecular weight enzymes can be used on solid supports? An investigation using confocal Raman microscopy*. Chemistry, 2002. **8**(16): p. 3769-72.
172. Sheldon, R.A., *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*. 2007. **349**(8-9): p. 1289-1307.

173. Cao, L., *Immobilised enzymes: science or art?* Curr Opin Chem Biol, 2005. **9**(2): p. 217-26.
174. Guzik, U., K. Hupert-Kocurek, and D. Wojcieszynska, *Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases*. Molecules, 2014. **19**(7): p. 8995-9018.
175. Solomon, E.I., U.M. Sundaram, and T.E. Machonkin, *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. Chem Rev, 1996. **96**(7): p. 2563-2606.
176. Mate, D.M. and M. Alcalde, *Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology*. Microbial biotechnology, 2017. **10**(6): p. 1457-1467.
177. Kunamneni, A., et al., *Laccases and their applications: a patent review*. Recent Pat Biotechnol, 2008. **2**(1): p. 10-24.
178. Fernández-Fernández, M., M.Á. Sanromán, and D. Moldes, *Recent developments and applications of immobilized laccase*. Biotechnology Advances, 2013. **31**(8): p. 1808-1825.
179. Asgher, M., S. Noreen, and M. Bilal, *Enhancement of catalytic, reusability, and long-term stability features of Trametes versicolor IBL-04 laccase immobilized on different polymers*. International Journal of Biological Macromolecules, 2017. **95**: p. 54-62.
180. Leonowicz, A., J.M. Sarkar, and J.-M. Bollag, *Improvement in stability of an immobilized fungal laccase*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1988. **29**(2): p. 129-135.
181. Sanjay, K.S.P., et al., *Immobilization of Laccase on SiO₂ Nanocarriers Improves Its Stability and Reusability*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014. **24**(5): p. 639-647.
182. Susana Rodríguez Couto , J.L.T.H., *Industrial and biotechnological applications of laccases: A review*. Biotechnology Advances, 2006. **24**: p. 500-513.
183. Ribeiro, D.S., et al., *Enzymes in juice processing: a review*. International Journal of Food Science & Technology, 2010. **45**(4): p. 635-641.
184. Gohil, R.M. and W.A. Wysock, *Designing Efficient Oxygen Scavenging Coating Formulations for Food Packaging Applications*. Packaging Technology and Science, 2014. **27**(8): p. 609-623.
185. Micard, V. and J.F. Thibault, *Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins*. Carbohydrate Polymers, 1999. **39**(3): p. 265-273.
186. Gonçalves, M.L.F.C. and W. Steiner, *Purification and Characterization of Laccase from a Newly Isolated Wood-Decaying Fungus*, in *Enzymes for Pulp and Paper Processing*. 1996, American Chemical Society. p. 258-266.
187. Bourbonnais, R., et al., *Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds*. Applied and environmental microbiology, 1997. **63**(12): p. 4627-4632.
188. Mita, N., et al., *Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenols*. Macromolecular Bioscience, 2003. **3**(5): p. 253-257.
189. Ikeda, R., et al., *Laccase-catalyzed polymerization of acrylamide*. Macromolecular Rapid Communications, 1998. **19**(8): p. 423-425.
190. Aktaş, N. and A. Tanyolaç, *Kinetics of laccase-catalyzed oxidative polymerization of catechol*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **22**: p. 61-69.
191. Himani, B. *Microbial Population Associated With Plastic Degradation*. 2012.
192. Vikineswary, S., et al., *Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by Pycnoporus sanguineus*. Bioresour Technol, 2006. **97**(1): p. 171-7.

