

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Nikola L. Lončar

**UKLANJANJE FENOLA I BOJA IZ  
OTPADNE VODE PRIRODNIM I  
REKOMBINANTNIM OKSIDATIVNIM  
ENZIMIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Nikola L. Lončar

**REMOVAL OF PHENOLS AND DYES  
FROM WASTEWATER USING NATIVE  
AND RECOMBINANT OXIDATIVE  
ENZYMES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

**KOMISIJA:**

---

dr Zoran Vujčić, vanredni profesor, mentor  
Hemijski fakultet  
Univerzitet u Beogradu

---

dr Miroslava Vujčić, naučni saradnik, mentor  
IHTM – Centar za hemiju  
Univerzitet u Beogradu

---

dr Marija Gavrović-Jankulović, vanredni profesor, član  
Hemijski fakultet  
Univerzitet u Beogradu

---

Datum odbrane doktorske disertacije

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom vanrednog profesora dr Zorana Vujčića.*

*Mentoru dr Zoranu Vujčiću zahvaljujem se prije svega na neprocjenjivoj pomoći i posvećenosti u svakom trenutku izrade ove disertacije, počevši od planiranja eksperimenata, realizacije istih, pa do tumačenja rezultata i uobličavanja finalne forme. Zahvalan sam na svemu što sam u prilici da naučim, a naročito na sticanju kritičkog pristupa eksperimentalnom radu, kreativnog razmišljanja i samostalnosti, kao i na podršci za svaki vid profesionalnog usavršavanja.*

*Mentoru dr Miroslavi Vujčić naročito se zahvaljujem za dragocjene sugestije, diskusije, usmjeravanje i nesebičnu pomoć od prvih eksperimenata do pisanja ove disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Mariji Gavrović-Jankulović na korisnim sugestijama i pomoći tokom izrade disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i dr Aleksandri Trifunović sa Instituta za Genetiku u Kelnu na pruženoj prilici za usavršavanje u oblasti molekularne biologije, kao i dr Josep Lopez-Santinu i kolegama sa Katedre za Hemijsko inženjerstvo Autonomnog Univerziteta u Barseloni na pomoći pri izradi disertacije.*

*Dragim kolegama Biljani, Aleksandri, Marici, Marineli, Barbari, Anji, Ratku i Nikoli veliko hvala na nesebičnoj pomoći u radu, druženju i podršci u svakom trenutku.*

*Zahvaljujem se i svim dragim kolegama sa Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju-IHTM kao i prijateljima koji su svojom pomoći i druženjem olakšali rad na disertaciji.*

*Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, bratu, sestri i Nataši za bezrezervnu i neprocjenjivu pomoć, podršku i razumjevanje.*

Doktorska disertacija

## **Uklanjanje fenola i boja iz otpadne vode prirodnim i rekombinantnim oksidativnim enzimima**

### **IZVOD**

Boje i halogenovani fenoli koji imaju dezaktivirano aromatično jezgro čine značajnu kategoriju veoma toksičnih i teško razgradljivih zagađivača u raznim industrijskim granama. Glavni cilj ove disertacije je bio dobivanje jeftinih rastvornih i imobilizovanih enzima za uklanjanje fenola i boja iz otpadnih voda. Korišćeno je četiri prirodna (nativna) enzima (polifenoloksidaza iz krompira, tri lakaze na sporama izolovanih sojeva *Bacillus amyloliquefaciens*, lakaza iz gljive *Trametes versicolor*, kisele i bazne izoforme peroksidaze iz rena) i dva rekombinantna enzima (hloroperoksidaza iz *Caldariomyces fumago* proizvedena u *Aspergillus niger* i lakaza iz soja *B. amyloliquefaciens* 12B1 proizvedena u *Escherichia coli*).

Djelimično prečišćena polifenoloksidaza (PPO) iz krompira je imobilizovana na različitim nosačima. Od dobijenih biokatalizatora, tri sa najvećim aktivnostima PPO, Eupergit C250L-PPO, Celit-PPO i CelulozaM-PPO, su testirani u reaktoru za uklanjanje fenola, *p*-hlorfenola i *p*-bromfenola. U slučaju 2,5 mM supstrata sa Eupergit C250L-PPO, postignuto je oko 45% razgradnje *p*-bromfenola, dok su *p*-hlorfenol i fenol razgrađeni 35% odnosno 20%. Testirana je i sposobnost višestruke upotrebe Eupergit C250L-PPO imobilizata za uklanjanje *p*-hlorfenola. Iz eksperimenata sinteze novog nosača sa pipcima i njegove primjene za imobilizaciju PPO može se zaključiti da je imobilizovana PPO bila znatno otpornija na denaturaciju u odnosu na solubilni enzim. Biokatalizator je testiran u šaržnom reaktoru za uklanjanje *p*-hlorfenola i *p*-bromfenola iz vodenih rastvora. Postignuto je uklanjanje pomenutih fenola preko 90% pri koncentraciji fenola 100 mg/L. Za oba halogenfenola TC-PPO je pokazao stepen uklanjanja od preko 90% u prva tri ciklusa, nakon čega efikasnost opada do 60% nakon šest ciklusa od po 8 časova. Rastvornom PPO pod optimizovanim uslovima moguće je ukloniti 93-99.9% boje nakon tretmana u trajanju od 1 čas sa 424-1700 U/mL PPO, zavisno od boje. Pokazano je da je optimalno pH za proces obezbojavanja bilo 3,0.

Obezbojavanje je postignuto uz formiranje nerastvornih polimera koji su uklonjeni filtriranjem ili centrifugiranjem. Formiranje polimera potvrđeno je infracrvenom spektroskopijom.

Od testiranih oko 100 sojeva iz prirode izolovanih *Bacillus sp.*, kod deset sojeva je detektovana aktivnost lakaze na površini spora. Tri soja sa najvećom specifičnom aktivnošću (BBS14, 12B1 i MB24a) su odabrana za dalji rad i identifikovani su metodom sekvenciranja 16S rDNA čime je potvrđeno da se radi o sojevima vrste *B. amyloliquefaciens*. Lakaza iz soja 12B1 je pokazala izuzetno visoki temperaturni optimum (80– 85°C), pa je odabrana za rekombinantnu heterologu produkciju ekspresijom u *E. coli*. Rekombinantna lakaza pokazala je značajnu termostabilnost na 80°C, što je zajedno sa pokazanim potencijalom za uklanjanje boja na pH 7,0 izuzetna prednost ovog enzima u odnosu na enzime porijeklom iz gljiva.

Razvijena je procedura frakcionisanja kiselih i baznih izoformi HRP i ispitana efikasnost ovih izoformi za uklanjanje boja. Pokazano je da efikasnost uklanjanja boja kiselim peroksidazama u slučajevima nekih boja daje znatno bolje rezultate od baznih peroksidaza. Ovo je važno, jer isključiva upotreba baznih peroksidaza u komercijalnim preparatima i odbacivanje kiselih peroksidaza u procesu prečišćavanja čini ovaj enzim praktično besplatnim za upotrebu u tretmanu otpadnih voda. Pokazali smo da je hloroperoksidaza izrazito efikasnija kada umjesto vodonik-peroksida koristi *t*-butil peroksid. Ovaj rezultati zajedno sa pokazanim potencijalom za uklanjanje halogenfenola i boja otvara novi pravac za primjenu hloroperoksidaze.

Rezultati ove disertacije ukazuju na to da bi koktel oksidativnih enzima (rastvornih i imobilizovanih) mogao da služi za uklanjanje širokog spektra ksenobiotika iz otpadnih voda.

Ključne riječi: biohemijski procesi, prerada otpadne vode, oksidativni enzimi, rekombinantni enzimi, fenol, hlorfenol, bromfenol, boja.

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Biohemija

**UDK broj:** 66.09 : 628.35 (043.3)

Doctoral dissertation

## **Removal of phenols and dyes from wastewater using native and recombinant oxidative enzymes**

### **SUMMARY**

Dyes and phenols containing halogens which tend to deactivate the aromatic nuclei constitute a significant category of highly toxic and difficult-to-degrade pollutants from a wide variety of industries. Main goal of this dissertation was the production of inexpensive soluble and immobilized enzymes for removal of phenols and dyes from wastewater. Four native enzymes (potato polyphenoloxidase, three laccases on spores of isolated strains of *Bacillus amyloliquefaciens*, laccase from *Trametes versicolor*, acidic and basic isoforms of horseradish peroxidase) and two recombinant enzymes (chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* produced in *Aspergillus niger* and laccase from *B. amyloliquefaciens* 12B1 strain produced in *Escherichia coli*).

Partially purified potato polyphenol oxidase (PPO) was immobilized onto different commercial and laboratory produced carriers. The three of the obtained biocatalysts, with the highest PPO activities, namely Eupergit C250L-PPO, Celite-PPO and CelluloseM-PPO, were tested in the batch reactor for phenol, *p*-chlorophenol and *p*-bromophenol removal. In the case of 2.5 mM substrates with Eupergit C250L-PPO, around 45% removal of *p*-bromophenol was achieved, while *p*-chlorophenol and phenol were removed 35% and 20%, respectively. The reusability of Eupergit C250L-PPO for the removal of *p*-chlorophenol has been tested. From experiments of synthesis of new tentacle carrier and its application for PPO immobilization we can conclude that immobilized PPO was more resistant to denaturation when compared with its soluble counterpart. Biocatalyst was tested in the batch reactor for *p*-chlorophenol and *p*-bromophenol removal from aqueous solution. More than 90% removal was achieved for both halogenophenols at concentration of 100 mg/l from aqueous solution. For both halogenophenols TC-PPO works with over 90% removal during first three cycles which decrease to 60% removal efficiency after six cycles each of 8 hours duration. With soluble PPO, under optimized conditions 93-99.9% removal of dyes was achieved after 1h using 424 – 1700 U/mL of PPO, depending on dye. Optimum pH for decolorization

process was found to be 3.0. Decolorization was accomplished *via* insoluble polymers formations that were separated by filtration or centrifugation. Polymer formation was confirmed with infrared spectroscopy.

From approximately 100 wild type strains of *Bacillus sp.* tested for laccase activity, ten strains were positive for spore laccase activity. Three strains with highest specific activity (BBS14, 12B1 and MB24a) have been chosen for further work and were identified by 16S rRNA sequencing method by which it was confirmed that these strains belong to species of *B. amyloliquefaciens*. Laccase from strain 12B1 shown remarkably high temperature optimum (80–85 °C) so it was chosen for recombinant heterologous production by expressing it in *E. coli*. Recombinant laccase shown to be thermostable at 80°C, which is together with demonstrated potential for dye removal at pH 7.0 major advantage when compared with fungal laccase.

Purification of acidic and basic isoforms of HRP was developed and their efficacy for dye removal was tested. It was shown that acidic isoforms efficacy in dye removal is much higher than efficacy of basic isoforms in case of some dyes. This is important since basic isoforms are mainly used in commercial preparation of HRP and acidic HRP are being discarded, which makes them inexpensive for wastewater treatment. We have shown that chloroperoxidase was much more efficient when instead of hydrogen peroxide it used *t*-butyl peroxide. This result with demonstrated potential for halogenophenols and dyes removal opens up new area of application for chloroperoxidase.

Results of this dissertation points to possible use of cocktail of oxidative enzymes (soluble and immobilized) for removal of wide spectrum of xenobiotics from wastewater.

Keywords: biochemical processes, wastewater treatment, oxidative enzymes, recombinant enzymes, phenol, chlorophenol, bromophenol, dye.

**Area of science:** Chemistry

**Sub-area of science:** Biochemistry

**UDC number:** 66.09 : 628.35 (043.3)



**Skraćenice korišćene u tekstu:**

<b>4-AAP</b>	4-amino-antipirin
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
<b>BPK</b>	Biohemijska potrošnja kiseonika
<b>CBB</b>	Coomassie brilliant blue
<b>CPO</b>	Hloroperoksidaza
<b>CR</b>	Congo red
<b>DMF</b>	Dimetilformamid
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoksid
<b>DNA</b>	Dezoksiribonukleinska kiselina
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraacetat
<b>HPK</b>	Hemijska potrošnja kiseonika
<b>HRP</b>	Peroksidaza iz rena
<b>IC</b>	Indigo carmine
<b>IDA</b>	Imino-diacetat
<b>IPTG</b>	Izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L-cys</b>	L-cistein
<b><i>p</i>-BP</b>	<i>p</i> -bromfenol
<b><i>p</i>-CP</b>	<i>p</i> -hlorfenol
<b>PCR</b>	Lančana reakcija polimerizacije
<b>PPO</b>	Polifenoloksidaza
<b>RB 5</b>	Reactive black 5
<b>SDS</b>	Natrijum-dodecil sulfat
<b>SGZ</b>	Siringaldazin
<b>TC</b>	Tentacle carrier

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opšti dio.....	3
2.1 Fenolni zagađivači .....	3
2.1.1 Uticaj fenola na zdravlje .....	4
2.1.2 Pravna regulativa .....	5
2.2 Boje kao zagađivači .....	6
2.2.1 Tekstilna industrija.....	6
2.2.2 Uticaj efluenta tekstilne industrije na okolinu .....	7
2.2.3 Klasifikacija boja.....	8
2.3 Metode za uklanjanje ksenobiotika .....	12
2.3.1 Fizičke metode uklanjanja ksenobiotika .....	12
2.3.2 Hemijske metode uklanjanja ksenobiotika .....	16
2.3.3 Biološke metode uklanjanja ksenobiotika .....	19
2.3.4 Tretman fenolne i obojene otpadne vode rastvornim i imobilizovanim enzimima .....	21
2.4 Polifenol oksidaze (fenoloksidaze) .....	22
2.4.1 Lakaza .....	22
2.4.2 Tirozinaza .....	30
2.5 Peroksidaze.....	32
2.5.1 Peroksidaza iz rena (HRP).....	34
2.5.2 Hloroperoksidaza (CPO).....	38
2.6 Redoks potencijal oksidativnih enzima i upotreba medijatora.....	39
2.7 Imobilizacija enzima .....	40
3. Naši radovi.....	42
3.1. Uklanjanje fenola fenoloksidazom iz krompira ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....	42
3.1.1 Prečišćavanje PPO .....	43
3.1.2 Imobilizacija PPO .....	45
3.1.3 Sinteza novog nosača sa pipcima i njegova primjena za imobilizaciju PPO .	50
3.2 Uklanjanje boja fenoloksidazom iz krompira ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	59
3.2.1 Uticaj pH na obezbojavanje tekstilnih boja .....	60
3.2.2 Uticaj koncentracije PPO i dužine inkubacije na obezbojavanje .....	62

3.2.3	Vis i FTIR spektrometrijska analiza tekstilnih efluenata tretiranih sa PPO ...	63
3.3	Uklanjanje ksenobiotika bakterijskom lakazom .....	65
3.3.1	Identifikacija izolovanih sojeva i dobijanje spora iz različitih <i>Bacillus</i> sp. ...	66
3.3.2	Provjera prisustva lakazne aktivnosti u sporama <i>Bacillus</i> sp. ....	67
3.3.3	Identifikacija izolovanih sojeva <i>Bacillus</i> sp. ....	68
3.3.4	Karakterizacija lakaza .....	70
3.3.5	Primjena lakaza u obezbojavanju .....	76
3.3.6	Primjena lakaza za uklanjanje fenola .....	77
3.4	Uklanjanje ksenobiotika rekombinantno proizvedenom lakazom iz soja <i>B.amyloliquefaciens</i> 12B1 eksprimiranoj u <i>E. coli</i> BL21 .....	78
3.4.1	Kloniranje Lacc gena u ekspresioni vektor pET21a .....	79
3.4.2	Ispitivanje ekspresije rekombinantne lakaze .....	85
3.4.3	Izolovanje i prečišćavanje rLac iz <i>E. coli</i> BL21 pET21a-Lacc .....	86
3.4.4	Određivanje biohemijskih parametara korišćenih lakaza .....	86
3.4.5	Primjena rekombinantno proizvedene lakaze u obezbojavanju .....	89
3.5	Uklanjanje ksenobiotika peroksidazom iz rena ( <i>Armoracia rusticana</i> ) .....	91
3.5.1	Hromatografsko frakcionisanje izoformi peroksidaze .....	91
3.5.2	Poređenje efikasnosti izoformi HRP za uklanjanje tekstilnih boja .....	93
3.6	Primjena CPO u obezbojavanju reaktivnih boja i halogenfenola .....	99
3.7	Zaključci .....	102
4.	Ekperimentalni dio .....	104
	Spisak glavne korišćene opreme: .....	104
	Spisak korišćenih kitova za molekularnu biologiju: .....	104
4.1.	Uklanjanje fenola fenoloksidazom iz krompira ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	105
4.1.1	Prečišćavanje PPO .....	105
4.1.2	Imobilizacija PPO na različitim nosačima .....	106
4.1.3	Sinteza novog nosača sa pipcima i njegova primjena za imobilizaciju PPO	108
4.2	Uklanjanje boja fenoloksidazom iz krompira ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	111
4.2.1	Uticaj pH na aktivnost PPO obezbojavanje tekstilnih boja .....	111
4.2.2	Uticaj koncentracije PPO i dužine inkubacije na obezbojavanje .....	111
4.2.3	Vis i FTIR spektrometrijska analiza tekstilnih efluenata tretiranih sa PPO .	112
4.3	Uklanjanje ksenobiotika bakterijskom lakazom .....	112

4.3.1 Identifikacija izolovanih sojeva i dobijanje spora iz različitih <i>Bacillus</i> sp. .	112
4.3.2 Provjera prisustva lakazne aktivnosti u sporama <i>Bacillus</i> .....	113
4.3.3 Identifikacija izolovanih sojeva <i>Bacillus</i> sp. ....	116
4.3.4 Karakterizacija lakaza .....	120
4.3.5 Zamrzavanje najaktivnijih pojedinačnih kolonija .....	124
4.4 Uklanjanje ksenobiotika rekombinantno proizvedenom lakazom iz soja <i>B.amyloliquefaciens</i> 12B1 eksprimiranoj u <i>E. coli</i> BL21 .....	124
4.4.1 Kloniranje Lacc gena u ekspresioni vektor pET21a .....	124
4.4.2 Ispitivanje ekspresije rekombinantne lakaze .....	127
4.4.3 Izolovanje i prečišćavanje rLac iz <i>E. coli</i> .....	128
4.4.4 Određivanje biohemijskih parametara korišćenih lakaza .....	129
4.4.5 Primjena rekombinantno proizvedene lakaze u obezbojavanju reaktivnih boja .....	129
4.5 Uklanjanje ksenobiotika peroksidazom iz rena ( <i>Armoracia rusticana</i> ).....	129
4.5.1 Hromatografsko frakcionisanje izoformi peroksidaze .....	129
4.5.2 Poređenje efikasnosti izoformi HRP u uklanjanju tekstilnih boja .....	132
4.6 Primjena CPO u obezbojavanju reaktivnih boja i halogenfenola .....	132
4.6.1 Produkcija CPO fermentacijom <i>A.nigera</i> .....	133
4.7 Eksperimenti sa lakazom iz <i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530.....	137
4.7.1 Održavanje soja i priprema inokuluma .....	137
4.7.2 Priprema peleta .....	137
5. Literatura .....	139

## 1. Uvod

Tradicionalni hemijski i biološki tretmani industrijskih otpadnih voda ne daju uvijek zadovoljavajuće rezultate. Stoga, u fokusu istraživanja nalazi se primjena enzima (solubilnih i imobilizovanih) izolovanih iz biljaka, gljiva i bakterija, kao i rekombinantno proizvedeni enzimi.

Enzimski tretmani se svrstavaju između dvije tradicionalne kategorije: hemijskih i bioloških procesa, s obzirom na to da uključuju hemijske reakcije koje se odvijaju posredstvom biokatalizatora. Izolovani enzimi su poželjniji u odnosu na intaktni organizam jer se postiže veća specifičnost, moguće je odrediti aktivnost enzima, olakšano je rukovanje i skladištenje, a koncentracija enzima ne zavisi od brzine rasta mikroorganizma. Zbog njihove velike specifičnosti prema pojedinim vrstama ili klasama jedinjenja, enzimski procesi mogu biti razvijeni specifično ciljajući određena jedinjenja štetna po okolinu (zagađivače). Jedinjenja koja su kandidati za ovu vrstu tretmana su ona koja obično nije moguće tretirati efikasno ili pouzdano koristeći tradicionalne tehnike. Pored toga, enzimski tretman može biti korišćen i kao predtretman da bi se uklonilo jedno ili više jedinjenja koja ometaju korake koji slijede u daljoj obradi otpadne vode. Na primjer, ako možemo selektivno da uklonimo inhibitor ili toksično jedinjenje, onda ostatak organskog materijala može efikasno da bude obrađen biološkim tretmanom, tako maksimalno smanjujući cijenu čitavog postupka. Smatra se da u sledećim slučajevima enzimski tretman može biti od najveće koristi u tretmanu fenolima ili bojama zagađene vode:

- Uklanjanje specifičnih, katkada veoma toksičnih, jedinjenja iz kompleksnih smješa industrijskog otpada prije biološkog tretmana.
- Uklanjanje specifičnih jedinjenja iz razblaženih smješa, za koje konvencionalni biološki tretman (miješane kulture) nije isplativ.
- Dodatno prečišćavanje već tretirane otpadne vode, kako bi se ispunili kriterijumi za ograničenja za određeni kontaminant.
- Tretman otpada koji se generiše povremeno ili na izolovanim lokacijama, uključujući mjesta ispuštanja hemikalija ili napuštene deponije, gdje nema stalnih instalacija za prečišćavanje.

- Tretman visokokoncentrovane otpadne vode (male zapremine) na mjestu generisanja u fabričkim postrojenjima sa ciljem da se omogući ponovno korišćenje procesne vode, da bi se omogućila regeneracija rastvornih produkata ili da bi se uklonili zagađivači za koje se zna da uzrokuju problem pri miješanju sa ostalim otpadom iz postrojenja.

Trenutna istraživanja primjene enzima se fokusiraju na rešavanje ovih problema, posebno na razvoj tretmana enzimskim sistemima koji ciljano uklanjaju aromatična jedinjenja iz vodenih rastvora. Halogenovana jedinjenja vjerovatno predstavljaju grupu najopasnijih zagađivača po okolinu zbog njihove široke rasprostranjene upotrebe kao biocidnih, fungicidnih, dezinfikujućih reagenasa, rastvarača i drugih industrijskih hemikalija. Halogenovani fenoli imaju dezaktivirano aromatično jezgro i čine značajnu kategoriju veoma toksičnih i teško razgradljivih zagađivača u raznim industrijskim granama.

Neke potencijalne primjene enzima identifikovane za poboljšanje kvaliteta otpadne vode uključuju transformaciju aromatičnih jedinjenja, cijanida, boja, pesticida, surfaktanata i drugih. Da bi bili u mogućnosti da iskoristimo pun potencijal primjene enzima, ostaju brojni problemi koje treba riješiti, stoga su postavljeni sledeći ciljevi ovog rada:

- Nalaženje jeftinog izvora efikasnog enzima.
- Nalaženje novih bakterijskih enzima, kako bi se prevazišla ograničenja koja imaju enzimi izolovani iz gljiva ili biljaka.
- Imobilizacija oksidativnih enzima na različitim nosačima.
- Sintaza novog, jeftinog i biodegradabilnog nosača za imobilizaciju enzima.
- Optimizacija procesa uklanjanja fenola i boja dejstvom oksidativnih enzima.
- Optimizacija procesa uklanjanja boja iz realne otpadne vode.
- Karakterizacija proizvoda reakcije.

## 2. Opšti dio

Povećana proizvodnja plastičnih masa, boja, pesticida i drugih hemikalija generiše velike količine opasnog hemijskog otpada kojim se zagađuje okolina. Otporni zagađivači, uključujući fenolna jedinjenja i boje, se prenose putem vode i vazduha i po nekoliko stotina kilometara ugrožavajući kako život u divljini, tako i opštu populaciju (Hakulinen *et al.*, 1985). Ovi zagađivači nisu biodegradabilni i poznate su njihove karcinogene i mutagene osobine, kao i izazivanje hroničnih toksičnih efekata (Nicell *et al.*, 1993).

Tretmani otpadne vode biološkim metodama se smatraju jeftinijim od fizičkih i hemijskih metoda za smanjenje koncentracija fenola (Goi *et al.*, 2004). Mikroorganizmi koji se koriste su obično aerobi, uključujući *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Azotobacter sp.*, *Rhodococcus sp.* i *Cryptococcus sp.* (Armenante *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 1997). Većina studija urađena je sa čistim kulturama. Toksičnost hlorfenola ili intermedijera koji nastaju u toku njihove razgradnje onemogućava sposobnost čistih kultura da kompletno mineralizuju hlorfenole prisutne u otpadnoj vodi. S toga, biološke metode, ukoliko se koriste samostalno imaju ozbiljan nedostatak prilikom tretiranja ne-biodegradabilnih i toksičnih jedinjenja. Alternativa bi mogla da bude upotreba enzima poput polifenoloksidaza, lakaza i peroksidaza. Brojni oksidativni enzimi porijeklom iz bakterija, gljiva i biljaka su pokazali potencijal za primjenu u tretmanu otpadne vode sa raznovrsnim sadržajem kontaminanata.

### 2.1 Fenolni zagađivači

Fenol je jedan od najčešćih zagađivača vode, jer je toksičan i pri vrlo niskim koncentracijama, a njegovo prisustvo u otvorenim vodenim sistemima može da dovede do formiranja supstituisanih halogenovanih jedinjenja prilikom procesa dezinfekcije i oksidacije. Fenol je značajan u istraživanjima koja se odnose na tretman industrijske otpadne vode, jer se često koristi kao model-zagađivač. Trenutna proizvodnja fenola u svijetu iznosi 6 miliona tona godišnje, sa trendom povećanja (Jordan *et al.*, 2002). Sa povećanjem proizvodnje raste i stepen zagađenja otpadnih voda. Fenol je prvi put izolovao iz katrana 1834. godine njemački hemičar Runge. To je aromatično jedinjenje.

Na sobnoj temperaturi i pritisku je čvrst, higroskopni kristal. Kada je u čistom stanju, nalazi se u formi bijelih kristala, ali je često roze do ljubičasto obojen zbog prisustva sopstvenih polimernih nečistoća. Dobro je rastvoran u etanolu, etru i nekoliko drugih polarnih rastvarača, kao i ugljovodonicima. Rastvorljivost fenola u vodi je ograničena, a ponaša se kao slaba kiselina. Tečni fenol nagriza gumu i plastiku. Vreli tečni fenol može da nagrize aluminijum, magnezijum, olovo i cink. Ima karakterističan slatkast miris.

Kao čista supstancija, fenol se koristi kao dezinfekciono sredstvo, za pripremu krema, pjena za brijanje (zbog svojih germicidnih osobina i kao lokalni anestetik), u veterini kao želudačni anestetik, kao ekstrakciono sredstvo u rafinerijama i proizvodnji lubrikanata, kao reagens u hemijskim analizama itd. Najviše se koristi (35%) za proizvodnju fenolnih smola poput fenol-formaldehidnih smola (bakelit) koje se koriste kao jeftini termoizolatori u građevini, automobilskoj i industriji kućnih aparata. Reakcijom sa acetonom može da se prevede u bisfenol A, koji je monomer za proizvodnju epoksi-materijala (28%). Takođe, selektivnom katalitičkom hidrogenizacijom se dobijaju cikloheksanon i cikloheksanon-cikloheksanol smješe. Cikloheksanon se kasnije prevodi u oksim i dalje u  $\epsilon$ -kaprolaktam, monomer za dobijanje najlona 6 (16% od proizvedenog fenola). Smješa cikloheksanon-cikloheksanol se oksiduje azotnom kiselinom do adipinske kiseline, jednog od monomera za proizvodnju najlona 6,6. Fenol se takođe koristi za dobijanje polifenoksi i polisulfonskih polimera, poliestera otpornog na koroziju i poliester poliola. Može biti preveden u ksilenole, alkilfenole, hlorfenole, aniline i druge intermedijere u procesima proizvodnje surfaktanata, đubriva, eksploziva, boja, tekstila, gume, plastike i antioksidanasa, lijekova itd.

### 2.1.1 Uticaj fenola na zdravlje

Sterilišuće dejstvo fenola je otkrio engleski hirurg Džozef Lister 1865. godine. Germicidna aktivnost fenola je posledica njegove sposobnosti da denaturiše proteine. Sa druge strane, ima značajan uticaj na zdravlje ljudi. Proizvodnja i transport fenola, kao i njegova mnogostruka upotreba može da dovede do kontakta radnika sa ovim jedinjenjem putem udisanja, ingestije, kontakta sa kožom ili očima i apsorpcijom preko kože. Apsorpcija preko kože je brza i dovodi do ozbiljnih opekotina (sa očima takođe).



Koma, konvulzije, cijanoza i smrt su rezultati prekomjernog izlaganja fenolu. Od unutrašnjih organa, fenol pogađa jetru, bubrege, pluća i vaskularni sistem. Unošenje 1 g fenola je smrtonosno za ljude.

Hlorovana organska jedinjenja su posebno poznata po rezistenciji na biohemijsku degradaciju. Monohlorfenoli, kao i druga fenolna jedinjenja, se javljaju kao međuproizvodi u produkciji pesticida (Sejáková *et al.*, 2009). Takođe se koriste i kao antimikrobni reagensi u širokom spektru proizvoda poput lijepkova, ulja i u tekstilnoj industriji. Fenoli su prisutni u otpadnoj vodi različitih industrija, poput rafinerija (6-500 mg/L), proizvodnji koksa (28-3900 mg/L), obradi uglja (9-6800 mg/L) i u petrohemijskoj industriji (2,8-1220 mg/L). Drugi izvori fenolnih zagađivača su farmaceutska industrija, industrija plastike, drvnih proizvoda, boja i pulpe i papirna industrija (0,1-1600 mg/L) (Busca *et al.*, 2008; Contrerasa *et al.*, 2003).

### 2.1.2 Pravna regulativa

Otpadne fenolne vode se ne smiju ispuštati u otvorene tokove prije predtretmana zbog toksičnosti fenola i njegovih derivata. Zbog toksičnih efekata ovih jedinjenja američka Agencija za zaštitu okoline (Environmental Protection Agency, EPA) je postavila standard za prečišćavanje vode na 1 µg/L fenola u vodi za piće. Šta više, studija ove agencije je pokazala da korišćenje hlora za dezinfekciju fenolne vode može da dovede do stvaranja toksičnog 2-hlorfenola (EPA, 1980). Gornja granica određena regulativama za ispuštanje fenolne otpadne vode u otvorene tokove se razlikuje od zemlje do zemlje, ali se uglavnom kreće oko 10 mg/L (Yamada *et al.*, 2005). U Republici Srbiji ispuštanje otpadne vode je regulisano mnoštvom zakona i pravilnika koji se većim dijelom slažu sa međunarodnim zakonima, poput pravila EPA da se fenol u vodi za piće ne smije nalaziti u koncentraciji većoj od 1 µg/L.

Uredbom o klasifikaciji voda (Službeni glasnik SRS, br. 5/68) vode su podijeljene u četiri klase i to:

1. klasa I – vode koje se u prirodnom stanju ili posle dezinfekcije mogu upotrebljavati ili iskorišćavati za snadbevanje naselja vodom za piće, u prehrambenoj industriji i za gajenje plemenitih vrsta riba (salmonida).

2. klasa II – vode koje su podesne za kupanje, rekreaciju i sportove na vodi, za gajenje manje plemenitih vrsta riba (ciprinida), kao i vode koje se uz normalne metode obrade (kaogulacija, filtracija i dezinfekcija) mogu upotrebljavati za snadbevanje naselja vodom za piće i u prehrambenoj industriji.

3. klasa III – vode koje se mogu upotrebljavati i iskorišćavati za navodnjavanje i u industriji, osim prehrambene industrije.

4. klasa IV – vode koje se mogu upotrebljavati ili iskorišćavati samo posle posebne obrade.

Po Pravilniku o opasnim materijama u vodama (Službeni glasnik SRS, br. 31/82) maksimalni sadržaj fenola u vodama kategorija I i II je 1  $\mu\text{g/L}$ , dok je za vode kategorija III i IV ograničenje 300  $\mu\text{g/L}$ . Prema Uredbi o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje (Službeni glasnik RS, br.67/2011 i 48/2012) granična vrijednost emisije fenola za tehnološke otpadne vode, prije ispuštanja u javnu kanalizaciju je 50 mg/L.

## 2.2 Boje kao zagađivači

Prva poznata organska boja, plavi indigo je korišćena prilikom umotavanja mumija u Egipatskim grobnicama prije otprilike 4000 godina (Gordon i Gregory 1983). Sve boje korišćene do 1856. godine su bile prirodnog porijekla i pripremane su na maloj skali, uglavnom ekstrahovane iz biljaka, insekata i školjki. Engleski hemičar Vilijam Perkin (William H. Perkin) je 1856. godine otkrio prvu sintetičku boju, mauvein i od tada počinje proizvodnja sintetičkih boja na velikoj skali (Hunger 2003, Venkataraman 1965). Automatizacija procesa je donijela revoluciju u tekstilnoj industriji tako omogućivši rast i industrije boja.

### 2.2.1 Tekstilna industrija

Tekstilna industrija obuhvata komplikovani sektor industrijskog lanca i veliku raznovrsnost sirovih materijala, procesa, proizvoda i opreme. Negativan uticaj tekstilne industrije na okolinu je posledica ispuštanja zagađivača i potrošnje velike količine vode i energije (Lacasse i Baumann, 2006). Tekstilna industrija obuhvata četiri glavne

aktivnosti: tretiranje sirovih materijala, proizvodnju tekstila, bojenje i finalne procese i proizvodnju odjeće. Glavni zagađivači u tekstilnoj otpadnoj vodi dolaze iz procesa bojenja i finalne obrade koja obuhvata izbjeljivanje, bojenje i štampanje aplikacija. Svrha finalne obrade je adaptacija proizvoda kako bi se ispunili zahtjevi modne industrije i funkcija (Savin i Butnaru 2008). Da bi se postigli željeni efekti koristi se široki spektar boja i pomoćnih sredstava (Savin i Butnaru 2008).

### 2.2.2 Uticaj efluenta tekstilne industrije na okolinu

Tekstilna industrija obuhvata oko dvije trećine ukupnog tržišta boja (Riu *et al.*, 1998) i troši velike količine vode i hemikalija za mokre procese. Ispuštanje otpadne vode je glavni uzrok negativnog uticaja na okolinu. Primarni udarac na okolinu se odnosi na potrošnju vode (80-100 m<sup>3</sup>/t obrađenog tekstila) i ispuštanje otpadne vode (115-175 kg HPK/t obrađenog tekstila, veliki opseg organskih molekula, slaba biodegradabilnost, obojenost i salinitet) (Savin i Butnaru, 2008). Stoga, višestruka upotreba efluenta predstavlja ekonomski i ekološki izazov za čitav sektor tekstilne industrije (Li Rosi *et al.*, 2007). Hemijski reagensi koji se koriste u procesovanju tekstila su vrlo različiti u pogledu sastava, od neorganskih jedinjenja pa sve do polimera i organskih molekula i zavise od prirode početnih sirovina i tipa proizvoda (Mishra i Tripathy, 1993). Rezultujući efluenti iz ovih procesa se međusobno razlikuju obzirom na to da se u različitim procesima koriste različite boje, materijali koji se boje i različite mašine (Bisschops i Spanjers, 2003). Od zagađivača prisutnih u tekstilnim efluentima (suspendovane čestice, HPK, toplota, boja, kiseline), prisustvo boje se primjećuje pri koncentracijama od 1 mg/L ili manjim. Otprilike 800000 tona boje se proizvodi godišnje, od čega 40% u Evropi (Hessel *et al.*, 2007). Tokom procesa bojenja, 2-60% od početne boje ili njenih derivata se ne vezuje za tekstil i ispušta se kao efluent (Hessel *et al.*, 2007).

Prisustvo boja u vodenom ekosistemu smanjuje prodiranje sunčevih zraka u dublje slojeve, čime se onemogućuje fotosintetska aktivnost, smanjuje kvalitet vode, smanjuje rastvorljivost gasova što sve uzrokuje akutno trovanje vodene flore i faune (Nilsson *et al.*, 1993). Sem vizuelnih efekata, različiti uticaji u vidu HPK i njihovih toksičnih, kancerogenih i genotoksičnih efekata učinili su tekstilnu industriju jednim od glavnih izvora ozbiljnih ekoloških problema širom svijeta (Vandevivere *et al.*, 1998). U

zakonima Evropske unije koji se tiču industrijske otpadne vode, neprestano se donose nove uredbe koje obavezuju industriju na tretman otpadne vode (European Water Framework Directive 2000/60/EC).

### 2.2.3 Klasifikacija boja

Međunarodni sistem klasifikacije je Indeks boja (eng. Colour index, CI); to je publikacija koju je objavilo *Society of Dyers and Colourists* 1924. godine (O'Neill *et al.*, 1999). Boje su klasifikovane davanjem generičkog imena određenog upotrebnom karakteristikom boje, što je praćeno CI brojem koje se daje na osnovu hemijske strukture boje. Dodatno, boje mogu biti klasifikovane po hemijskoj strukturi ili po metodi primjene.

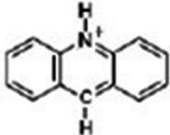
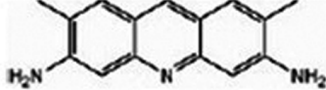
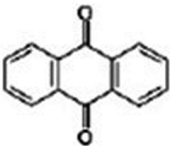
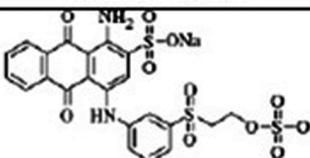
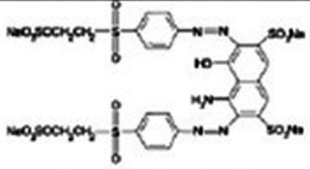
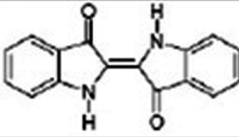
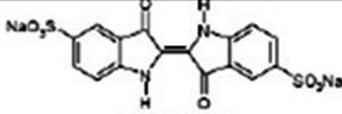
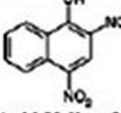
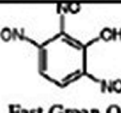
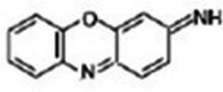
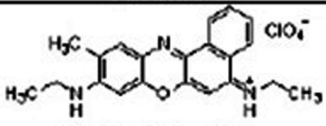
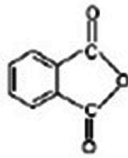
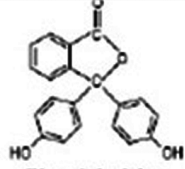
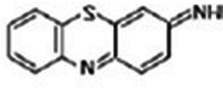
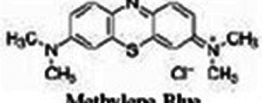
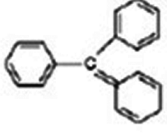
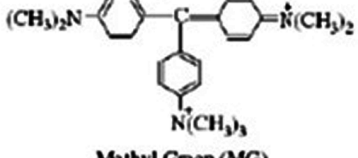
#### 2.2.3.1 Klasifikacija boja na osnovu hemijske strukture

Boje se sastoje od funkcionalne grupe odgovorne za boju, tj. hromofore i elektron-privlačnih ili elektron-donorskih supstitutenata koji se nazivaju auksohromi (Christie 2001), koji pojačavaju boju i doprinose velikoj rastvorljivosti boja u vodi. Neki auksohromi takođe pojačavaju afinitet boje za vezivanje za tekstil (prirodni ili sintetički). Najvažnije hromofore su azo ( $-N=N-$ ), karbonil ( $-C=O$ ), metin ( $-CH=$ ), nitro ( $-NO_2$ ) i hinoidne grupe. Najvažnije auksohromne grupe su hidroksilna ( $-OH$ ), sulfonatna ( $-SO_3H$ ), karboksilna ( $-COOH$ ) i amino ( $-NH_2$ ). Najčešće klase boja, podjeljene na osnovu prisutne hromofore su prikazane u tabeli 1.

#### 2.2.3.2 Klasifikacija boja na osnovu metode primjene

Kisele boje - koriste se za vlakna kao što su najlon, vuna, svila, modifikovana akrilna vlakna i donekle za bojenje papira, kože, ink-jet štampače, hranu i kozmetiku, ali ne značajno za bojenje celuloznih vlakana. Vezivanje za vlakno se dijelom ostvaruje putem elektrostatičkih interakcija između anjonske grupe boje i katjonske grupe na vlaknu. Glavne klase ovih boja su azo (uključujući metalizovane), antrahinonske, trifenilmetanske, azinske, ksantenske, nitro i nitrozo boje. One su uglavnom rastvorne u vodi. Primjeri ovih boja su: CI Acid red 128, CI Acid blue 113, CI Acid blue 29, CI Acid yellow 7 itd.