193. Hublik, G. and F. Schinner, *Characterization and immobilization of the laccase from Pleurotus ostreatus and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants*. Enzyme Microb Technol, 2000. **27**(3-5): p. 330-336.
194. Liu, Y., et al., *Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds*. Bioresource Technology, 2012. **115**: p. 21-26.
195. Fathali, Z., et al., *Catalytic phenol removal using entrapped cross-linked laccase aggregates*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **122**: p. 359-366.
196. Brenna, O. and E. Bianchi, *Immobilised laccase for phenolic removal in must and wine*. Biotechnology Letters, 1994. **16**(1): p. 35-40.
197. Niladevi, K.N. and P. Prema, *Immobilization of laccase from Streptomyces psammoticus and its application in phenol removal using packed bed reactor*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008. **24**(7): p. 1215-1222.
198. Asadgol, Z., et al., *Removal of phenol and bisphenol-A catalyzed by laccase in aqueous solution*. Journal of Environmental Health Science and Engineering, 2014. **12**(1): p. 93.
199. Tzanov, T., et al., *Laccases to Improve the Whiteness in a Conventional Bleaching of Cotton*. Macromolecular Materials and Engineering, 2003. **288**(10): p. 807-810.
200. Pazarlioglu, N., M. Sarişik, and A. Telefoncu, *Laccase: Production by Trametes versicolor and application to denim washing*. Process Biochemistry, 2005. **40**: p. 1673-1678.
201. Silveira, E., et al., *Selection of Pseudomonas for industrial textile dyes decolourization*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**(2): p. 230-235.
202. Yuan, H., et al., *Enhanced decolourization efficiency of textile dye Reactive Blue 19 in a horizontal rotating reactor using strips of BNC-immobilized laccase: Optimization of conditions and comparison of decolourization efficiency*. Biochemical Engineering Journal, 2020. **156**: p. 107501.
203. Daâssi Dalel, R.-C.S., Nasri Moncef, Mechichi Tahar, *Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from Coriolopsis gallica into Ca-alginate beads*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. **90** p. 71-78.
204. Kunamneni, A., et al., *Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers*. Process Biochemistry, 2008. **43**(2): p. 169-178.
205. Mogharabi, M., et al., *Immobilization of Laccase in Alginate-Gelatin Mixed Gel and Decolorization of Synthetic Dyes*. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2012. **2012**: p. 6.
206. Teerapatsakul, C., et al., *Repeated batch for dye degradation in an airlift bioreactor by laccase entrapped in copper alginate*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017. **120**: p. 52-57.
207. Zerín, I., et al., *Potentials of Natural Dyes for Textile Applications* <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128035818116686>. 2019.
208. Samanta, A. and P. Agarwal, *Application of natural dyes on textiles*. Indian Journal of Fibre and Textile Research, 2009. **34**: p. 384-399.
209. Benkhaya, S., S. M' rabet, and A. El Harfi, *A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes*. Inorganic Chemistry Communications, 2020. **115**: p. 107891.
210. Benkhaya, b., S. El Harfi, and A. El Harfi, *Classifications, properties and applications of textile dyes: A review*. 2017, 2017. **3**(3).

211. Al-Duri, B. and G. McKay, *Prediction of binary systems for kinetics of batch adsorption using basic dyes onto activated carbon*. Chemical Engineering Science, 1991. **46**(1): p. 193-204.
212. Barnett, J., *Synthetic organic dyes, 1856–1901: an introductory literature review of their use and related issues in textile conservation*. Studies in Conservation, 2007. **52**: p. 67-77.
213. Zhang, S., et al., *Continuous dyeing of cationised cotton with reactive dyes*. Coloration Technology, 2005. **121**(4): p. 183-186.
214. Singh, K. and S. Arora, *Removal of Synthetic Textile Dyes From Wastewaters: A Critical Review on Present Treatment Technologies*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2011. **41**(9): p. 807-878.
215. Murugesan, K., et al., *Decolourization of reactive black 5 by laccase: Optimization by response surface methodology*. Dyes and Pigments, 2007. **75**(1): p. 176-184.
216. Zille, A., et al., *Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent*. Biotechnol Lett, 2003. **25**(17): p. 1473-7.
217. Yang, J., et al., *Purification and Characterization of a Novel Laccase from Cerrena sp. HYB07 with Dye Decolorizing Ability*. PLOS ONE, 2014. **9**(10): p. e110834.
218. Thakur, V., et al., *Decolorization of dye by alginate immobilized laccase from Cercospora SPF-6: Using compact 5 stage plug flow reactor*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 2015. **4**(1): p. 183-200.
219. Abadulla, E., et al., *Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta**. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(8): p. 3357.
220. Liu, Z., et al., *Different expression systems for production of recombinant proteins in Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng, 2012. **109**(5): p. 1259-68.
221. Schmidt, F.R., *Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **65**(4): p. 363-72.
222. Fisher, D.I., L.M. Mayr, and R.G. Roth, *Expression Systems*, in *Encyclopedia of Cell Biology*, R.A. Bradshaw and P.D. Stahl, Editors. 2016, Academic Press: Waltham. p. 54-65.
223. Cherf, G.M. and J.R. Cochran, *Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2015. **1319**: p. 155-175.
224. Boder, E.T. and K.D. Wittrup, *Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(6): p. 553-7.
225. Linciano, S., et al., *Molecular evolution of peptides by yeast surface display technology*. MedChemComm, 2019. **10**(9): p. 1569-1580.
226. Teparic, R. and V. Mrsa, *Overview of systems and techniques for surface display of recombinant proteins in yeast S. cerevisiae*. Applied Food Biotechnology, 2015. **3**(1): p. 3-14.
227. Johannes, C. and A. Majcherczyk, *Laccase activity tests and laccase inhibitors*. J Biotechnol, 2000. **78**(2): p. 193-9.
228. Petrović, A., et al., *Synthesis of Camphor-Derived Bis(pyrazolylpyridine) Rhodium(III) Complexes: Structure-Reactivity Relationships and Biological Activity*. Inorg Chem, 2019. **58**(1): p. 307-319.
229. Ece, S., et al., *Heterologous expression of a Streptomyces cyaneus laccase for biomass modification applications*. AMB Express, 2017. **7**(1): p. 86-86.