Tabela 1. Klasifikacija boja na osnovu prisutne hromofore.

Klasa	Hromofora	Primjer
Akridinska		 Acridine Yellow G
Antrahinonska		 Remazol Brilliant Blue R (RBBR)
Azo	$—N=N—$	 Reactive Black 5 (RB5)
Indigoid		 Acid Blue 71
Nitro	$—N(=O)_2$	 Acid Yellow 24
Nitrozo	$—N=O$	 Fast Green O
Oksazinska		 Oxazine 170 perchlorate
Fenolftaleinska		 Phenolphthalein
Tiazinska		 Methylene Blue
Trifenilmetil		 Methyl Green (MG)

Bazne (katjonske) boje - koriste se za bojenje papira, poliakrilonitrila, modifikovanog najlona i modifikovanih polestara. Međutim, originalno su korišćene za bojenje vune, svile i taninom-fiksiranih/impregniranih pamuka. Obično se dodaje sirćetna kiselina u rastvor boje da bi se favorizovalo vezivanje boje za vlakna. Glavne hemijske klase su diazahemicijaninska, triarilmetanska, cijaninska i hemicijaninska, tiazinska, oksazinska i akridinska. Primjeri ovih boja su: Red 2GL, Light Yellow 7GL, Brilliant Blue RL, Pink FG, Turquoise Blue GB, Black WHL itd.

Direktne boje - koriste se za bojenje pamuka, rejonu, papira, kože, vune, svile i donekle najlona. Takođe se koriste kao pH indikatori i za razna bojenja u biologiji. Direktno bojenje su uglavnom odvija na neutralnom ili blago baznom pH, blizu temperature ključanja sa dodatkom natrijum-sulfata ili natrijum-hlorida. Obično su to boje iz klasa poliazoo jedinjenja, zajedno sa nekim stilbenima, ftalocijaninima i oksazinima. Primjeri ovih boja su: CI Direct Yellow 50, CI Direct Red 23, CI Direct Blue 98, CI Direct Brown 116, CI Direct Black 22 itd.

Disperzne boje - originalno razvijene za bojenje celulozo-acetata, ali se uglavnom koriste za poliester i donekle za bojenje najlona, celuloze i akrilnih vlakana. U osnovi to su u vodi nerastvorne nejonske boje koje se koriste za bojenje hidrofobnih vlakana iz vodenih disperzija. Ove boje se fino melju u prisustvu disperzionog sredstva i prodaju se kao paste ili kao prašak (spray dried). Uglavnom sadrže azo, atrahinonske, stiril, nitro i benzodifuranonske grupe. Primjeri ovih boja su: CI Disperse Yellow 218, CI Disperse Violet 33, CI Disperse Navy 35, Disperse Black C-MDA itd.

Mordant (fiksirajuće) boje - koriste se za bojenje vune (30% od ukupnih boja koje se koriste za vunu), kožu i prirodna vlakna nakon predtretmana sa metalima i anodizovanim aluminijumom. Vrlo su korisne za crne i teget nijanse. Većina prirodnih boja pripada ovoj grupi i može se naći mnoštvo literaturnih podataka o njihovoj primjeni. Mnoge od ovih boja, naročito one koje sadrže jone teških metala, mogu biti opasne po zdravlje ljudi. Neke od njih imaju azo i antrahinonske grupe. Primjeri ovih boja su: CI Mordant yellow 1, Mordant orange 6, Mordant red 15, Mordant green 17 itd.

Vat boje - uglavnom se koriste za bojenje pamuka. Nerastvorne su u vodi i nisu sposobne da oboje vlakna direktno. Ipak, leuko-forma boje, koja se dobija redukcijom u alkalnom rastvoru (bazne soli metala), je rastvorna u vodi i ima visok afinitet za tekstilna vlakna. Naknadna oksidacija vraća originalnu, nerastvornu, boju. Boje iz ove grupe sadrže antrahinonske (uključujući policiklične hinone) i indigoidne boje. Primjeri ovih boja su: Vat black 16, Vat black 25, Vat brown 57, Vat orange 7, Vat green 3, Indanthren Yellow G itd.

Reaktivne boje - koriste se uglavnom za bojenje celuloznih materijala, ali takođe u manjoj mjeri za bojenje vune i najlona. Ove boje koriste hromoforu koja je vezana za grupu koja može direktno da reaguje sa vlaknom. Ove boje formiraju kovalentne veze sa prirodnim vlaknima, što ih čini trajnim bojama. Neke reaktivne boje poput boja Procion MX, Cibarcron F i Drimarene K mogu da se koriste na sobnoj temperaturi i nazivaju se "hladnim" reaktivnim bojama. Reaktivne boje sadrže grupe azo, antrahinonske, triarilmetanske, ftalocijaninske, formazanske, oksazinske itd. Njihove hemijske strukture su jednostavnije od struktura drugih boja. Njihovi apsorpcioni spektri pokazuju oštrije pikove i finalna boja je svjetlija u odnosu na bojenje direktnim bojama. One su najviše rasprostranjene i najčešći su izbor za bojenje pamuka i drugih celuloznih vlakana u kućnoj radinosti ili umjetničkim radionicama.

Sumporne boje - koriste se za bojenje pamuka i rejonu i imaju ograničenu upotrebljivost sa poliamidnim vlaknima, svilom, kožom, papirom i drvetom. Mala cijena i velika brzina ispiranja su ih učinile važnom klasom boja sa ekonomske tačke gledišta. Ove boje imaju dva koraka u bojenju. Prvo bojenje daje žutu ili žutozelenu boju, ali nakon sumpornog tretmana dobija se tamno crna boja, često korišćena za bojenje čarapa. Primjeri ovih boja su: Liquid sulphur red GGF, Liquid sulphur light green, Liquid sulphur sky blueCV, Liquid sulphur black BN, BRN itd.

Boje za rastvarače - uglavnom se koriste za bojenje plastičnih masa, benzina, lubrikanata, ulja i voskova. Nerastvorne su u vodi i uglavnom nepolarne do slabo polarne. Dominantne grupe su azo- i antrahinonske, ali koriste se i one sa ftalocijaninskim i triarilmetanskim grupama. Koriste se u tekstilnoj i kožnoj industriji,

proizvodnji papira, tehnologiji hrane, poljoprivredi, sistemima za korišćenje solarne energije, fotoelektričnim ćelijama, bojenju kose i kozmetici. Najvažnija industrijska upotreba je bojenje tekstila. Među boje za rastvarače spadaju: Solvent Yellow 2, Solvent Red 23, Solvent Orange 2, Solvent Blue 35, Solvent Black 5, Solvent Green 7 itd.

## 2.3 Metode za uklanjanje ksenobiotika

Ksenobiotici su sve supstancije koje nisu prirodno prisutne u organizmu ili životnoj sredini. Naziv ksenobiotik vodi porijeklo od grčkih riječi *xenos* (stran) i *bios* (život). U ksenobiotike se ubrajaju: industrijske hemikalije, proizvodi za ličnu higijenu i kozmetički proizvodi, lijekovi koji se koriste u medicine i veterini, pesticidi, fenolna jedinjenja, boje itd. Tretman ksenobiotika u otpadnim vodama nije razmatran u većoj mjeri sve do 1980. godine. Za više od polovine boja koje su tada korišćene nije se znala struktura. Ipak, sa porastom brige o zdravstvenim problemima i mogućim uticajima na okolinu proizvođači boja, korisnici i vlade mnogih zemalja su počeli da posvećuju pažnju ovom problemu (Gupta i Suhas, 2009). Od tada su predložene različite metodologije za tretman efluenata, a koje su klasifikovane u tri kategorije: fizičke, hemijske i biološke.

### 2.3.1 Fizičke metode uklanjanja ksenobiotika

#### 2.3.1.1 Odvajanje fenola ekstrakcijom

Nekoliko organskih rastvarača, poput ugljovodonika i jedinjenja sa kiseonikom mogu da se koriste za ekstrakciju fenola iz vodenih sistema (n-heksan, cikloheksan, benzen, toluen, etilbenzen, kumen, acetatni estri). Voda bogata fenolom koja nastaje u procesu proizvodnje kumena (prilikom baznog pranja i destilacije sirovog acetona koji nastaje u procesu baznog pranja kumena) i koja sadrži do 1-3% fenola (Jordan *et al.*, 2002; Schmidt, 2005) se ekstrahuje nekim od pomenutih rastvarača i tako se oslobađa većine fenola. Ovim tretmanom je moguće smanjiti koncentraciju fenola na 20-500 mg/L (Busca *et al.*, 2008). Ostatak fenola se mora ukloniti nekim drugim tretmanom, biološkim npr.



### 2.3.1.2 Adsorpcija

Adsorpcioni procesi se najviše koriste u prečišćavanju otpadne vode. Konvencionalni napakovani reaktori uključuju faze zasićenja (adsorpcije, tj. nanošenja) nakon kojih slijedi desorpcija (eluiranje, tj. regeneracija). Međutim, regeneracija nije uvijek moguća ili pogodna. U tom slučaju adsorbens se uklanja i odlaže, a u slučaju fenolnih zagađivača uništava se spaljivanjem u posebnim pećima.

Pojam adsorpcija odnosi se na procese u kojima se supstancija koncentruje na čvrstoj površini iz tečnog ili gasovitog okruženja. Postoje dva tipa adsorpcije po tipu privlačnih sila između čvrste površine i adsorbovanog molekula. Ukoliko je privlačna sila fizička po prirodi onda govorimo o fizičkoj adsorpciji (fiziosorpciji) i u tom slučaju van der Waalove sile pokreću proces. Adsorpcija je slaba i reverzibilna. U drugom slučaju, ako je privlačna sila rezultat hemijskog vezivanja, govorimo o hemijskoj adsorpciji (hemisorpciji). Zbog jačih (hemijskih) veza, teško je ukloniti hemisorbovane molekule sa površine. Adsorpcione metode se koriste u velikoj mjeri zbog svoje efikasnosti u uklanjanju otpornih toksičnih jedinjenja koja je teško tretirati drugim metodama. Adsorpcija se ne koristi samo za uklanjanje boja i fenola, već ima široku primjenu u tretmanu otpadne vode generalno (Bansal i Goyal, 2005; Mantel 1951).

#### 2.3.1.2.1 Aktivni ugalj

Korišćenje uglja kao adsorbensa za prečišćavanje vode datira iz antičkih vremena (Cheremisnoff, 2002). Adsorpcija na poroznom uglju opisana je u Egipatskom papirusu iz 1550. godine pne, a opisana je i od strane Hipokrata i Plinija Starijeg. 1785. godine Lovic (Lowitz) je ispitivao reverzibilnu adsorpciju boje i mirisa iz vode na uglju (Tien, 1994).

Najčešći adsorbens za fenolna jedinjenja je aktivni ugalj. U tečnom sistemu adsorpcioni kapacitet aktivnog uglja zavisi od brojnih faktora kao što su fizička priroda adsorbensa (struktura pora, sadržaj pepela, funkcionalne grupe, od kog je prekursornog materijala dobijen i na koji način), priroda adsorbenta (rastvorljivost, pKa, prisutne funkcionalne grupe, polarnost, molekulska masa i veličina molekula) i uslovi sredine (pH, jonska sila i dostupnost kiseonika). Kao moguće interakcije između površine

aktivnog uglja i fenolnih molekula su predložene (Laszlo *et al.*, 2003): (a) elektron donor-akceptor interakcije između aromatičnog prstena fenola i baznih kiseonikovih atoma na površini, kao što su karbonilne grupe, (b) disperzioni efekat između aromatičnog prstena fenola i  $\pi$ -elektrona grafitne strukture, (c) elektrostatička privlačenja i odbijanja u prisustvu jona.

Zahvaljujući amfoternim osobinama površine aktivnog uglja njegove adsorpcione osobine zavise od pH vrijednosti rastvora. Ako se adsorpcija odigrava u nepuferisanom rastvoru, blizu neutralnom ili u slabo kiselom pH, sve tri vrste pomenutih interakcija mogu da se dešavaju istovremeno. U kiselim rastvorima ( $\text{pH} \leq 3$ ) fenolna jedinjenja se nalaze u nejonizovanom obliku, a funkcionalne grupe na površini uglja su neutralne ili pozitivno naelektrisane. Pri ovakvim uslovima što je polarnija površina uglja, slabija je adsorptivnost fenola, jer su adsorpcija vode i fenola kompetitivne. Za  $\text{pH} > \text{p}K_a$  (npr, na pH 11), fenoli disosuju formirajući fenolatne anjone, dok su površinske funkcionalne grupe neutralne ili negativno naelektrisane. Elektrostatičko odbijanje istoimenih naelektrisanja smanjuje adsorpcioni kapacitet. Sem toga, fenolatni anjoni su rastvorljiviji u vodi u odnosu na same fenole, pa je neophodno raskinuti jače adsorbat-voda veze prije nego što dođe do adsorpcije (Busca *et al.*, 2008).

Poznato je da se neki fenoli i njihovi derivati adsorbuju na aktivni ugalj ireverzibilno (nije moguća desorpcija ni grijanjem na  $800^\circ\text{C}$ ) (Busca *et al.*, 2008). Adsorpcija fenola zavisi od prisustva kiseonika u rastvoru (Terzyk, 2007). Dva su važna efekta: hemisorpcija i oksidativno kuplovanje. Hemisorpcija vodi formiranju kovalentnih veza između fenola i površine aktivnog uglja, dok oksidativno kuplovanje daje dimerne, trimerne i multimerne fenolne proizvode reakcije. Regeneracija aktivnog uglja, neophodna da bi adsorptivni tretman bio ekonomski isplativ, je znatno otežana ireverzibilnom adsorpcijom fenola (Busca *et al.*, 2008).

Aktivni ugalj je takođe najčešće korišćeni materijal za adsorpciju boja, jer je vrlo efikasan u uklanjanju katjonskih, mordant i kiselih boja (Nasser i el Geundi 1991). Ipak, da bi se proces uklanjanja boja ubrzao moraju da se koriste ogromne količine aktivnog uglja (Robinson *et al.*, 2001), tako da je ova metoda izuzetno skupa; pored toga, regeneracija (gubitak 10-15% početnog adsorpcionog kapaciteta) i odlaganje finalnog otpada moraju posebno da se rešavaju za svaki pojedinačni slučaj.

#### 2.3.1.2.2 Silika-gel

Silika-gel je porozan i amorfan, različite granulacije; priprema se koagulacijom koloidne silikatne kiseline. U poređenju sa aluminijum-oksikom silika-gel ima znatno veću aktivnu površinu u opsegu od 250 do 900 m<sup>2</sup>/g (Do, 1998). Ovaj materijal je efikasan za uklanjanje baznih boja (Alexander i McKay, 1977); ipak, njegova visoka cijena i moguće sporedne reakcije su ga učinile nepogodnim za komercijalnu upotrebu (McKay *et al.*, 1999).

#### 2.3.1.2.3 Zeoliti

Zeoliti su prirodni mikroporozni adsorbensi, ali mogu da budu i sintetički. Smatraju se selektivnim adsorbentima i pokazuju molekulska adsorpciju (Caputo i Pepe, 2007) i jonoizmjenjivačke osobine (Adebajo *et al.*, 2003). Mnogi zeoliti su korišćeni za uklanjanje boja, međutim ne uvijek uspješno, jer je pokazano da adsorpcija zavisi od koncentracije boje, pH i temperature, pa je potrebna optimizacija procesa za svaku boju pojedinačno (Alpat *et al.*, 2008).

#### 2.3.1.2.4 Jeftini adsorbensi (Low-cost adsorbent, LCA)

LCA su obično prirodni materijali, otpad/nusproizvod industrije ili sintetički materijali koji mogu da budu korišćeni kao adsorbensi i obično imaju malu ili nultu cijenu u industrijskom lancu. Takvi materijali mogu da budu od velike koristi manje industrijalizovanim zemljama u razvoju koje se suočavaju sa velikim problemom otpadne vode. Skorije, Gupta i Suhas (2009) su dali predlog protokola baziranog na brojnim studijama za razvoj i primjenu LCA. Oni su dali pregled prednosti i mana adsorbenasa, povoljnih uslova i određenih adsorbat-adsorbens sistema.

#### 2.3.1.3 Membranska filtracija

Filtraciona tehnologija se koristi za proizvodnju pijaće vode i tretman otpadne vode. Uopšteno, pojam filtracije obuhvata mikrofiltraciju, ultrafiltraciju, nanofiltraciju i

processe reverzne osmoze. Ovi procesi su ispitivani i za uklanjanje boja. Mikrofiltracija nije mnogo korisna zbog velikih pora (Cheremisinoff, 2002). Ultrafiltracija i nanofiltracija su efikasne za uklanjanje svih vrsta fenola i boja, ali boje često zapuše pore membrane, ograničavajući upotrebu ovih separacionih sistema za tretman tekstilnih efluenta (Cheremisinoff, 2002). Glavne mane filtracionih sistema su veliki radni pritisci i potrošnja energije, cijena membrane i njihov kratak upotrebni vijek. Sa druge strane, reverzna osmoza se pokazala kao efikasni sistem za obezbojavanje i desalinaciju, ali ograničavajući faktor je cijena procesa (Marcucci *et al.*, 2001).

### **2.3.2 Hemijske metode uklanjanja ksenobiotika**

#### **2.3.2.1 Koagulacija/flokulacija sa dodatkom reagenasa**

Fino dispergovane čestice (koloidi) suspendovane u otpadnoj vodi su stabilizovane negativnim naelektrisanjem na površini čestica, što ih međusobno odbija i sprečava spajanje i formiranje čestica veće mase (flokove), pa ne mogu da se uklone sedimentacijom. Da bi se ovakve čestice uklonile potrebne su hemijska koagulacija i flokulacija. Ovi uzastopni procesi su kombinacija fizičkih i hemijskih metoda. Hemijska sredstva se dodaju otpadnoj vodi kako bi se favorizovala agregacija suspendovanih čestica u dovoljno velike čestice da mogu da se uklone sedimentacijom. Koagulacija je destabilizacija koloida neutralisanjem sila koje ih čine razdvojenim. Rezultat je nastajanje većih čestica (flokova), koje dalje aglomerišu dodatkom polimera za flokulaciju.

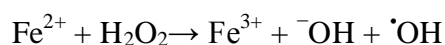
Jedan od najrobustnijih načina za uklanjanje boje iz obojene otpadne vode je hemijski tretman sa koagulišućim/flokulirajućim reagensom (Zhou *et al.*, 2008). Proces uključuje dodatak jona aluminijuma ( $\text{Al}^{3+}$ ), kalcijuma ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ili govžđa ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ovaj proces je ekonomski isplativ i daje zadovoljavajuće rezultate u uklanjanju disperznih, sumpornih i vat boja. Međutim, rezultati sa azo-reaktivnim, kiselim- i posebno baznim-bojama nisu dobri. Glavna mana ovog procesa je formiranje mulja u velikim količinama, kao i to što je proces pH zavisna (Kace i Linford, 1975). Koagulacija u sinergizmu sa tretmanom enzimima je efikasna za tretman fenolne otpadne vode (Wada *et al.*, 1993), jer koagulansi poput hitozana i polietilenimina uklanjaju reaktivne međuproizvode time sprečavajući inaktivaciju enzima.

### 2.3.2.2 Napredni oksidacioni procesi (advanced oxidation processes, AOP)

AOP se obično koriste za uklanjanje boja djelimično ili u potpunosti. Oni su među najčešće korišćenim metodama za obezbojavanje, jer zahtjevaju male količine reagenasa i imaju kratka reakciona vremena.

#### 2.3.2.2.1 Fenton-ov reagens

Konvencionalna Fentonova reakcija (Neyens i Baeyens, 2003) koristi vodonik peroksid i soli gvožđa (II) za dobijanje velike količine hidroksil radikala koji mogu da oksiduju organska jedinjenja u rastvoru. Korišćenje Fentonovog reagensa je jedan od najefikasnijih načina generisanja  $\cdot\text{OH}$  radikala. Zbog jednostavne opreme i blagih reakcionih uslova (atmosferski pritisak i sobna temperatura) smatra se jednom od ekonomski isplativih oksidacionih alternativa. Mehanizam generisanja  $\cdot\text{OH}$  radikala je kompleksan. Ukratko, vodonik peroksid se katalitički raspada dejstvom  $\text{Fe}^{2+}$  na kiselom pH ( $\text{pH} \leq 3$ ) dajući hidroksil radikale:



$\text{Fe}^{3+}$  može da reaguje, na kiselom pH, sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  u tako zvanom Fentonu-sličnoj reakciji, regenerišući katalizator i dajući  $\text{HO}_2\cdot$  radikal, tako održavajući proces. Ovaj reagens je atraktivan oksidacioni sistem za tretman otpadne vode, zbog činjenice da je gvožđe lako dostupno i netoksično, a vodonik-peroksid je lak za rukovanje. Organski molekuli bi mogli da budu kompletno mineralizovani. Ipak, za efikasnu reakciju je potrebno kiselo pH i stehiometrijski višak vodonik-peroksida, a to obično znači da je potrebno odlaganje značajne količine feri soli nakon završene reakcije (Busca *et al.*, 2008). Dodatno, tehnički zahtjevi za optimizaciju i praćenje efikasnosti Fentonove reakcije su kompleksni i skupi (Busca *et al.*, 2008), što ograničava njenu široku upotrebu. Čak i sa optimizacijom efikasnosti reakcije ova tehnika zahtjeva velika ulaganja, što je veliko ograničenje. Zbog pobrojanih razloga, Fentonova reakcija bi mogla da bude jedan od predtretmana kako bi se poboljšali dalji koraci – mikrobiološka ili enzimska transformacija.