230. Chen, Y., et al., *Cell Surface Display Fungal Laccase as a Renewable Biocatalyst for Degradation of Persistent Micropollutants Bisphenol A and Sulfamethoxazole*. Environmental Science & Technology. **50**(16): p. 8799-8808.
231. Bertrand, B., et al., *Functional expression, production, and biochemical characterization of a laccase using yeast surface display technology*. Fungal Biol, 2016. **120**(12): p. 1609-1622.
232. Yadav, T. and V. Mukherjee, *Interpretation of IR and Raman spectra of dopamine neurotransmitter and effect of hydrogen bond in HCl*. Journal of Molecular Structure, 2018. **1160**: p. 256-270.
233. Gao, B., et al., *Methods to prepare dopamine/polydopamine modified alginate hydrogels and their special improved properties for drug delivery*. European Polymer Journal, 2018. **110**.
234. Sun, X., et al., *Preparation and physicochemical properties of an injectable alginate-based hydrogel by the regulated release of divalent ions via the hydrolysis of d-glucono- δ -lactone*. Journal of Biomaterials Applications, 2020. **34**(7): p. 891-901.
235. Wang, X., et al., *Dopamine-Modified Alginate Beads Reinforced by Cross-Linking via Titanium Coordination or Self-Polymerization and Its Application in Enzyme Immobilization*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2013. **52**: p. 14828–14836.
236. J. Phetsom, S.K., P. Suwannawong and R. Sarnthima, *Copper-Alginate Encapsulation of Crude laccase from *Lentinus polychrous* Lev. and their Effectiveness in Synthetic Dyes Decolorizations*. Journal of Biological Sciences, 2009. **9**: p. 573-583.
237. Mohidem, N.A. and H. Mat, *The Catalytic Activity of Laccase Immobilized in Sol-Gel Silica*. Vol. 9. 2009.
238. Lassouane, F., et al., *A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions*. Bioresource Technology, 2019. **271**: p. 360-367.
239. Asgher, M., et al., *Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014. **101**: p. 56-66.
240. Prokopijevic, M., et al., *Tyramine-modified pectins via periodate oxidation for soybean hull peroxidase induced hydrogel formation and immobilization*. Vol. 101. 2016.
241. Prodanović, O., et al., *Tyramine modified alginates via periodate oxidation for peroxidase induced hydrogel formation and immobilization*. Reactive and Functional Polymers, 2015. **93**.
242. Siddiqui, S., et al., *Vibrational dynamics and potential energy distribution of two well-known neurotransmitter receptors: Tyramine and dopamine hydrochloride*. Journal of Theoretical & Computational Chemistry - J THEOR COMPUT CHEM, 2009. **08**.
243. Diao, J., et al., *Engineering of pectin-dopamine nano-conjugates for carrying ruthenium complex: A potential tool for biomedical applications*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2019. **191**: p. 135-142.
244. Diao, J., et al., *Engineering of pectin-dopamine nano-conjugates for carrying ruthenium complex: A potential tool for biomedical applications*. J Inorg Biochem, 2019. **191**: p. 135-142.
245. Burzio, L.A. and J.H. Waite, *Cross-linking in adhesive quinoproteins: studies with model decapeptides*. Biochemistry, 2000. **39**(36): p. 11147-53.
246. McDowell, L.M., et al., *Rotational echo double resonance detection of cross-links formed in mussel byssus under high-flow stress*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20293-5.