Fentonov reagens je vrlo efikasan u uklanjanju rastvornih i nerastvornih boja (kiselih, direktnih, u kompleksu sa metalima) (Pak i Chang, 1999; Wang, 2008). Mana

ovog procesa je uski radni pH opseg ( $< 3.5$ ) (Cheng *et al.*, 2004), formiranje mulja i dugo reakciono vrijeme.

#### 2.3.2.2.2 Hlor i hlorni derivati

Hlor je jako oksidaciono sredstvo i može da se koristi kao kalcijum ili natrijum-hipohlorit. Mnogo se koristi u procesu uklanjanja boja, dok u tretmanu fenolne otpadne vode može da dovede do dobijanja toksičnijih hlorovanih fenola. Reaktivne, kisele, direktne i metalne boje se u značajnoj mjeri uklanjaju hipohloritom. U vodi nerastvore disperzne i vat boje su otporne na ovaj tretman (Namboodri *et al.*, 1994). Korišćenje hlora kao gasa je jeftin proces, ali generiše hlorovana organska jedinjenja, koja mogu da budu toksičnija od polaznih jedinjenja.

#### 2.3.2.2.3 Ozonoizacija

Ozonizacija je tehnologija koja je korišćena 70-ih godina prošlog vijeka i odvija se generisanjem ozona. Ova tehnologija je bila vrlo efikasna, ali je skupa za uklanjanje boja (Soares *et al.*, 2006). Predloženo je da se ozonizacija koristi za potpuno uklanjanje boje i smanjivanje HPK donekle, što bi omogućilo vraćanje vode u proces. Mana ove tehnologije sem visoke cijene je potreba za *in situ* proizvodnjom ozona.

Ozonizacija podrazumjeva molekularni ozon koji djeluje na nukleofilnim mjestima i nezasićenim vezama organskih molekula. Ozon predstavlja jedan od naj snažnijih oksidansa koji se koristi (Chedeville *et al.*, 2007), sudeći po njegovom visokom redoks potencijalu i na kiselom i na baznom pH ( $E^{\circ}=2,07V$  i  $E^{\circ}=1,24V$ , respektivno).

#### 2.3.2.2.4 Elektrohemijska metoda

Obezbojavanje se postiže elektrooksidacijom sa nerastvornom anodom ili elektrokoagulacijom korišćenjem potrošnog materijala. Postignuto je uspješno elektrodegradiranje boja korišćenjem različitih anodnih materijala, kao što su provodni polimeri (Dogan i Turkdemir, 2005). Ova tehnologija nije efikasna samo u uklanjanju

rastvornih i nerastvornih boja, nego i u smanjenju HPK. Velika mana je cijena električne energije, proizvodnja mulja i zagađenje uzrokovano hlorovanim organskim jedinjenjima i teškim metalima zbog indirektno oksidacije.

### **2.3.2.3 Fotohemijska oksidacija**

#### **2.3.2.3.1 Fotohemijski tretman**

Degradacija molekula boje UV zracima u prisustvu oksidansa ( $H_2O_2$  npr.) je posledica proizvodnje hidroksil radikala u velikoj koncentraciji. Brzina degradacije zavisi od intenziteta UV zračenja, pH, strukture boje i sastava otpadne vode (Slokar i Le Marechal, 1998).

#### **2.3.2.3.2 Foto-Fenton**

Kombinacija Fentonove reakcije i UV zraka naziva se foto-Fentonovom reakcijom. Ova tehnika poboljšava efikasnost Fentonove reakcije i daje obećavajuće rezultate za tretman obojene otpadne vode (Bandala *et al.*, 2008).

### **2.3.3 Biološke metode uklanjanja ksenobiotika**

Biološke metode mogu da budu aerobne ili anaerobne i smatraju se najefikasnijim metodama za uklanjanje većine zagađivača iz otpadne vode. Različite vrste mikroorganizama se koriste u zavisnosti o kom tipu otpadne vode se radi. Glavna prednost ove tehnike je niska operativna cijena procesa. Bakterije i gljive su dvije grupe mikroorganizma koje su mnogo proučavane za tretman obojene otpadne vode. Sekretovani bakterijski enzimi mogu da razgrade organska jedinjenja, pa se izolovanje aerobnih bakterijskih sojeva sposobnih za razgradnju različitih boja odvija više od dvije decenije (Rai *et al.*, 2005). Takođe, razni sojevi gljiva i njihovi enzimi su detaljno proučavani od mnogih autora za iste svrhe (Duran i Esposito, 2000). Gljive bijelog truljenja su takođe korišćene za uklanjanje boja. Ovaj proces uklanjanja boja može da se odvija adsorpcijom boje na micelijum gljive, pravom razgradnjom molekula boje ili

kombinovanim procesom. Ipak, postoje važna ograničenja upotrebe gljiva bijelog truljenja. Dodatak nutrijenata da bi se obezbijedio optimalan rast je neophodan, pošto je proces degradacije boja pripisan putevima sekundarnog metabolizma. Važno je naglasiti da različiti faktori poput koncentracije zagađivača, koncentracije boje, početnog pH i temperature efluenta utiču na proces obezbojavanja (Duran i Esposito, 2000). Takođe, produkcija enzima uključenih u razgradnju boje nije konstantna sa vremenom i na nju utiče prisustvo inhibitora koji se mogu naći u efluentima. Da bi se prevazišli ovi problemi, upotreba enzima uključenih u razgradnju boje, umjesto čitavih mikrobnih kultura privlači pažnju istraživača. Prednost korišćenja enzima umjesto kultura se zasniva na kraćem tretmanu, radu sa visokim i niskim koncentracijama supstrata, odsustvu lag perioda neophodnog za formiranje biomase, smanjenju količine formiranog mulja i lakoći kontrole procesa (Akhtar i Husain 2006; Lončar *et al.*, 2011). Pored toga, eliminiše se potreba za *in situ* produkcijom ligninolitičkih enzima, koja zavisi od metaboličkog stanja kultura, koje sa druge strane zavisi od fizioloških uslova kao što su pH sredine i sastav efluenta. Samostalni tretman enzimima može da bude dovoljan posebno u slučajevima kada enzimi transformišu toksična jedinjenja u manje toksične proizvode. U takvim slučajevima, kompletna degradacija kontaminanta možda nije ni potrebna.

Praktična ograničenja upotrebe solubilnih enzima su visoka cijena proizvodnje, izolovanja i prečišćavanja i kratak poluživot. Cijena proizvodnje može da bude snižena izolovanjem enzima iz agrootpada ili gajenje mikrobnih producenata oksidativnih enzima na takvim materijalima fermentacijom na čvrstoj fazi, nakon čega se enzim koristi ili u sirovoj ili djelimično prečišćenoj formi (Roriz *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009).

Ideja višestruke upotrebe enzima sugeriše da stabilnost enzima mora da bude dovoljna da omogući višestruku upotrebu, što znači da imobilizovani enzim mora da bude veoma stabilan da bi se razvio odgovarajući proces. Dakle, iako postoje stotine protokola za imobilizaciju enzima, dizajn novih protokola koji poboljšavaju stabilnost enzima je i dalje izazov.



### 2.3.4 Tretman fenolne i obojene otpadne vode rastvornim i imobilizovanim enzimima

Industrijsko bojenje tekstila konzumira velike količine vode i energije, dok se istovremeno 5–40% korišćenih boja oslobađa u efluentima (Silva *et al.*, 2010). Oslobođene boje mogu ozbiljno da ugroze fotosintetičku aktivnost ekosistema u otvorenim površinskim vodama jer onemogućavaju apsorpciju sunčevog zračenja i integritet ekosistema zbog svoje toksičnosti. Kako su neke od boja otporne na mikrobiološku degradaciju postoji potreba za poboljšanjem postojećih tehnologija i uvođenjem novih, čistih i efikasnijih tehnologija koje bi omogućile njihovu razgradnju (Verma *et al.*, 2003). Alternativna tehnologija je, kao i u slučaju fenolne otpadne vode, upotreba oksidativnih enzima. U slučaju obojene vode javlja se novi problem, a to je pitanje isplativosti korišćenja imobilizovanih enzima, jer brzo dolazi do adsorpcije boje po biokatalizatoru, a samim tim se i vezani enzim inaktivira.

Polifenoloksidaze i peroksidaze mogu da djeluju na specifične otporne zagađivače precipitiranjem ili transformacijom u neke manje toksične ili manje otporne proizvode, omogućavajući finalnu obradu vode. Dodatne prednosti enzimskog tretmana u poređenju sa konvencionalnim tretmanom su: primjena na otporne ksenobiotike, upotreba prilikom malih i velikih koncentracija ksenobiotika u širokom opsegu pH, temperature i saliniteta, kao i olakšana kontrola procesa. Ipak, glavna prepreka u komercijalnoj primjeni rastvornih enzima za pomenute svrhe je njihova ograničena operaciona stabilnost, što znači da je potrebno kontinualno snabdijevanje velikih količina svježeg i djelimično prečišćenog enzima. Poboljšanje operacione stabilnosti enzima i poluživota, samim tim i smanjenje cijene procesa je postignuto imobilizacijom enzima (Duran i Esposito, 2000). Procedure za imobilizaciju enzima često zahtjevaju prečišćene enzime i skupe nosače ili reagense (Levy *et al.*, 2003). Svrha ovih procedura je naravno višestruka upotreba enzima. Međutim, sve pomenuto čini dobijeni biokatalizator skupim, pa su potrebni novi protokoli za imobilizaciju kako bi se dostigla masivna implementacija/eksploatacija enzima kao katalizatora u kompleksnim hemijskim procesima pod blagim eksperimentalnim uslovima koji bi ujedno bili i bezbjedni po okolinu. S toga postoji stalna potreba za nalaženjem novih, jeftinih nosača za imobilizaciju, kao i jeftinih izvora enzima koji bi se koristili za imobilizaciju sa ciljanom primjenom u tretmanu otpadne fenolne vode.

## 2.4 Polifenol oksidaze (fenoloksidaze)

Fenoloksidaze su oksidoreduktaze koje katalizuju oksidaciju fenolnih jedinjenja. Podijeljene su u dvije subklase, tirozinaze i lakaze. Obje grupe koriste molekularni kiseonik i nije im potreban kofaktor.

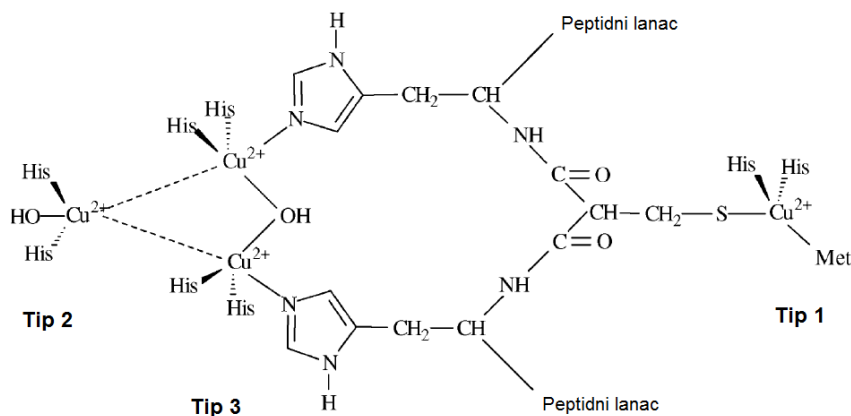
### 2.4.1 Lakaza

Lakaza je kuproprotein koji pripada maloj grupi enzima nazvanih plave oksidaze (Karam i Nicell, 1997). Lakaza (E.C. 1.10.3.2., *p*-benzendiol:kiseonik oksidoreduktaza) je oksidoreduktaza koja može da katalizuje oksidaciju različitih aromatičnih jedinjenja (naročito fenola) uporedo sa redukcijom kiseonika do vode (Karam i Nicell, 1997; Thurston 1994). Uopšteno, lakaze sadrže četiri bakarna jona koji imaju važnu ulogu u katalitičkom mehanizmu enzima. Bakarni joni su raspoređeni u različitim vezivnim mjestima i klasifikovani su u tri tipa, zavisno od specifičnih spektroskopskih i funkcionalnih osobina. Osnovni aspekti fenoloksidaza su takođe opisani u preglednim radovima (Burton, 1994; Duran i Esposito, 2000; Duran *et al.*, 2002; Gianfreda, 1999; Sanchez-Ferrer, 1995). U tipičnoj reakciji lakaze, fenolni supstrat podleže jednoelektronskoj oksidaciji dajući ariloksidirani radikal. Aktivna vrsta može da bude prevedena u hinon u drugom koraku oksidacije. I hinon kao i slobodno radikalski proizvod podleže ne-enzimskom kuplovanju što vodi polimerizaciji. Za lakaze su karakteristični slaba specifičnost ka supstratu i to što njihova katalitička sposobnost značajno varira zavisno od izvora enzima. Jednostavni difenoli kao što je hidrohionin i kateholi su dobri supstrati za većinu lakaza, ali gvajakol i 2,6-dimetoksifenol su generalno bolji supstrati (Yaropolov, 1994). Lakaze su takođe sposobne da katalizuju oksidaciju drugih supstituisanih polifenola, aromatičnih amina, benzeniola i čitave serije drugih jedinjenja, ali za razliku od tirozinaza, ne mogu da oksiduju tirozin (Majeau *et al.*, 2010). N-hidroksibenzotriazol, 5-hidroksiiminobarbiturna kiselina (violurinska kiselina) i N-hidroksiacetanilin su tri N-hidroksi jedinjenja sposobna za medijaciju različitih lakazom katalizovanih biotransformacija (Xu *et al.*, 2000). Lakaze su široko rasprostranjene među višim biljkama i gljivama, a u skorije vrijeme potvrđeno je da su lakaze široko rasprostranjene i među bakterijama (Alexandre i Zhulin, 2000). Kod gljiva

je uočena varijabilnost u mehanizmu indukcije ekspresije lakaza, stepenu polimorfizma i fizičko-hemijskim (molekulska masa, izoelektrična tačka i sadržaj ugljenih hidrata) i kinetičkim osobinama (Bollag i Leonowicz, 1984). U nekim vrstama gljiva, dodatak inducera tokom gajenja rezultuje biosintezom novih ekstraćelijskih izoformi.

#### 2.4.1.1 Aktivno mjesto lakaze

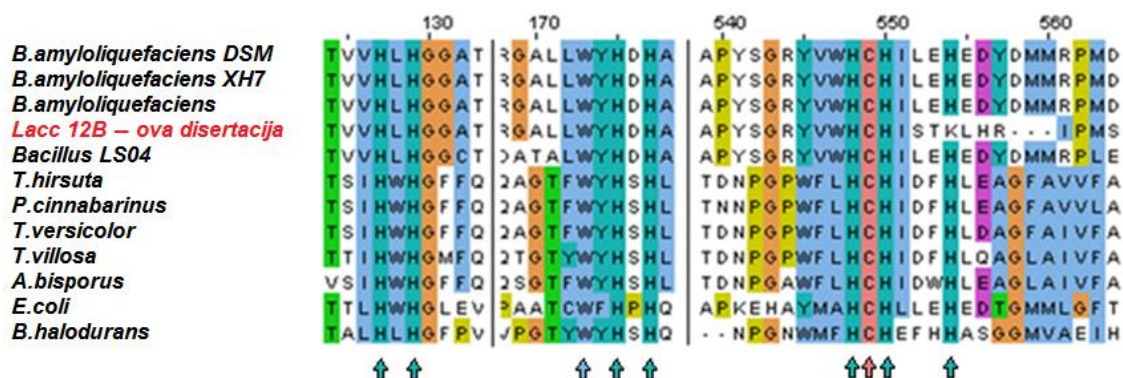
Lakaza sadrži četiri jona bakra koji su klasifikovani prema njihovim osobinama u elektron paramagnetnoj rezonantnoj spektroskopiji (EPR): Tip 1– plavi, Tip 2– normalni i Tip 3–kuplovani binuklearni bakarni centar u kom je bakar antiferomagnetno kuplovani preko premošćujućeg liganda (ne može se detektovati EPR spektroskopijom) (Sundaran *et al.*, 1997). Spektroskopijom kombinovanom sa kristalografijom dobijen je detaljni opis aktivnog mjesta lakaze. Magnetni cirkularni dihiroizam (MCD) i apsorpciona spektroskopija X-zraka lakaze su pokazale da se Tip 2 i 3 centri kombinuju da bi funkcionisali kao trinuklearni bakarni klaster koji interaguje sa egzogenim ligandom uključujući reakciju sa dikiseonikom<sup>1</sup> (Cole *et al.*, 1990). Tip 2 centar je 3-koordinovan sa dva histidinska liganda i vodom. Tip 3 bakar je 4 puta koordinovan i to sa tri histidina i premošćujućim hidoksidom (slika 1).



Slika 1. Prikaz sadrži četiri jona bakra koji su klasifikovani prema njihovim osobinama u elektron paramagnetnoj rezonantnoj spektroskopiji (EPR): Tip 1 - plavi, Tip 2 - normalni i Tip 3 - kuplovani binuklearni bakarni centar.

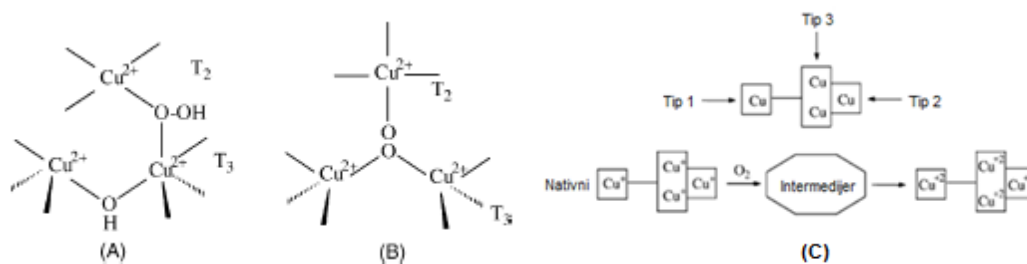
<sup>1</sup> U nomenklaturi oksidativnih enzima, dikiseonikom se smatra molekularni kiseonik, kod koga su oba atoma kiseonika koordinativno povezana.

Analizom sekvencija lakaza porijeklom iz različitih vrsta uočena je očekivana visoka konzerviranost ostataka histidina (slika 2).



Slika 2. Poređenje sekvencija lakaza porijeklom iz gljiva i bakterija. Uočavaju se visoko konzervirani ostaci histidina, triptofana i cisteina (označeni strelicama). Poređenje sekvencija urađeno je korišćenjem ClustalW2 algoritma dostupnom na URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Strukturni model premošćavanja između Tipa 2 i 3 (slika 3A i 3B) (Cole *et al.*, 1990; Palmer *et al.*, 1999; Sundaran *et al.*, 1997) je dao uvid u katalitičko redukovanje kiseonika do vode. Zaključeno je da je bakar Tipa 2 neophodan za redukciju kiseonika, jer je premošćavanje do ovog centra uključeno u stabilizaciju peroksidnog intermedijera. Redukcija kiseonika lakazom se odigrava u dva dvoelektronska koraka. Prvi određuje brzinu reakcije. U ovom Tip 2/3 modu nakon prve dvoelektronske redukcije peroksidni intermedijer omogućava drugu dvoelektronsku redukciju (od centara Tipa 2 i 1) tako što je peroksid direktno koordinovan za redukovani Tip 2 bakar, a redukovani Tip 1 bakar je kuplovan sa Tip 3 bakrom preko kovalentnih Cys-His veza (Clark i Solomon, 1992). U prethodnim studijama (Cole *et al.*, 1990) pokazano je da 40% Tip 1 i Tip 3 centara koji reaguju sa dikiseonikom odgovara nativnoj lakazi (slika 3C). Očigledno je da je Tip 2 bakar neophodan za reaktivnost dikiseonika u lakazi i da se redukcija dikiseonika odigrava u odsustvu bakra Tipa 1. Ovo pokazuje da Tip 2/3 trinuklearni centar predstavlja aktivno mjesto za vezivanje i multielektronsku redukciju dikiseonika. Tip 1 Cu nije neophodan za reaktivnost sa kiseonikom, a u njegovom odsustvu formira se intermedijer koji dijeli neke osobine sa intermedijerom kiseonika prethodno opisanog kod nativne lakaze.