247. Yang, J., M.A. Cohen Stuart, and M. Kamperman, *Jack of all trades: versatile catechol crosslinking mechanisms*. Chem Soc Rev, 2014. **43**(24): p. 8271-98.
248. Kristiansen, K.A., A. Potthast, and B.E. Christensen, *Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties*. Carbohydrate Research, 2010. **345**(10): p. 1264-1271.
249. Gomez, C.G., M. Rinaudo, and M.A. Villar, *Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives*. Carbohydrate Polymers, 2007. **67**(3): p. 296-304.
250. Asgher, M., S. Noreen, and M. Bilal, *Enhancing Catalytic Functionality of Trametes versicolor IBL-04 Laccase by Immobilization on Chitosan Microspheres*. Chemical Engineering Research and Design, 2017. **119**.
251. Bayramoğlu, G. and M. Yakup Arica, *Immobilization of laccase onto poly(glycidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) films: Enzymatic oxidation of phenolic compounds*. Materials Science and Engineering: C, 2009. **29**(6): p. 1990-1997.
252. Bilal, M., et al., *Mutagenicity and cytotoxicity assessment of biodegraded textile effluent by Ca-alginate encapsulated manganese peroxidase*. Biochemical Engineering Journal, 2016. **109**: p. 153-161.
253. Asgher, M., S. Noreen, and M. Bilal, *Enhancing Catalytic Functionality of Trametes versicolor IBL-04 Laccase by Immobilization on Chitosan Microspheres*. Vol. 119. 2017.
254. Goldstein, L., [29] *Kinetic behavior of immobilized enzyme systems*, in *Methods in Enzymology*. 1976, Academic Press. p. 397-443.
255. Lu, L., M. Zhao, and Y. Wang, *Immobilization of Laccase by Alginate-Chitosan Microcapsules and its Use in Dye Decolorization*. 2007. 159-166.
256. Sanlier, S.H., S. Gider, and A. Koprulu, *Immobilization of laccase for biotechnology applications*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2013. **41**(4): p. 259-63.
257. Zabłocka-Godlewska, E., W. Przystaś, and E. Grabińska-Sota, *Decolourization of Diazo Evans Blue by Two Strains of Pseudomonas fluorescens Isolated from Different Wastewater Treatment Plants*. Water, Air, & Soil Pollution, 2012. **223**(8): p. 5259-5266.
258. Pardo, I., et al., *New colorimetric screening assays for the directed evolution of fungal laccases to improve the conversion of plant biomass*. BMC biotechnology, 2013. **13**: p. 90-90.
259. Yang, J., et al., *Purification and characterization of a novel laccase from Cerrena sp. HYB07 with dye decolorizing ability*. PloS one, 2014. **9**(10): p. e110834-e110834.
260. Li, K., F. Xu, and K.E. Eriksson, *Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound*. Applied and environmental microbiology, 1999. **65**(6): p. 2654-2660.
261. Przystas, W., E. Zablocka-Godlewska, and E. Grabinska-Sota, *Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes*. Brazilian Journal of Microbiology, 2015. **46**: p. 415-424.
262. Selvam, K., K. Swaminathan, and K.S. Chae, *Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus Thelephora sp.* Bioresour Technol, 2003. **88**(2): p. 115-9.
263. Anwar, A., et al., *Calcium Alginate: A Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of Bacillus subtilis KIBGE-HAS*. World Applied Sciences Journal, 2009. **7**(10): p. 1281-1286.