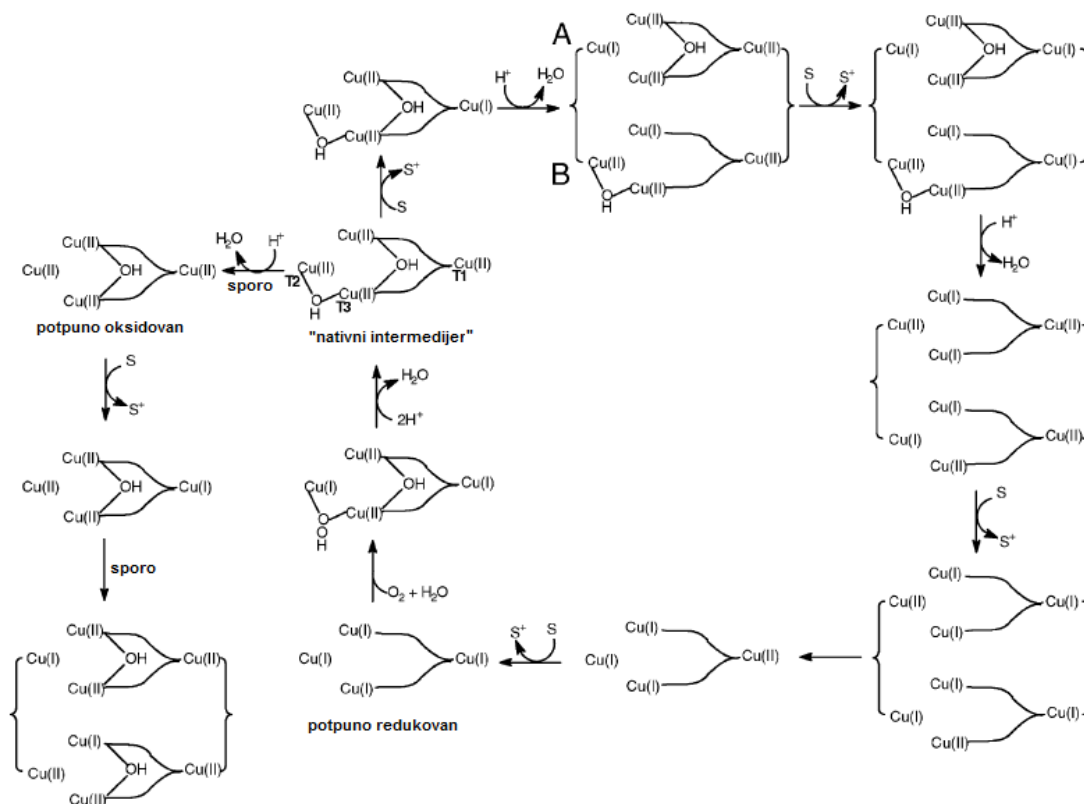
Slika 3. Dva moguća spektroskopska modela peroksidnog premošćavanja u trinuklearnom centru: **A.** premošćavanje između Tip2 i jednog od Tip3 bakarnih jona. **B.** premošćavanje sva tri bakarna jona (modifikovano po Sunduran *et al.*, 1997). **C.** Reaktivnost derivata lakaze sa kiseonikom (modifikovano po Cole *et al.*, 1990).

#### 2.4.1.2 Katalitički ciklus lakaze

Katalitički ciklus lakaze i predloženi mehanizam redukcije i reoksidacije bakarnih centara ilustrativno je prikazan na slici 4. Počevši od „nativnog intermedijera”, supstrat redukuje centar Tipa 1 (sredina na slici 4), koji za uzvrat prenosi elektron trinuklearnom jezgru. Moguća su dva mehanizma za redukciju trinuklearnog jezgra: (A) Tip 1 i Tip 2 centri zajedno redukuju par Tipa 3 ili (B) svaki bakarni jon u trinuklearnom jezgru je uzastopno redukovan prenosom elektrona iz centra Tipa 1. U tom slučaju Tip 3 centar više ne djeluje kao dvoelektronski akceptor. Spori raspad (lijevo na slici 4) “nativnog intermedijera” vodi do potpuno oksidovane forme. U ovom stanju, Tip 1 centar i dalje može da bude redukovan supstratom, ali elektronski transfer ka trinuklearnom centru je previše spor da bi bio katalitički značajan (McGuirl i Dooley, 1999).

#### 2.4.1.3 Primjena lakaza u biotehnologiji

Lakaze se smatraju industrijski značajnim enzimima zbog njihovog širokog spektra supstrata i velikog opsega reakcija koje katalizuju, uključujući umrežavanje fenolnih jedinjenja, razgradnju polimera, otvaranje aromatičnih prstenova i oksifunkcionalizovanje aromatičnih jedinjenja. Ovi enzimi su naročito interesantni kao biokatalizatori, jer ne zahtijevaju skupe kofaktore poput NADH ili NADPH kao što je slučaj sa nekim drugim oksidoreduktazama.



Slika 4. Katalitički ciklus lakaze. Modifikovano iz Solomon i Sundaran (1996).

Biotehnološka primjena lakaza uključuje tretman pulpe u proizvodnji papira, izbjeljivanje boja u tekstilnoj industriji, detoksifikaciju vode od ksenobiotika i organske sinteze (Mayer i Staples, 2002). Potencijalna polja primjene su sinteza prirodnih proizvoda kao što su pigmenti i antioksidansi preko dimerizacije fenolnih i nefenolnih kiselina (Mustafa *et al.*, 2005). Trenutno su lakaze iz gljiva jedine koje se koriste u industrijskim procesima (Xu *et al.*, 2007). Korišćenje bakterijskih lakaza bi otvorilo nove pravce biotehnološke primjene, jer je njihov nivo ekspresije, aktivnost i selektivnost mnogo lakše poboljšati dirigovanom evolucijom i racionalnim dizajnom, nego što je to slučaj sa lakazama iz gljiva. Samo je nekoliko bakterijskih lakaza do sad detaljno ispitano, iako brzi razvoj analize genoma sugerije da su ovi enzimi široko rasprostranjeni među bakterijama (Claus, 2003).

#### 2.4.1.2 Lakaze iz *Bacillus* sp.

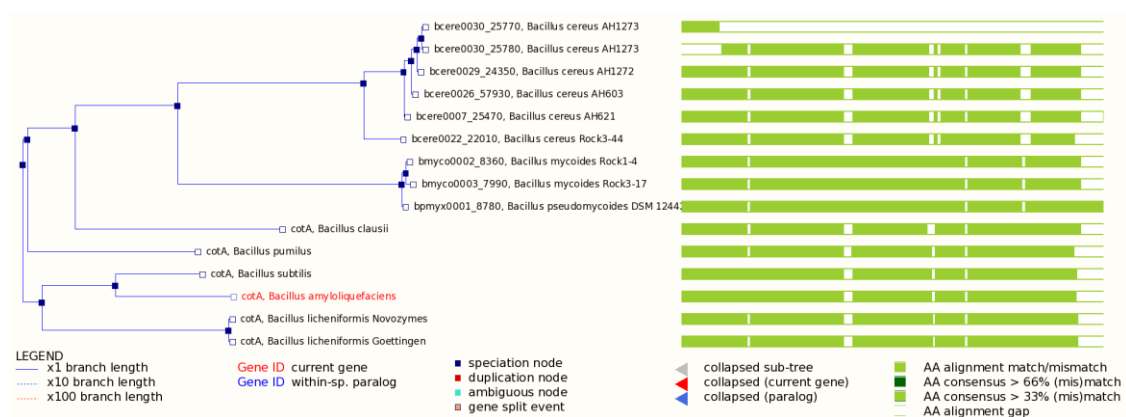
Bakterije roda *Bacillus* su Gram pozitivne, sporogene, štapićaste, čije su ćelije veličine  $0,5-2,5 \cdot 1,2-10 \mu\text{m}$ , često grupisane u parove ili lance, sa okruglim ili

četrvtastim krajevima, pokretljive su zahvaljujući flagelama. Uz vegetativne oblike stvaraju i spore, čim se nađu u nepovoljnim uslovima sredine. Endospore su ovalne, ponekad okrugle ili cilindrične i izuzetno su otporne na različite negativne uticaje. Ovaj rod karakteriše bacilni tip sporulacije (ćelija zadržava prvobitni oblik). Predstavnici ovog roda podrazumijevaju aerobne i fakultativno anaerobne, većinom katalaza-pozitivne bakterije. Po tipu metabolizma su hemoorganotrofi.

Bakterije roda *Bacillus* se mogu selektivno izolovati iz zemljišta, hrane ili vode zagrijavanjem uzorka na 80°C, 10 min. Ovim postupkom se ubijaju vegetativne ćelije, dok spore preživljavaju. Zasijanjem ovakvih uzoraka na odgovarajućoj podlozi i aerobnim inkubiranjem dobijaju se vrste roda *Bacillus* (Madigan i Martinko, 2006). Formiranje spora se pokreće nepovoljnim uslovima kao što su nedostatak hrane ili inhibitorna temperatura za rast. Ovi spoljašnji faktori se prate pomoću senzornih kinaza koje prilikom aktivacije fosforiluju sporulacione faktore. Bakterije roda *Bacillus* stvaraju endospore, odnosno spore koje nastaju u majčinskoj ćeliji. Prije formiranja spora ćelija se dijeli asimetrično. Manja ćelija prerasta u endosporu i biva ubačena u majku ćeliju (veći dio). Nakon sazrijevanja endospore majka ćelija puca i oslobađa zrelu sporu. Spore roda *Bacillus* imaju tri strukturna dela koja se mogu uočiti elektronskom mikroskopijom. Prvi dio spore koji se naziva jezgro sadrži hromozomalnu DNA. Korteks je tanki peptidoglikanski sloj iznad jezgra koji sadrži neke proteine uključene u procesu germinacije. Treći sloj se naziva omotač spore i sastoji se iz dva sloja, unutrašnjeg i spoljašnjeg. U sastav omotača ulaze brojni proteini koji doprinose specifičnoj morfologiji ćelija i koji omogućavaju visoku rezistentnost spora. Mali broj njih je okarakterisan zbog teškoće izolovanja. Spore odgovaraju brzo na hranljive supstance i vraćaju se u fiziološki aktivno stanje procesom germinacije (Kuwana *et al.*, 2002; Madigan i Martinko, 2006).

Bakterije roda *Bacillus* sintetišu i deponuju proteinski omotač oko endospore. Omotač spore sadrži bar 25 različitih polipeptida sa rasponom masa od 5-65 kDa, a neki od njih su jako umreženi (Hullo *et al.*, 2001). Ovi proteini zajedno čine lamelarni sloj koji štiti sporu od različitih stresora. U omotaču je identifikovano prisustvo lakaze, a prva i najbolje opisana bakterijska lakaza je CotA iz *Bacillus subtilis*, protein omotača endospora koji pokazuje visoku termostabilnost (Hullo *et al.*, 2001). Transkripcija od *cotA* promotora počinje kad i sinteza omotača spore (4-5 časova nakon početka

sporulacije), što sugerira da je transkripcija ovog gena uključena (direktno ili posredno) u razvoj morfoloških ili fizioloških osobina sporangije (Sandman *et al.*, 1988). Gen *cotA* kodira protein čija je masa 65 kDa i koji je lociran u spoljašnjem omotaču spore i za koji je potvrđeno da pripada grupi lakaza spektroskopskim i biohemijskim ispitivanjima. Druge bakterijske lakaze su izolovane iz *Escherichia coli* (Roberts *et al.*, 2002), *Bacillus halodurans* (Ruijsenaars i Hartmans, 2004), *Thermus thermophilus* (TTC1370) (Miyazaki, 2005), kao i iz nekoliko streptomiceta (Endo *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003). Analizom sekvencija gena koji kodiraju lakazu iz različitih vrsti roda *Bacillus* zaključujemo da se ovaj gen mijenja specijacijom, tj. da postoji zajednički predak (slika 5).



Slika 5. Filogenetsko stablo lakaze CotA iz *Bacillus amyloliquefaciens* (crveno) i veza sa lakazama iz srodnih vrsta. Stablo ukazuje na to da se *cotA* gen mijenjao procesom specijacije gena. Filogenetsko stablo je napravljeno korišćenjem algoritma Gene Tree dostupnog na URL: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org).

Kristalne strukture dvije bakterijske lakaze, CotA i CueO su dobro opisane (Enguita *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2002) i mjesto-dirigovana mutageneza je korišćena da se ispita efekat izmjene nekoliko konzerviranih aminokiselinskih ostataka na strukturu, redoks potencijal i aktivnost ovih enzima (Duraõ *et al.*, 2006, 2008; Li *et al.*, 2007). Dok nekoliko radova opisuje uspješnu primjenu metode dirigovane evolucije za lakaze iz gljiva (Festa *et al.*, 2008; Zumarraga, 2008), nasumična mutageneza do sada nije korišćena za poboljšanje katalitičke efikasnosti bakterijske lakaze sem u slučaju Koschoreck *et al.*, (2009). Autori su prethodno opisali kloniranje i ekspresiju *cotA* (GenBank broj: YP\_077905) iz *Bacillus licheniformis* u *E. coli*. Ovako dobijena rekombinantna lakaza katalizuje dimerizaciju mono i supstituisanih mono i dimetoksi



derivata 3-(4-hidroksifenil)-2-propenske kiseline kao što su ferulinska ili sinapinska kiselina, čime je pokazano da enzim predstavlja dobrog kandidata za sintezu prirodnih proizvoda. Kako je nivo ekspresije bio nizak, autori su ispitali i nasumičnu i mjesto-dirigovanu mutagenezu za poboljšanje ekspresije u *E. coli*, prilikom čega su dobili tri mutanta sa većim stepenom ekspresije u odnosu na enzim dobiven iz sojeva izolovanih iz prirode (eng. wild type, wt). Kombinacijom najboljih mutanata dobijen je dupli mutant sa većom aktivnosti u dimerizaciji ferulinske kiseline i obezbojavanja u odnosu na wt i pojedinačne mutante.

#### 2.4.1.3 Supstrati lakaze

Tipični supstrati lakaze uključuju monofenole, npr. sinapinsku kiselinu ili gvajakol. Priroda supstituenta i njegova pozicija na fenolnom prstenu utiču na efikasnost oksidacije određenom lakazom. Elektrofilne funkcionalne grupe, posebno one u orto-položaju negativno utiču na afinitet enzima ka supstratu, dok suprotno važi za nukleofilne funkcionalne grupe (Majeau *et al.*, 2010). Sterne smetnje i visoki redoks potencijal negativno utiču na brzinu oksidacije lakazom. Lakaze takođe mogu da oksiduju poliamine, aminofenole, lignine, aril diamine, neke neorganske jone, neke policiklične aromatične ugljovodonike (PAH), organofosforne pesticide i azo boje, pri čemu to smanjuje ili potpuno ukida toksičnost tih jedinjenja (Majeau *et al.*, 2010).

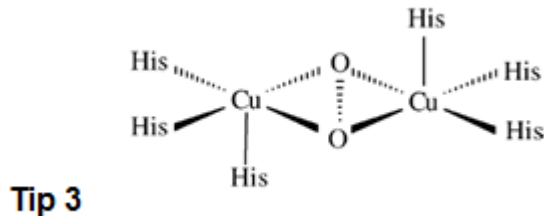
Iako su lakaze porijeklom iz gljiva zastupljenije u polju obezbojavanja i uklanjanja fenola u odnosu na bakterijske, ipak je njihova eksploatacija na industrijskom nivou ograničena. Jedan od razloga je problem u kloniranju i heterologoj ekspresiji, što je posledica prisustva introna i egzona u eukariotskoj ćeliji. S druge strane produkcija rekombinantnih bakterijskih enzima ima veći potencijal zbog mogućnosti dobijanja velike količine enzima u fermentorima na primjer metodom fermentacije sa visokom gustinom ćelija (eng. high cell density). Favorizaciji prokariotskih enzima doprinose i lake genetske manipulacije i odsustvo glikozilovanja, što kod eukariotskih enzima zna da izazove razne probleme.

## 2.4.2 Tirozinaza

Tirozinaza (E.C. 1.14.18.1, monofenol monoooksigenaza), često nazivana polifenoloksidaza (PPO) je široko rasprostranjena kroz sva filogenetska stabla počevši od bakterija do sisara, a sreću se i tirozinaze različitih karakteristika u različitim organima istog organizma, poput korijena i lišća viših biljaka. Dobro je poznato da tirozinaze katalizuju dvije različite uzastopne kiseonik-zavisne reakcije: *o*-hidroksilacija monofenola molekulskim kiseonikom pri čemu nastaju *o*-difenoli (tzv. krezolazna aktivnost), nakon čega slijedi oksidacija *o*-difenola do *o*-hinona (kateholazna aktivnost) koji zatim podleže ne-enzimskoj polimerizaciji.

### 2.4.2.1 Aktivno mjesto tirozinaze

Hemijske i spektroskopske studije tirozinaze su pokazale da aktivno mjesto sadrži spregnuti bakarni binuklearni kompleks. Tirozinaza posjeduje bakarni centar Tipa 3 kao što je prikazano na slici 6.

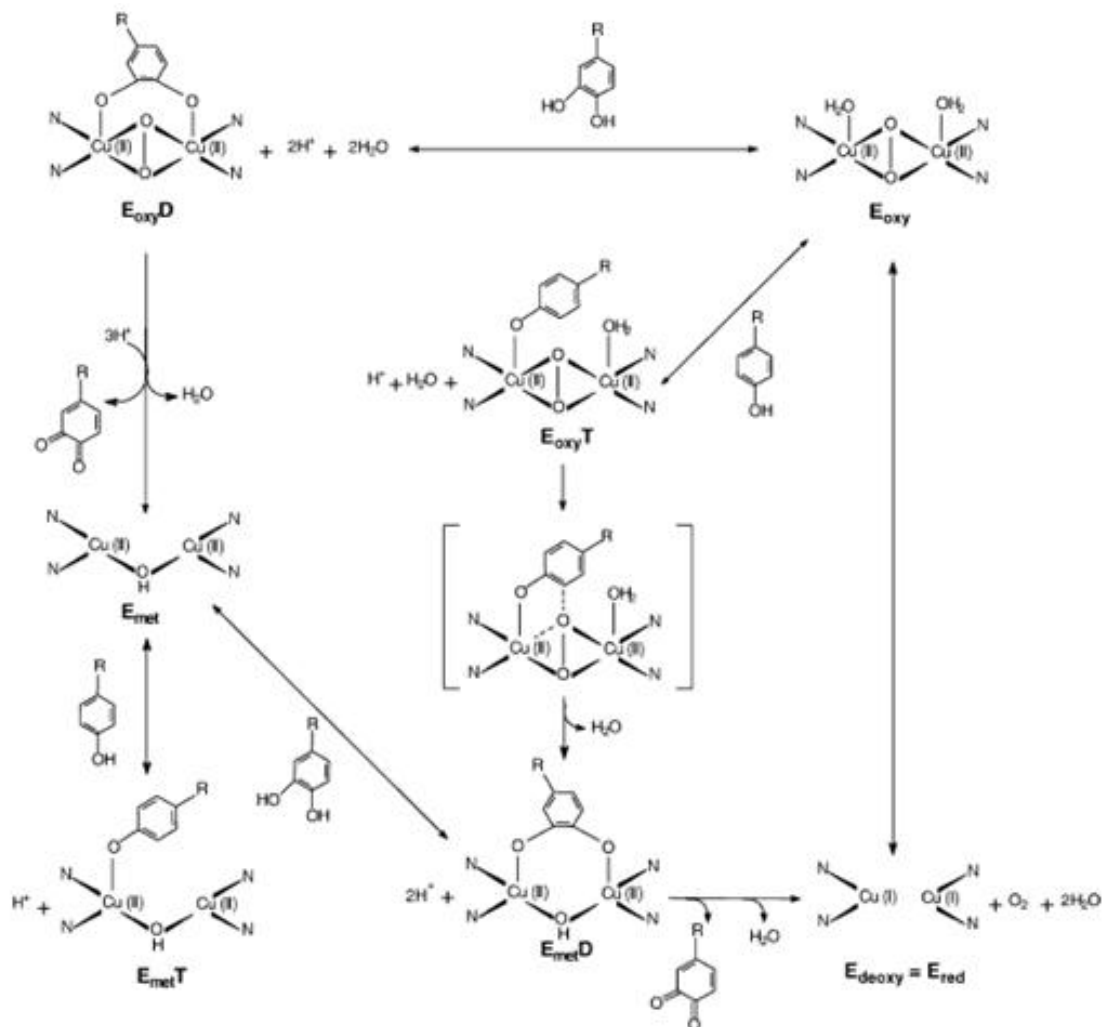


Slika 6. Prikaz bakarnih centara prisutnih kod tirozinaze.