264. Othman, Abdelmageed M., et al., *Immobilization of laccase on functionalized multiwalled carbon nanotube membranes and application for dye decolorization*. RSC Advances, 2016. **6**(115): p. 114690-114697.
265. Kulikowska, A., I. Wasiak, and T. Ciach, *Carboxymethyl Cellulose Oxidation to Form Aldehyde Groups*. Challenges of Modern Technology, 2013. **4**.
266. Michon, T., et al., *Wheat prolamine crosslinking through dityrosine formation catalyzed by peroxidases: Improvement in the modification of a poorly accessible substrate by "indirect" catalysis*. 1999. **63**(4): p. 449-458.
267. Nie, H., et al., *Effects of chain conformation and entanglement on the electrospinning of pure alginate*. Biomacromolecules, 2008. **9**(5): p. 1362-5.
268. Taemeh, M.A., et al., *Fabrication challenges and trends in biomedical applications of alginate electrospun nanofibers*. Carbohydrate Polymers, 2020. **228**: p. 115419.
269. Jeong, S.I., et al., *Electrospun Alginate Nanofibers with Controlled Cell Adhesion for Tissue Engineering*. 2010. **10**(8): p. 934-943.
270. Bhattarai, N. and M. Zhang, *Controlled synthesis and structural stability of alginate-based nanofibers*. Nanotechnology, 2007. **18**(45): p. 455601.
271. Daemi, H., M. Mashayekhi, and M. Pezeshki Modares, *Facile fabrication of sulfated alginate electrospun nanofibers*. Carbohydr Polym, 2018. **198**: p. 481-485.
272. Zhou, D., et al., *Dopamine-Modified Hyaluronic Acid Hydrogel Adhesives with Fast-Forming and High Tissue Adhesion*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020. **12**(16): p. 18225-18234.
273. Zeng, Z. and X. Mo, *Rapid in situ cross-linking of hydrogel adhesives based on thiol-grafted bio-inspired catechol-conjugated chitosan*. Journal of Biomaterials Applications, 2017. **32**(5): p. 612-621.
274. Čičić, M., et al., *A green approach to obtain stable and hydrophilic cellulose-based electrospun nanofibrous substrates for sustained release of therapeutic molecules †*. RSC Advances, 2019. **9**.
275. Wang, X., et al., *In situ cross-linked and highly carboxylated poly(vinyl alcohol) nanofibrous membranes for efficient adsorption of proteins*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(36): p. 7281-7290.

Biografija

Nikolina Popović Kokar, rođena je 12.06.1992. godine u Sremskoj Mitrovici. Osnovnu školu „Triva Vitasović Lebarnik“, kao i Mitrovačku gimnaziju, smer “društveno-jezički”, završila je u Sremskoj Mitrovici. Osnovne akademske studije Hemije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu pohađala je u periodu od 2011. do 2015. godine, kada je diplomirala sa prosečnom ocenom 9,16 i ocenom 10 na Završnom radu. Master akademske studije biohemije upisala je 2015. godine, a završila 2016. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i ocenom 10 na Master radu. Tokom trajanja osnovnih i master studija je bila stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, kao i opštine Sremska Mitrovica. Doktorske akademske studije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu upisala je 2016. godine pod rukovodstvom redovnog profesora Hemijskog fakulteta dr Radivoja Prodanovića gde se bavi istraživanjima na temu sinteze hidrogelova i njihove primene.

Nikolina Popović Kokar je od oktobra 2016. godine angažovana na Katedri za Biohemiju, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi na predmetu Hemija prirodnih proizvoda, a od 01.11.2016. zaposlena je kao Istraživač-pripravnik na Hemijskom fakultetu. Od tada je angažovana na projektu Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja Republike Srbije broj III41007 pod nazivom „Primena biomedicinskog inženjeringa u prekliničkoj i kliničkoj praksi“, pod rukovodstvom redovnog profesora Fakulteta Inženjerskih nauka u Kragujevcu, dr Nenada Filipovića. Od jula 2020. godine do aprila 2021. godine je bila angažovana na PROMIS projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja “Symbiosis” br. 6066997.

Od kako se bavi naučno-istraživačkim radom, Nikolina Popović Kokar je objavila i učestvovala u izradi sedam radova u međunarodnim časopisima (jedan rad kategorije M21a, tri rada kategorije M21, jedan rada kategorije M22, jedan rad kategorije M23 i jedan rad kategorije M24), od kojih dva kao prvi autor i jedan kao autor za korespondenciju i ima pet saopštenja iz oblasti doktorske disertacije na skupovima od međunarodnog značaja (M33 i M34).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Николина Поповић Кокар _____

Број индекса _____ ДБ05/2016 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Употреба хидрогелова добијених модификацијом полисахарида фенолним једињењима
за имобилизацију ћелија и биокатализатора“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Николина Поповић Кокар

Број индекса ДБ05/2016

Студијски програм Биохемија

Наслов рада “Употреба хидрогелова добијених модификацијом полисахарида фенолним једињењима за имобилизацију ћелија и биокатализатора“

Ментор др Радивоје Продановић, редовни професор Хемијског факултета, Универзитета у Београду

Потписани _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Употреба хидрогелова добијених модификацијом полисахарида фенолним једињењима
за имобилизацију ћелија и биокатализатора“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.