### 2.4.2.2 Katalitički ciklus tirozinaze

Oksigenisana forma (oksitirozinaza, Eoxy) se sastoji od dva tetragonalna Cu(II) jona, od kojih je svaki koordinovan sa dva jaka ekvatorijalna i jednim slabim aksijalnim NH ligandom. Egzogeni molekul kiseonika je vezan kao peroksid i premošćuje dva Cu centra. Met-tirozinaza (Emet), kao i oksigenisana forma, sadrži dva tetragonalna Cu(II) jona antiferomagnetično kuplovanih preko endogenog mosta, iako su hidroksilni egzogeni ligandi vezani za bakarni centar umjesto peroksida. Dezoksi-tirozinaza (Edeoksi) ima bibakarnu strukturu [Cu(I)–Cu(I)]. Ova tri stanja bakra u aktivnom

mjestu tirozinaze sugerišu strukturni model za mehanizam reakcije koju obuhvata *o*-hidroksilaciju monofenola i oksidaciju rezultujućih difenola (slika 7) (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995). Mehanicistički aspekti strukture su opisani (Ducros *et al.*, 1998; Klabunde *et al.*, 1998).



Slika 7. Katalitički ciklus oksidacije monofenol i difenol supstrata do *o*-hinona tirozinazom u prisustvu kiseonika.

Peroksidaze iz rena i tikve, u rastvornom i imobilizovanom obliku su uspješno korišćene za uklanjanje fenola na laboratorijskoj skali (Cooper i Nicell, 1996). Kako su i ren i tikva dostupni u velikoj količini samo sezonski, to ih čini skupim izvorima za izolovanje enzima. Naprotiv, krompir je dostupan cijele godine, pa PPO iz krompira predstavlja enzim sa velikim potencijalom za biotehnologiju zbog svoje izuzetno niske cijene, jer se može izolovati iz otpada prehrambene industrije (Khan *et al.*, 2006; Vujčić

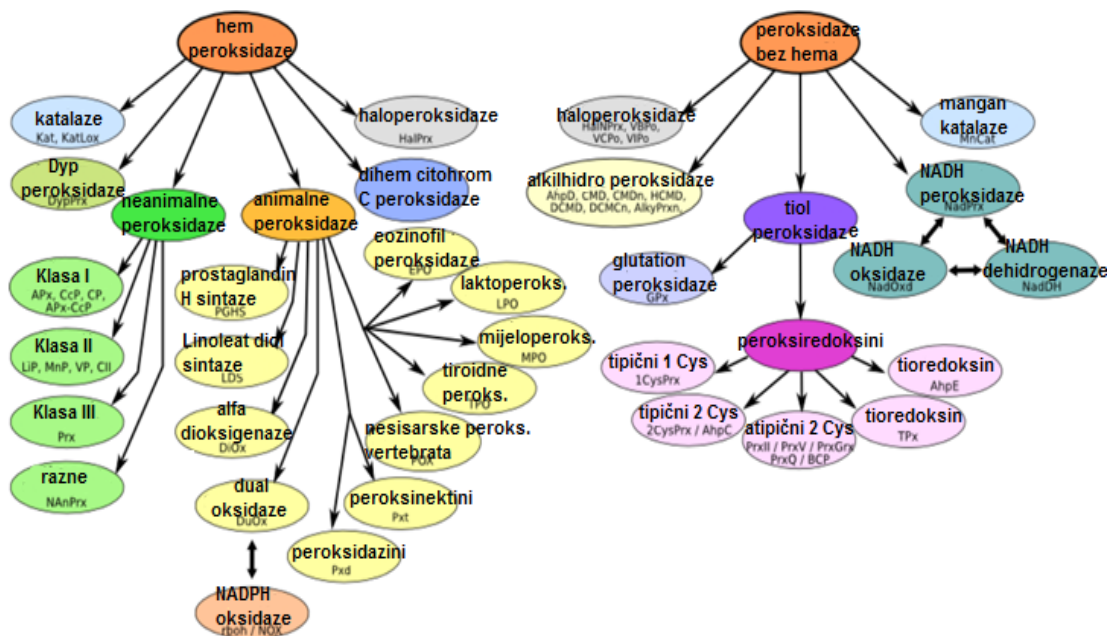
*et al.*, 2010). Pokazano je (Thygesen *et al.*, 1995) da je aktivnost PPO najveća na obodu krtole, uključujući koru i tkivo koje se nalazi neposredno ispod kore, 1 do 2 mm, što otvara mogućnosti za eksploataciju kora od krompira. Ovaj proces može da se dovede u direktnu vezu sa industrijom krompirovog čipsa, gdje višak proteina u otpadnoj vodi jeste jedan od velikih problema. Efikasnost enzimskog tretmana je nezavisna od čistoće enzima, pa sirovi ili djelimično prečišćeni enzim ima prednost u tretmanu otpadne vode, jer je zaštićeniji od inaktivacije zbog velike količine drugih proteina prisutnih u rastvoru (Cooper i Nicell, 1996). Upotreba djelimično prečišćenih enzima je u prednosti u poređenju sa sirovim ekstraktima zbog mnogo razloga, a glavni su uklanjanje neželjenih endogenih fenola iz biljnih izvora tokom procesa prečišćavanja i izbjegavanje viška proteina što bi izazvalo povećanje biohemijske potrebe za kiseonikom (BPK) u otpadnoj vodi. Kako svi industrijski procesi teže značajnom smanjenju cijene tretmana, to je bio motiv da se koristi djelimično prečišćena PPO iz krompira. PPO je prečišćena samo jednim hromatografskim korakom pod azotom, sa ciljem obogaćivanja fenoloksidazne aktivnosti i uklanjanja endogenih fenola.

## 2.5 Peroksidaze

Peroksidaza iz rena (EC 1.11.1.7) je, sem zbog velike primjene i istorijski važan enzim na kome se radi više od osamdeset godina (Elliott, 1932). Međutim, u oblasti enzimskog tretmana fenolnih voda, peroksidaza je enzim-pionir, jer je ova oblast otvorena korišćenjem HRP za uklanjanje fenola, anilina i aromatičnih amina iz otpadne prije više od 30 godina (Klibanov *et al.*, 1980, 1981, 1983). Ovaj enzim je i dalje aktuelan u oblasti uklanjanja kseonbiotika i kao model sistem za razvijanje novih načina imobilizacije enzima, ali i za ispitivanje moguće primjene u novim procesima.

Svi živi organizmi produkuju peroksidaze, a o njihovoj zastupljenosti govori i podatak da je poznato blizu 11000 sekvencija peroksidaza sakupljenih u jedinstvenoj internet bazi posvećenoj ovog grupi enzima (PeroxiBase, 2012). Ovi enzimi su uključeni u različite biosintetske procese, kao i u procese degradacije ili kao dio odbrane protiv patogena ili oksidativnog pritiska (Henriksen *et al.*, 1998). Klasifikacija peroksidaza je kompleksna, a počinje sa podjelom na peroksidaze koje sadrže ili ne sadrže hem prostetičnu grupu, koje obuhvataju mnoštvo podklasa (slika 8). Većina

poznatih peroksidaza pripada superfamiliji neanimalnih peroksidaza koja može da se podijeli u tri velike klase na osnovu strukturne divergencije. Neanimalne peroksidaze klase I se nalaze intraćelijski u biljkama, kvascima i bakterijama. Ovoj klasi pripadaju citosolna askorbat oksidaza i citohrom c peroksidaza. Neanimalne peroksidaze klase II i III se nalaze kod gljiva i biljaka i obične su locirane u vanćelijskom prostoru. Neanimalne peroksidaze klase II su najbolje predstavljene primjerima poput lignin degradirajuće mangan-peroksidaze iz gljive *Phanaerochaete chrysosporium*, dok neanimalne peroksidaze klase III obuhvataju široko proučavanu peroksidazu iz rena (Henriksen *et al.*, 1998).

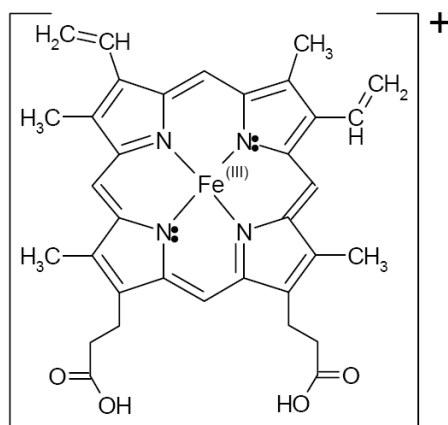


Slika 8. Klasifikacija peroksidaza (preuzeto i modifikovano sa internet stranice PeroxiBase).

Vanćelijske peroksidaze su locirane uglavnom u rastućim ćelijskim zidovima (Fry, 1986) i uključene su u procese lignifikacije koji doprinosi strukturnoj rigidnosti biljnih ćelijskih zidova. Odatle slijedi da su prirodni supstrati peroksidaza fenolni prekursori lignina, poznati kao monolignoli poput *p*-kumaril ili koniferil alkohola (Lewis *et al.*, 1999). Takođe, postoje dokazi da peroksidaze djeluju na fenolne molekule vezane za polimere ćelijskog zida gdje učestvuju u umrežavanju susjednih makromolekula (Fry, 1986).

### 2.5.1 Peroksidaza iz rena (HRP)

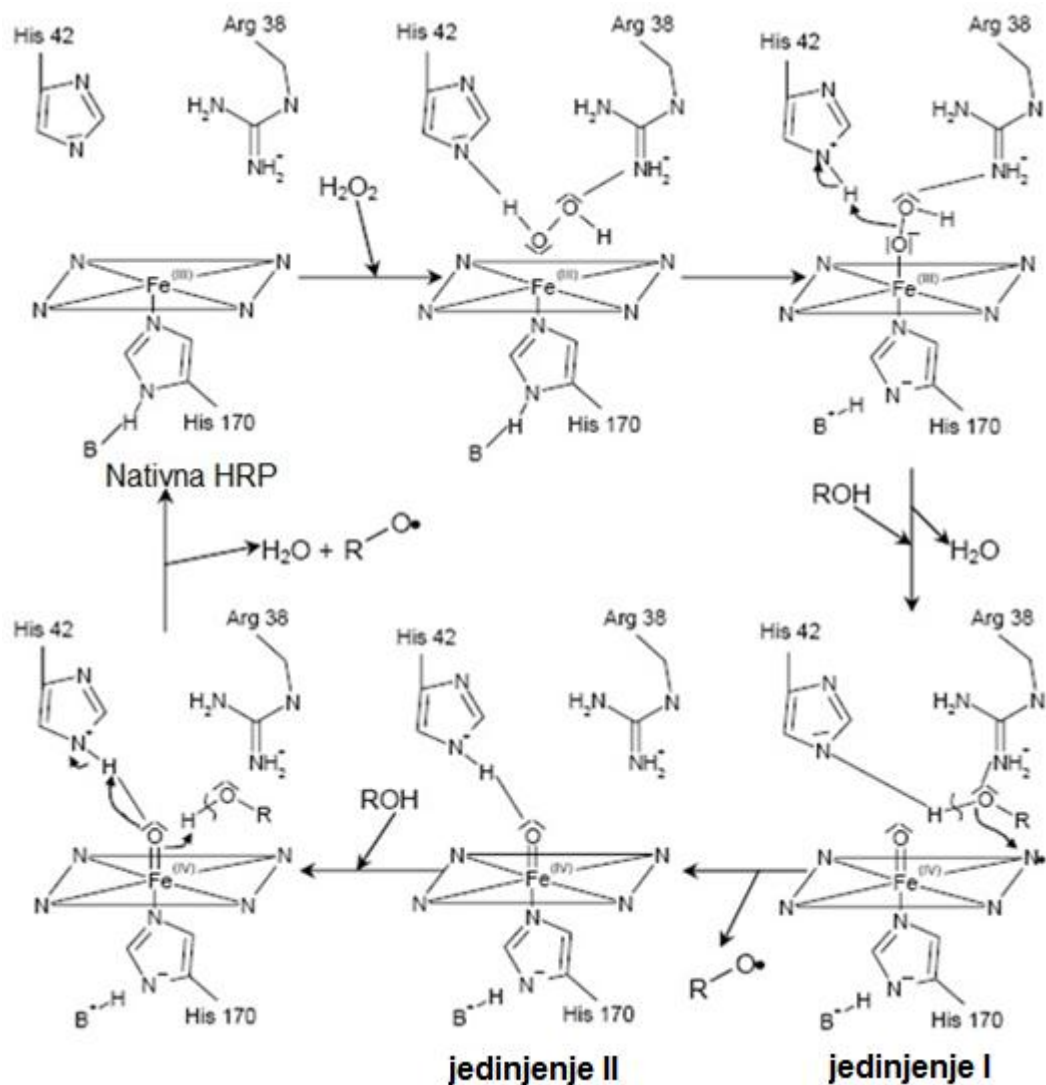
Shannon i saradnici (1966) su izolovali sedam izoformi peroksidaze iz korijena rena koje su se razlikovale u elektroforetskoj pokretljivosti, aminokiselinskom sastavu i sadržaju ugljenih hidrata. Ovi izoenzimi su podijeljeni u dvije grupe. Prva se sastoji od kiselih izoformi (HRP-A1, HRP -A2, HRP -A3), dok druga obuhvata baznije izoforme, od kojih je izoforma C (HRP-C) najzastupljenija. Kasnije studije su otkrile karakteristične razlike među ove dvije grupe izoformi u pogledu katalitičke aktivnosti prema različitim supstratima (Hiner *et al.*, 1996; Kay *et al.*, 1967; Marklund *et al.*, 1974). Komercijalni preparati sadrže uglavnom izoformu C (Dunford, 1991). HRP-C je slabo bazni glikoprotein koji ima 332, 351 ili 353 amino-kiselinskih ostataka, zavisno o kojoj njegovoj izoformi govorimo (Fujiyama *et al.*, 1988). Aktivno mjesto enzima sadrži prostetičnu grupu hem sa feri jonom (Dunford, 1991). Osam oligosaharidnih bočnih nizova su vezani za protein preko ostataka asparagina. Smatra se da saharidna komponenta doprinosi stabilnosti enzima na povišenim temperaturama (Dunford i Stillman, 1976). Dva jona kalcijuma su jako vezana za svaki molekul HRP. Ovi joni su neophodni za održavanje strukturnog okruženja hema (Ogawa *et al.*, 1979). Ukupna molekulska masa HRP-C je oko 42 kDa (Dunford, 1991). Kristalnom strukturom HRP-C (Gajhede *et al.*, 1997) je pokazano da se molekul sastoji od 10 heliksa (A-J). Dva domena su jasno definisana: N-terminalni domen I (sastoji se od heliksa A–D) i C-terminalni domen II (heliksi F–J). Heliks E vezuje dva domena. Vezivanje hema dešava se u “džepu” koji čine oba domena (heliks B i C-terminus heliksa F). Hem prostetična grupa nativnog enzima, označena i kao feriprotoporfirin IX, sadrži  $Fe^{3+}$  jon u svom centru koji je koordinovan sa četiri atoma azota iz pirolskih prstenova (planarna struktura porfirinskog prstena) (slika 9). Peto koordinaciono mjesto je okupirano imidazolovim prstenom iz bočnog ostatka histidina iz heliksa F. Šesto koordinativno mjesto je prazno. Formalno naelektrisanje feriprotoporfirina IX je +1, jer dva od četiri pirolska azota nose negativno naelektrisanje (Dunford, 1991). Porfirinski prsten je aromatične prirode i stoga je odličan provodnik elektrona (Dunford i Stillman, 1976).



Slika 9. Feriprotoporfirin IX - hem prostetična grupa HRP (Dunford i Stillman, 1976).

### 2.5.1.1 Katalitička aktivnost

Mehanizam primarnog katalitičkog ciklusa HRP je prikazan na slici 10. Prvi korak je oksidacija nativnog enzima (feriperoksidaza) vodonik-peroksidom. Početno vezivanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se dešava na praznom šestom koordinativnom mjestu. Nakon transfera protona distalnom histidinu (His 42) formira se gvožđe-peroksid veza, što je praćeno heterolitičkim raskidanjem O-O veze oslobađajući vodu kao dobru odlazeću grupu. Ovu reakciju pomaže stabilizacija negativnog naelektrisanja na His 170 i pozitivnog na ostacima His 42 i Arg 38 (Dunford 1991). Nakon ovih procesa, feri jon [Fe(III)]<sup>3+</sup> se oksiduje do feril grupe [Fe(IV)=O]<sup>2+</sup>, a porfirinski system (Porph)<sup>2-</sup> prelazi u  $\pi$ -radikalni intermedijer (Porph<sup>•-</sup>). Rezultujuća enzimaska forma sadrži  $\pi$ -katjonski radikal (Porph<sup>•</sup>[Fe(IV)=O])<sup>+</sup> u aktivnom mjestu i naziva se **jedinjenje I** (HRP<sub>I</sub>) (Dunford, 1991). Sledeći korak je redukcija jedinjenja I u jednelektronskom koraku redukujućim supstratom, obično fenolnim molekulom (ROH) (Dunford, 1991). Elektronski transfer se dešava od molekula supstrata ka porfirinskom prstenu tako da  $\pi$ -katjonski radikal nestaje. Proton se prenosi simultano sa fenolne hidroksilne grupe na imidazolski bočni niz ostatka His 42, što je pomognuto vodoničnom vezom između Arg 38 i fenolnog kiseonika (Henriksen *et al.*, 1999). Dobijeni fenolni radikal disosuje od enzima ostavljajući peroksidazu u formi (Porph[Fe(IV)=O]), koja se naziva **jedinjenje II** (HRP<sub>II</sub>). U finalnom koraku katalitičkog ciklusa, drugi fenolni molekul redukuje jedinjenje II u jednelektronskom koraku, vraćajući enzim u nativno stanje (HRP<sub>N</sub>).



Slika 10. Primarni katalitički ciklus peroksidaze iz rena.

U jedinjenju II, protonovana distalna grupa, najvjerojatnije His 42, je vodonično vezana za feril kiseonikov atom, što je od izuzetne važnosti za katalitičku aktivnost ovog peroksidaznog intermedijera (Dunford, 1991). Prenos protona i elektrona od fenolnog supstrata na feril grupu se dešava simultano, redukujući gvožđe (IV) do gvožđa (III) i dajući vodu kao odlazeću grupu, sa kiseonikom porijeklom iz  $[\text{Fe(IV)=O}]^{2+}$  (Dunford, 1991). Dva protona u odlazećem molekulu vode su dobijeni od protonovane distalne grupe i redukujućeg susprata. Rezultat je formiranje drugog fenolnog radikala i povratak peroksidaze u feri stanje ( $\text{Porph[Fe(III)]}^+$ ) (Dunford, 1991).



### *Supstrati peroksidaze iz rena*

Organski supstrati koji redukuju **jedinjenje I** i **jedinjenje II** su uglavnom aromatični molekuli, koji nose bar jednu hidroksilnu ili amino grupu. Različiti fenoli, naftoli, anilini i benzidini pripadaju ovoj grupi jedinjenja (Josephz *et al.*, 1982; Klibanov *et al.*, 1980; Klibanov i Morris, 1981).

HRP takođe može da oksiduje brojna neorganska jedinjenja uključujući ferocijanide, jodide, nitrite i vodonik-sulfit (Dunford i Stillman, 1976). Jodid i vodonik-sulfit su zanimljivi izuzeci među redukujućim supstratima, jer redukuju **jedinjenje I** direktno do nativnog enzima u dvoelektronskom koraku.

#### *2.5.1.3 Stabilnost peroksidaze iz rena*

HRP je inaktivirana kada se inkubira u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na dva moguća načina, zavisno od koncentracije vodonik peroksida. Pri nižim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ispod 1,0 mM u odsustvu fenola) inaktivacija je reverzibilna, a rezultat je formiranja i nagomilavanja katalitički inertnog intermedijernog **jedinjenja III** (Baynton *et al.*, 1994). Pri višim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dolazi do ireverzibilne inaktivacije formiranjem verdohemoproteina (P<sub>670</sub>) (Arnao *et al.*, 1990; Baynton *et al.*, 1994), dok se inkubiranjem u prisustvu fenolnog supstrata ne gubi aktivnost (Nicell *et al.*, 1993). HRP posjeduje neobično visoku stabilnost u vodenim rastvorima. Koncentrovani rastvori mogu da se drže u destilovanoj vodi na 4°C barem mjesec dana bez značajnog gubitka aktivnosti (Nicell *et al.*, 1993). Ipak, kao i većina enzima, HRP se inaktivira tokom dužeg inkubiranja na povišenoj temperaturi.

Enzimi su stabilni unutar ograničenog opsega pH vrijednosti. Van ovog opsega, promjene u naelektrisanju jonizabilnih aminokiselinskih ostataka rezultuju modifikacijama tercijarne strukture enzima i vode ka denaturaciji. HRP zadržava više od 90% aktivnosti nakon 48h inkubiranja na pH 6–9, ali je značajno inaktivirana van ovog opsega (Nicell *et al.*, 1993). Inaktivacija HRP na kiselim pH vrijednostima može bar djelimično da se pripiše razbijanju proteinske strukture i oslobađanju hema što je potvrđeno od strane Chattopadhyay i Mazumdar (2000), a ovaj princip se inače koristi i za izolovanje hema iz hemoproteina. Stabilnost HRP se smanjuje sa opadanjem

koncentracije enzima, povećanjem koncentracije pufera i prisustvom EDTA. Stepen inaktivacije zavisi takođe i od vrste korišćenog pufera. HRP je najstabilnija u citratnim puferima, a najmanje stabilna u fosfatnim puferima. Uticaj EDTA može se objasniti činjenicom da se slobodni joni  $\text{Ca}^{2+}$  izmjenjuju sa jonima  $\text{Ca}^{2+}$  vezanim za HRP-C (Haschke i Friedhoff, 1978) tako da se nakon inkubiranja sa EDTA, vezani  $\text{Ca}^{2+}$  joni polako uklanjaju sa enzima, što vodi olakšanom otpuštanju hema.

Većina istraživanja koja se bave primjenom HRP za uklanjanje ksenobiotika bazirano je na korišćenju komercijalnog preparata HRP (izoforna HRP-C), pa o stabilnosti drugih izoformi HRP nema podataka u literaturi.

### 2.5.2 Hloroperoksidaza (CPO)

Hloroperoksidaza (EC 1.11.1.10) iz filamentozne gljive *Caldariomyces fumago* ima masu od 42 kDa, 321 aminokiselinski ostatak i pI u opsegu 3,2-4,0. To je glikoprotein čiji je sadržaj ugljenih hidrata 25-30%, a glavne gradivne jedinice su glukozamin i arabinoza. CPO je enzim sa najviše raznovrsnih funkcija u porodici hem-peroksidaza. Ovaj enzim može da katalizuje formiranje veze halogen-ugljenik u prisustvu odgovarajućeg akceptorskog supstrata i peroksida koristeći hloridni, bromidni ili jodidni, ali ne i fluoridni jon (Hager *et al.*, 1966). Sem ove funkcije peroksid-zavisnog hlorinovanja, CPO takođe katalizuje tipične reakcije za hem-peroksidaze, katalaze i citohrom P450 monooksigenaze (uvođenje kiseonika).

Reakcije halogenovanja CPO katalizuje u kiseljoj sredini (pH<3), dok nehalogenujuće reakcije katalizuje u neutralnoj sredini (pH=5-6). Katalazna aktivnost CPO se odigrava u odsustvu halogenih jona i organskog supstrata i rezultuje disproporcionisanjem vodonik peroksida na molekularni kiseonik i vodu (Sun *et al.*, 1994). Razlog zbog kog CPO ispoljava toliko različitih funkcija leži u strukturi njenog aktivnog mjesta. CPO ima cistein (Cys29) poput citohroma P450, dok ostale peroksidaze imaju histidin kao peti aksijalni ligand, ali okruženje se značajno razlikuje (Blanke i Hager, 1988; Torres i Ayala, 2010). Distalni džep za hem u CPO, koji je odgovoran za vezivanje peroksida sadrži polarne amino kiseline, što je tipično za peroksidaze (nasuprot citohromu P450). Ipak, distalni aminokiselinski ostatak koji djeluje kao kiselo-bazni katalizator nije histidin, kao kod ostalih hem-peroksidaza, već

glutaminska kiselina (Glu183) (Yi *et al.*, 1999). Iako je CPO enzim sa obećavajućim karakteristikama, njegova praktična upotreba je ograničena malom operacionom stabilnošću u prisustvu peroksida. Inaktivacija CPO peroksidom je uzrokovana uništavanjem hema (Ayala *et al.*, 2011). Tačan molekularni mehanizam inaktivacije CPO nije razjašnjen.

Potencijal CPO za primjenu u tretmanu fenolne otpadne vode je pokazan na model sistemu *p*-CP (La Rota i Bon, 2002) i pentahlorofenola (Longoria *et al.*, 2008). U literaturi se slabo mogu naći podaci o primjeni CPO u obezbojavanju, mada su skoriji radovi potvrda o aktuelnosti istraživanja koja se bave ovim enzimom (Zhang *et al.*, 2012).

## 2.6 Redoks potencijal oksidativnih enzima i upotreba medijatora

Redoks potencijal je katalitički relevantna osobina oksidaza koja, bar po teoriji, određuje granice oksidativne moći enzima. Standardni redoks potencijal za aktivnost lakaza je obično između 0,5-0,8 V, što nije dovoljno za oksidaciju nekoliko vrsta ksenobiotika (Majeau *et al.*, 2010). Ovo predstavlja značajno ograničenje za primjenu lakaza za detoksifikaciju i industrijske svrhe.

Otkriće medijatora omogućilo je proširivanje reaktivnosti lakaza ka neuobičajenim supstratima. Medijatori predstavljaju lako oksidujuće supstrate koji djeluju kao redoks intermedijeri između aktivnog mjesta enzima i ne-fenolnog supstrata. Benzil alkoholi, molekuli sa visokim redoks potencijalom i sterno zaštićeni molekuli su dobri kandidati za lakazni medijatorski sistem (LMS). Najčešće korišćeni medijatori su 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) i 1-hidroksi benzotriazol (HBT) (Majeau *et al.*, 2010). Velika prepreka u upotrebi medijatora je njihova visoka toksičnost i cijena (Majeau *et al.*, 2010). HBT inaktivira lakazu tokom vremena, a pokazuje veliku toksičnost i pri malim koncentracijama (Majeau *et al.*, 2010), pa je malo vjerovatno da je primjenjiv u budućim procesima.

## 2.7 Imobilizacija enzima

Nedostatak većine potencijalno primjenjivih industrijski važnih enzima je njihova nestabilnost i mala produkcija (Godfrey, 1996). Najčešće korišćen način stabilizacije enzima je imobilizacija, koja takođe pruža pogodnosti višestruke upotrebe iste količine enzima, olakšano odvajanje proizvoda i olakšanu kontrolu procesa (Cao *et al.*, 2003; Hartmeier 1988; Mateo *et al.*, 2007). Pored toga, poznato je da se imobilizacijom mijenjaju osobine enzima poput: pH i temperaturnog optimuma, kinetičkih parametara i fluidnost (fleksibilnost) proteinske strukture (Cao *et al.*, 2003; Hartmeier 1988; Mateo *et al.*, 2007). Povećana termostabilnost enzima omogućava izvođenje procesa na višim temperaturama i tako se smanjuje reakciono vrijeme. Prednosti i nedostaci imobilizacije enzima su sažeti u tabeli 2 (van de Velde *et al.*, 2002; Bornscheuer, 2003). Prva imobilizaciju enzima uradili su Nelson i Griffin 1916. godine. Oni su adsorbovali invertazu na aktivnom uglju i aluminijum oksidu sa očuvanjem katalitičke aktivnosti. Ipak, razvoj tehnologije imobilizacije enzima se odigrao davno, polovinom prošlog vijeka. Tako je 1969. godine u Japanu razvijen proces proizvodnje L-aminokiselina korišćenjem imobilizovanih enzima, što je praćeno razvojem procesa izomerizacije glukoze u fruktozu glukozo-izomerazom 1972. godine u SAD. Od tada se razvijaju novi procesi, nosači i metode imobilizacije.

Tabela 2. Prednosti i nedostaci imobilizacije enzima (van de Velde *et al.*, 2002; Bornscheuer, 2003).

<b>Prednosti</b>
Lakše odvajanje i rekuperacija enzima i proizvoda
Višestruka upotreba
Povećanje termostabilnosti i otpornosti ka denaturišućim reagensima
Lakše zaustavljanje reakcije
Olakšana upotreba u kontinualnim procesima
Veća fleksibilnost u dizajnu bioreaktora
Smanjenje kontaminacije proteinima u finalnom proizvodu
Lakša kontrola mikrobioloških kontaminacija
<b>Nedostaci</b>
Manja enzimaska aktivnost uzrokovana procesom imobilizacije
Povećanje Mihaelis-Mentenine konstante

Za imobilizaciju enzima na čvrstim materijalima i gelovima koriste se različite metode koje se zasnivaju na fizičkim i hemijskim mehanizmima (Duran *et al.*, 2002). Hemijske metode uključuju kovalentno vezivanje enzima i nosača, umrežavanje enzima i nosača, kao i umrežavanje multifunkcionalnim reagensima. Fizičke metode uključuju adsorpciju, zarobljavanje enzima u nerastvornim polimernim gelovima (hidrogelovima) ili u micelama (enkapsulacija) (Duran *et al.*, 2002; Hartmeier, 1988). Sa ciljem da se poveća potencijal industrijske upotrebe, fenoloksidaze i lakaze su imobilizovane na raznovrsnim nosačima (Duran *et al.*, 2002 i citirane reference). Tehnike koje su do sada korišćene su adsorpcija na poroznom staklu (Rogalski *et al.*, 1995), zarobljavanje u alginatnim kuglicama (Palmieri *et al.*, 1994) i želatinu (Grecchio *et al.*, 1995), ili kovalentno vezivanje na inertnim i polimernim materijalima (Hublik i Schinner, 2000).

Imobilizacija enzima je izuzetna tehnika koja omogućava prevazilaženje problema koji se postavljaju pred rastvorne enzime, jer se imobilizacijom omogućava duže skladištenje i bolja kontrola katalitičkog procesa (Wada *et al.*, 1993). Za tretman velikih zapremina otpadne vode poželjno je korišćenje reaktora sa imobilizovanim enzimima zbog velike cijene enzima. Imobilizacija enzima, pored željene višestruke upotrebe enzima omogućava neprevaziđenu mogućnost direktnog odvajanja proizvoda i kontinualnu upotrebu (Tatsumi *et al.*, 1996).

### 3. Naši radovi

Da bi se enzimski tretmani implementirali veoma je važno uzeti u obzir cijenu enzima. Oksidativni enzimi su i dalje skupi zbog visoke cijene produkcije, izolovanja i prečišćavanja. Problemi koji moraju da se razmotre/riješe su identifikacija nusproizvoda reakcije i smanjenje cijene tretmana. Imobilizacija igra značajnu ulogu u smanjenju cijene biokatalizatora.

Metode koje se trenutno koriste za uklanjanje ksenobiotika iz efluenata imaju nekoliko mana poput visoke cijene procesa, formiranje mulja, mala efikasnost, a nisu primjenjive za širi spektar zagađivača. Bioremedijacija oksidativnim enzimima predstavlja obećavajuću alternativu. Među njima, enzimi koji koriste molekularni kiseonik kao akceptor elektrona su najzanimljiviji. Tako su lakaza i PPO naročito interesantni za primjenu u uklanjanju boja. Primjena lakaza za industrijske procese zahtjeva produkciju velike količine enzima po niskoj cijeni. S toga je naš cilj bio potraga za efikasnim produkcionim sistemom enzima ili jeftini izvor za izolovanje PPO kao što je krompir, odnosno kora krompira. Drugi način dobijanja jeftinog enzima je produkcija rekombinantnih enzima. Da bi pronašli enzim sa željenim karakteristikama testirano je oko 100 sojeva *Bacillus sp.* izolovanih iz prirode. Za potrebe referentnog enzima proizvedena je lakaza iz gljive *Trametes versicolor*. Ispitana je upotreba peroksidaze iz rena, sa novog aspekta, poređenjem efikasnosti u uklanjanju boja kiselih i baznih izoformi ovog enzima. Uklanjanje ksenobiotika je ispitano i korišćenjem enzima sa neobičnim katalitičkim osobinama, rekombinantne hloroperoksidaze iz gljive *Caldariomyces fumago*, proizvedenoj u gljivici *Aspergillus niger*.

#### 3.1. Uklanjanje fenola fenoloksidazom iz krompira (*Solanum tuberosum*)

U ovom radu je ispitivano mnoštvo nosača za imobilizaciju PPO, dijelom komercijalno dostupnih, a dijelom sintetisanih. Pored toga, sintetisan je potpuno novi nosač za imobilizaciju PPO na bazi potrošenog jonoizmjenjivačkog matriksa i okarakterisan je kako sam matriks, tako i biokatalizator dobijen imobilizacijom PPO na

njemu. Rastvorna PPO je takođe testirana za upotrebu u uklanjanju tekstilnih boja iz sintetičkih i realnih efluenta.

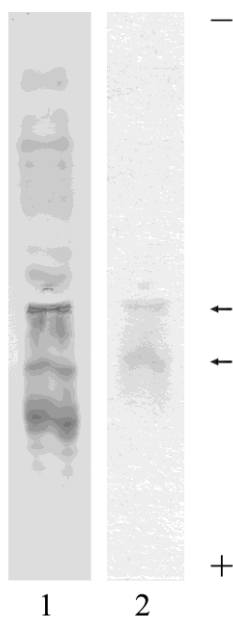
### 3.1.1 Prečišćavanje PPO

Jedan od problema koji se javlja prilikom izolovanja PPO iz biljnog materijala je prisustvo endogenih fenolnih jedinjenja koja PPO oksiduje do hinona, koji formiraju kovalentne veze sa enzimom, što rezultuje agregacijom enzima. Dva su načina za sprečavanje tamnjenja ekstrakta, a oba se zasnivaju na uklanjanju jednog od dva supstrata koja PPO koristi u katalitičkoj reakciji. Jedan način je uklanjanje fenolnih jedinjenja, a drugi rad u atmosferi bez kiseonika. Strategija korišćena u ovom radu snižava na minimum neželjene efekte rasoljavanjem sirovog ekstrakta odmah nakon izbistrivanja centrifugiranjem. Endogeni fenoli moraju da budu uklonjeni u toku prečišćavanja, jer fenoksi radikali koji nastaju prilikom njihove oksidacije napadaju aktivno mjesto enzima i tako ga inaktiviraju (Kwon i Kim, 1996). Uklanjanje fenola (rasoljavanje) je urađeno na Sephadex-G25 krupne (eng. coarse) granulacije što omogućava brzo hromatografsko razdvajanje proteina od malih molekula. Jonoizmjenjivačka hromatografija je urađena u atmosferi bez kiseonika da bi se spriječila oksidacija male količine fenola zaostalih i nakon rasoljavanja. QAE Sephadex je dobro poznati hromatografski matriks za industrijske namjene. Njegova široka upotreba je posledica velikog kapaciteta za vezivanje proteina i mala cijena što omogućava jednokratnu upotrebu i sprečavanje kontaminacija. Koraci u prečišćavanju su dizajnirani tako da se iskoristi maksimalan prinos koji se dobija metodom zarobljavanja (eng. capturing) hromatografije, sa ciljem optimizacije što kraćeg procesa. Da bi proces mogao lako da bude prilagođen za industrijsku skalu korišćeni su jeftini fosfatni pufer i šaržna (bač) hromatografija. Ova procedura daje prinos od 69% fenoloksidazne aktivnosti u poređenju sa početnim ekstraktom. Prečišćavanje enzima praćeno je određivanjem aktivnosti sa supstratom L-DOPA (Poglavlje 4.1.2.1). Djelimično prečišćena PPO pokazuje aktivnost od 8600 U/mL pod opisanim uslovima eseja. Rezultati prečišćavanja prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Djelimično prečišćavanje PPO iz krompira.

	<b>Sirovi ekstrakt</b>	<b>Rasoljeni s.ekstrakt</b>	<b>Frakcije eluirane sa QAE-Sephadex</b>
<b>A<sub>475</sub></b>	1,000	1,060	0,860
<b>V (mL)</b>	600	650	480
<b>Aktivnost (U/ml)</b>	10 000	10 600	8 600
<b>Ukupna aktivnost (U)</b>	6 000 000	6 890 000	4 128 000
<b>Prinos (%)</b>	100	114,8	68,8

Proteini u sirovom ekstraktu su razdvojeni izoelektričnim fokusiranjem na 7,5% poliakrilamidnom gelu. Bojenje proteinskih traka CBB-om i zimogramska detekcija PPO u sirovom ekstraktu pokazuju prisustvo dvije izoforme PPO čije je pI 6,5 i 5,9 (slika 11).



Slika 11. Izoelektrično fokusiranje sirovog ekstrakta krompira. Traka 1: CBB bojenje. Traka 2: Zimogramska detekcija PPO. Strelice pokazuju mjesto traka koje se odnose na PPO aktivnost. (-) pI 10, (+) pI 3.



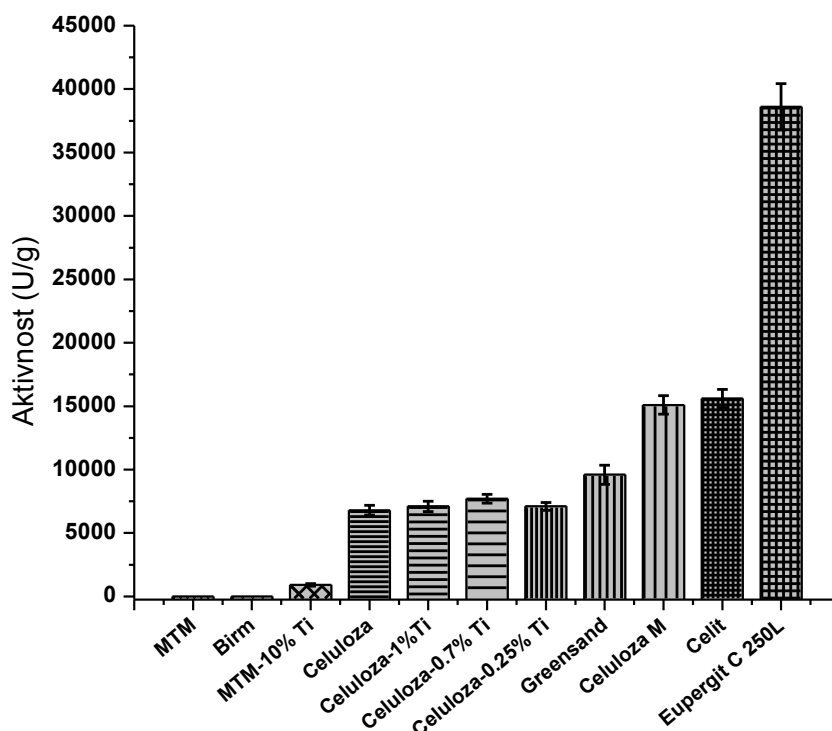
### 3.1.2 Imobilizacija PPO

Glavni cilj ovog rada je bio dobijanje jeftinog imobilizovanog enzima za uklanjanje fenola. Krompir predstavlja poželjan izvor za izolovanje polifenoloksidaze (PPO, EC 1.14.18.1), jer je moguće ovaj enzim izolovati iz otpada prehrambene industrije, npr. kore od krompira u industriji krompirovog čipsa. Djelimično prečišćena polifenoloksidaza (PPO) iz krompira je imobilizovana na različitim komercijalnim i laboratorijski sintetizovanim nosačima inkubiranjem preparata PPO sa odgovarajućim nosačem. Ispitana je moguća upotreba tri komercijalno dostupna adsorbensa koji se koriste u tretmanu voda za uklanjanje neorganskih komponenti (Birm<sup>®</sup>, GreenSand<sup>®</sup>, MTM<sup>®</sup>), dijatomejska zemlja tj. celit, kao i nekoliko varijanti mikrokristalne celuloze impregnirane sa Ti-oksikom, koje su sintetisane u laboratoriji. Ovi materijali su odabrani zbog dostupnosti u velikim količinama i niskoj cijeni (Birm<sup>®</sup>, GreenSand<sup>®</sup>, MTM<sup>®</sup>, Celite<sup>®</sup>) i zbog pretpostavljenog potencijala za vezivanje proteina (modifikovane celuloze) po analogiji sa imobilizovanom metal-afinitetnom hromatografijom (Lončar *et al.*, 2011).

Birm<sup>®</sup> je engleska skraćenica za metodu uklanjanja gvožđa po Burgesu („Burgess Iron Removal Method“) (Premier Water, 2011). Koristi se u opštinskim postrojenjima za tretman vode. Birm može da oksiduje jone gvožđa, ali nije mnogo efikasan u oksidovanju arsena (III). Birm se proizvodi impregnacijom aluminijum-silikatnog pijeska manganovim solima do zasićenja. Joni mangana se zatim oksiduju do čvrste forme mangan-oksida kalijum-permanganatom. Po sličnom postupku se proizvodi i manganov zeleni pijesak (Greensand<sup>®</sup>) (CEI Filtration, 2006). To je ljubičasto-crni granularni adsorbens koji se dobija obradom glaukonita (gvožđe-kalijum-filosilikat,  $(K,Na)(Al,Mg,Fe)_2(Si,Al)_4O_{10}(OH)_2$ ), a koristi se za uklanjanje jona gvožđa, mangana, kao i vodonik-sulfida. MTM<sup>®</sup> je granularni mangan-dioksid koji se koristi za iste svrhe kao Greensand (Safe Water Technologies, Inc, 2012). Dijatomejska zemlja (celit) je prirodni silikatni materijal, koji se lako melje u fini bijeli pijesak. Sastoji se od fosilnih ostataka dijatomejskih algi. Koristi se kao pomoćno sredstvo pri filtraciji, kao abraziv, adsorbens, porozni nosač za hemijske katalizatore, stabilizator za dinamit itd. CelulozaM predstavlja celuloza-TiO<sub>2</sub> modifikovanu sa organosilikonom. Dobija se reakcijom celuloze sa titanijum-hloridom, nakon čega slijedi reakcija sa

4-aza-6-aminoheksil trietoksisilanom. Originalno je napravljena za adsorpciju jona Hg(II), Cu(II), Pb(II), Fe(III) i Cr(III) (Meng *et al.*, 2002).

Uprkos inherentnom svojstvu da oksiduju L-DOPA, što se ogleda u trenutnoj promjeni boje reakcione smješe nakon miješanja nosača sa supstratom, MTM, MTM obogaćen sa 10%Ti, Birm i Greensand su korišćeni za imobilizaciju, jer je bilo moguće izmjeriti aktivnost koja je rezultat djelovanja PPO u odnosu na slijepu probu. Celulozna zrna granulacije (90 µm) obogaćena sa različitom količinom Ti (0,25, 0,7 i 1,0 %, w/w), kao i Celuloza M, takođe modifikovana titanijumom (Meng *et al.*, 2002) su korišćeni u ovim eksperimentima. Pored njih, komercijalno dostupni nosači, Eupergit C 250L, Celit, kao i nemodifikovana mikrokristalna celuloza su testirani za vezivanje PPO (slika 12).

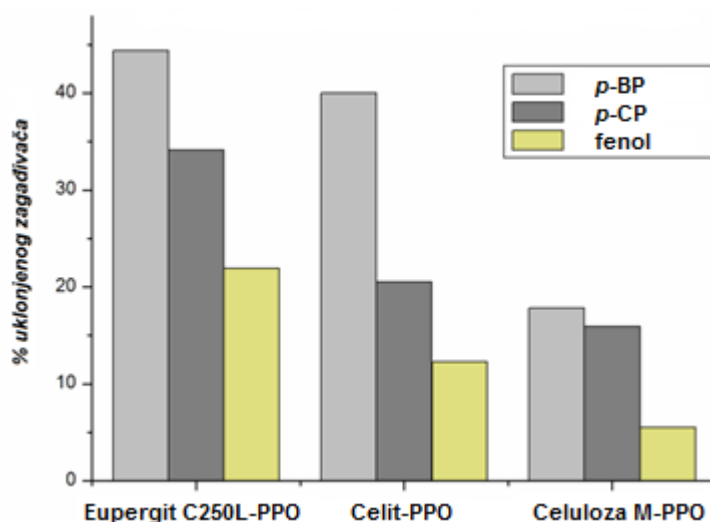


Slika 12. Poređenje aktivnosti dobijenih biokatalizatora prema 2.3 mM L-DOPA. Prikazane vrijednosti predstavljaju specifičnu aktivnost dobijenih biokatalizatora (U/g suvog nosača).

Pokazano je da MTM<sup>®</sup>, MTM 10%Ti, Birm<sup>®</sup> i Greensand<sup>®</sup> nisu pogodni nosači za imobilizaciju PPO, jer vezuju malu količinu PPO. Što se tiče celuloznih nosača, samo imobilizat Celuloza M-PPO je pokazala dovoljno visoku aktivnost, dok su ostali celulozni nosači bili međusobno slični i pokazivali malu PPO aktivnost prema

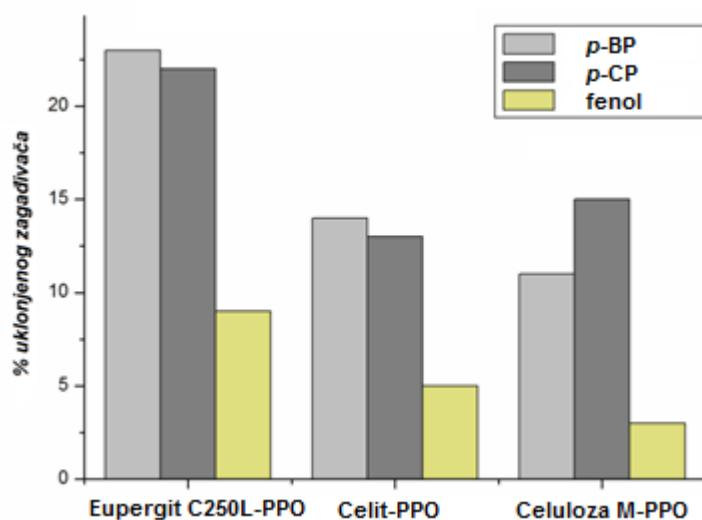
L-DOPA. Značajna aktivnost je detektovana sa dobijenim biokatalizatorima Celit-PPO, Celuloza M-PPO i Eupergit C250L-PPO (slika 12). Eupergit C250L-PPO je pokazao najveću specifičnu aktivnost.

Imobilizati sa najvećim aktivnostima PPO, Eupergit C250L-PPO, Celit-PPO i CelulozaM-PPO, su testirani u reaktoru za uklanjanje fenola, *p*-hlorfenola i *p*-bromfenola. Kao model sistem izabrani su fenol, *p*-bromfenol (*p*-BP) i *p*-hlorfenol (*p*-CP), jer su u širokoj upotrebi kao dezinfekciona sredstva u kućnim uslovima, bolnicama, farmama itd. (Merck Index 2006), a korišćeni su i ranije kao model sistemi (Ashraf i Husain, 2010; Levy *et al.*, 2003; Lončar *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 1997). Uklanjanje odabranih fenola ispitano je na model sistemu sintetičke otpadne vode: 50 mM fosfatni pufer pH 6,8 sa dodatkom fenola u finalnim koncentracijama od 2,5 mM i 10 mM i na 25°C. U zapreminu od 3 mL sintetičke otpadne vode dodato je po 100 mg polusuvog imobilizata i inkubirano 5 časova uz miješanje na rotacionoj mućkalici da bi se obezbijedio kontinualan dotok kiseonika. Nakon 5 časova određena je koncentracija zaostalih fenola kolorimetrijskim testom sa 4-aminoantipirinom (4-AAP) (Poglavlje 4.1.2.3). Eksperimentalni podaci pokazuju da najbolje rezultate daje biokatalizator Eupergit C250L-PPO. Poređenjem imobilizata dobija se stepeničasti histogram u slučaju 2,5 mM supstrata (slika 13), a sličan profil efikasnosti sa manjim vrijednostima se dobiju i u slučaju 10 mM supstrata (slika 14).



Slika 13. Uklanjanje 2,5 mM *p*-BP, 2,5 mM *p*-CP i 2,5 mM fenola nakon ciklusa od 5 časova u bač reaktoru sa biokatalizatorima: Eupergit C250L-PPO, Celit-PPO i Celuloza M-PPO.

Najveći stepen uklanjanja fenola i derivate fenola iz vode ima Eupergit C250L-PPO, zatim Celit-PPO imobilizat, a Celuloza M-PPO ima najmanje postignuto uklanjanje. Najslabije uklanjanje je u slučaju fenola, jer PPO iz krompira ima slabu monofenolaznu aktivnost (Selinheimo *et al.*, 2007). Dobijeni rezultati uporedivi su sa rezultatima za imobilizovanu lakazu (Cordi *et al.*, 2007). Pri koncentracijama supstrata od 2,5 mM, korišćenjem imobilizata Eupergit C250L-PPO, postignuto je 44% razgradnje *p*-BP, dok je *p*-CP razgrađen 35%, a fenol 20%. Na slici 14. se uočava da imobilizat Celuloza M-PPO postiže veći stepen uklanjanja *p*-CP u odnosu na *p*-BP. Imobilizati Eupergit C250L-PPO i Celit-PPO pokazuju sličan profil efikasnosti pri koncentracijama fenola od 10 mM (slika 14), kao i pri koncentracijama od 2,5 mM (slika 13), samo sa manjim stepenom uklanjanja.

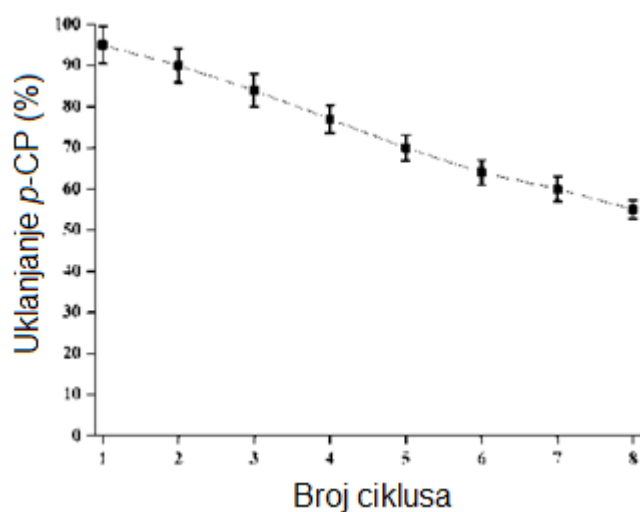


Slika 14. Uklanjanje 10 mM *p*-BP, 10 mM *p*-CP i 10 mM fenola nakon ciklusa od 5 časova u bač reaktoru sa biokatalizatorima: Eupergit C250L-PPO, Celit-PPO i Celuloza M-PPO.

U radu Levy *et al.* (2003) gdje je korišćena imobilizovana peroksidaza iz rena na celulozi postignuto je uklanjanje samo 17% *p*-BP od početne koncentracije od 0,2 mM. Obično, što je niža početna koncentracija zagađivača, postiže se bolje uklanjanje, jer je slabija inhibicija enzima supstratom. Ako se to uzme u obzir, može se zaključiti da Eupergit C250L-PPO ipak pokazuje značajnu efikasnost u uklanjanju *p*-BP i *p*-CP pri 2,5 mM koncentracijama supstrata. Kada se koriste supstrati koncentracije 10 mM, imobilizati su i dalje sposobni da postignu određeni stepen uklanjanju, ali bi za upotrebu

u realnim sistemima bilo isplativije razblažiti fenolne vode do nižih radnih koncentracija fenola, pogodnih za enzimsko uklanjanje.

Za svaki imobilizat potrebno je odrediti broj ciklusa koji može da se uradi i da se ispita efikasnost, što je i urađeno za Eupergit C250L-PPO za uklanjanje *p*-CP. Nakon osam uzastopnih ciklusa, od kojih je svaki trajao po 5h, efikasnost uklanjanja *p*-CP pomenutim biokatalizatorom pokazuje trend pada na 55%, slika 15 (Lončar *et al.*, 2011). Zapaženo je formiranje i akumulacija tamnih precipitata na imobilizatu, što prividno smanjuje aktivnost imobilizata, jer se akumulacijom precipitata na imobilizatu onemogućava kontakt enzima sa supstratom. Slične studije drugih autora pokazale su da imobilizovana peroksidaza zadržava 40% aktivnosti nakon osam ponovljenih ciklusa (Matto i Husain, 2009).



Slika 15. Efikasnost uklanjanja *p*-CP katalizatorom Eupergit C 250L-PPO u ponovljenim ciklusima.

Mogućnost korišćenja imobilizata dobijenog vezivanjem PPO na celit nakon taloženja PPO amonijum sulfatom su ispitali i drugi. Khan i saradnici (Khan *et al.*, 2006) su pokazali da je imobilizovani enzim u odnosu na rastvorni enzim otporniji na denaturacione faktore kao što su promjena pH, porast temperature, urea, detergente (SDS, Triton X-100, Tween 20), kao i organske rastvarače mješljive sa vodom (acetonitril, dimetilformamid, dioksan i n-propanol). Ovi rezultati i rezultati dobijeni u okviru ove disertacije povećavaju spektar mogućih nosača za imobilizaciju PPO i drugih enzima sa potencijalom za upotrebu u tretmanu otpadne vode.

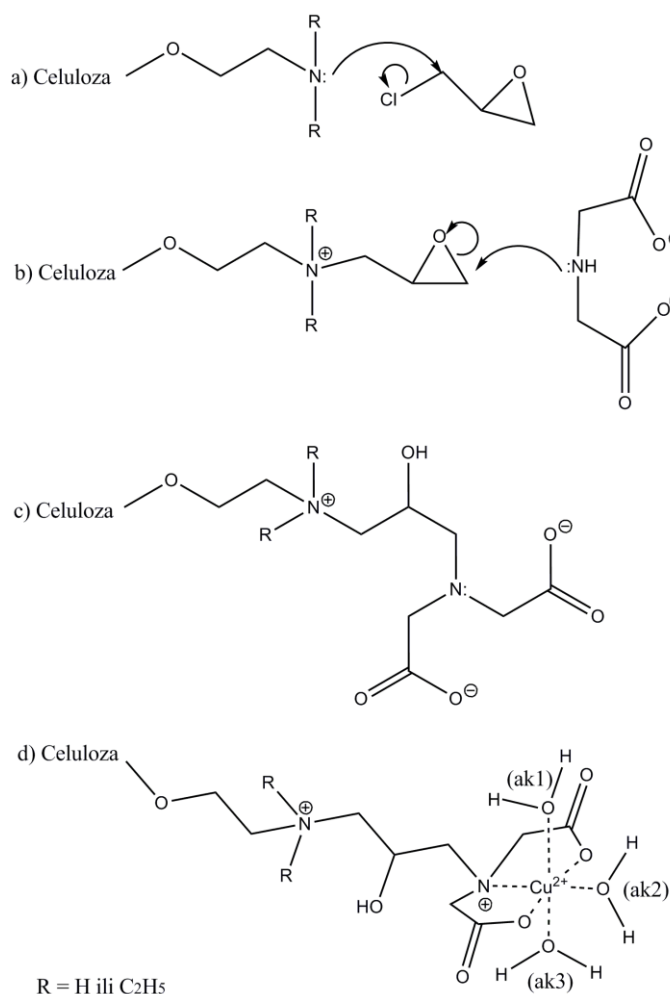
### 3.1.3 Sinteza novog nosača sa pipcima i njegova primjena za imobilizaciju PPO

Kovalentna imobilizacija enzima za nosač se smatra metodom izbora. Međutim, nedostaci su što mnoge od preporučenih procedura zahtijevaju prederivatizaciju matriksa, dugi vremenski period potreban za reakciju kuplovanja i posebne uslove koji mogu da oštete enzim (Woodward, 1985). U nekim uslovima dolazi i do značajnog gubitka aktivnosti prilikom imobilizacije, nekad čak i do 85% kao što je to slučaj sa imobilizacijom peroksidaze na Eupergit nosaču (Pramparo *et al.*, 2010).

Imobilizacija enzima uz formiranje koordinativnih veza sa dvovalentnim metalnim jonima postaje atraktivna metoda zbog svoje reverzibilne prirode, što omogućava da se enzim eluira sa matriksa (nakon gubitka aktivnosti) jednostavnim tretmanom nekim helirajućim reagensom, kao što je EDTA. Imobilizacija nove količine enzima na isti matriks daje čistu, jednostavnu i jeftinu tehnologiju za tretman otpadne vode. Da bi se izbjegli pomenuti mogući nedostaci kovalentnog vezivanja, kao i da bi se izbjegla derivatizacija matriksa nakon vezivanja enzima u ovoj disertaciji korišćena je osobina bakra-(II) da se koordinativno vezuje za aminokiselinske ostatke na površini proteina što se često koristi prilikom prečišćavanja proteina metodom imobilizovane metal-afinitetne hromatografije i imobilizacije fenoloksidaza (Richard-Forget *et al.*, 1994). Ovime se postiže brzo vezivanje, pod blagim uslovima i jednostavnim postupkom. Koristeći ovu osobinu, dodatno obogaćivanje oksidazne aktivnosti se postiže usled većeg afiniteta PPO za vezivanje na matriks u odnosu na druge proteine prisutne u rastvoru. Sličan pristup je korišćen za direktnu imobilizaciju tirozinaze na celitu, D-sorbitol cimetnom estru i bakar-alginatnom gelu (Khan *et al.*, 2006; Marin-Zamora *et al.*, 2006; Palmieri *et al.*, 1994). Sepharose<sup>®</sup> i agarozni derivati koji sadrže metal-helirajuće grupe poput iminodiacetata (IDA) ili nitriloacetata (NTA) su najčešći korišćeni nosači (Bickerstaff, 1997; Duran *et al.*, 2002; Piacquadio, 1997). Visoka cijena komercijalno dostupnih helirajućih agarozna i celuloza je njihovo najveće ograničenje. Pored toga, kratki distancijali ograničavaju pokretljivost vezanog enzima i smanjuju prividnu katalitičku moć. Sve ovo otvara mogućnost za sintezu novog nosača, sa dužim helirajućim distancijalima (pipcima) koji nudi veću fleksibilnost enzimu i dostupnost supstrata, time povećavajući kontakt enzima i supstrata.

Na laboratorijskoj i industrijskoj skali prečišćavanje proteina se većinom odvija na jonoizmjenjivačkim matriksima, što nije neobično ako se uzme u obzir njihov veliki

kapacitet za vezivanje proteina i visoka moć razdvajanja. Ovi matriksi mogu da se koriste konačan broj puta, nakon čega njihova moć razdvajanja nestaje. U ovoj disertaciji je iskorišćen potrošeni jonoizmjenjivački matriks, dietilaminoetil (DEAE)-celuloza kao početni sirovi materijal za sintezu novog nosača za imobilizaciju. DEAE celuloza je katjonski derivat prirodnog polimera i posjeduje poželjnu hidrodinamičku strukturu, jer fibrilarna struktura ima veliku aktivnu površinu. Izabrana je zbog svoje biodegradabilnosti, hidrofilnosti i prisustva hidroksilnih grupa, kao i prirodnog porijekla (Arica *et al.*, 2000; Kok *et al.*, 1999).



Slika 16. Sinteza TC. Epihlorhidrinska aktivacija DEAE celuloze je praćena uvođenjem iminodiacetatnih grupa. Joni bakra se koordinativno vezuju za iminodiacetatne grupe, a tri molekula vode se u toku imobilizacije zamjenjuju koordinovanjem sa atomima N, O ili S u bočnim aminokiselinskim ostacima na površini proteina (Lončar i Vujčić, 2011). ak – aminokiselinski ostatak na površini proteina.

Nosač sa „pipcima” (eng. tentacle carrier, TC) je sintetisan aktivacijom aminogrupa DEAE celuloze epihlorhidrinom (slika 16a,b). Nakon toga su uvedene iminodiacetatne grupe, koje su kasnije zasićene bakarnim jonima (slika 16c,d). Postupak imobilizacije se sastoji od jednostavnog inkubiranja rastvora enzima, sa nosačem, preko noći uz miješanje, čime se dobija TC-PPO. Vezivanje enzima (imobilizacija) se postiže vezivanjem za bakar N, O i S atoma bočnih aminokiselinskih ostataka na površini enzima (Lončar i Vujčić, 2011). Ovako dobijen biokatalizator je testiran za uklanjanje halogenfenola u šaržnom reaktoru i pokazao je izuzetan potencijal uklanjajući skoro u potpunosti *p*-CP i *p*-BP iz sintetičke otpadne vode.

Tokom sinteze DEAE-celuloze pored dietilaminoetil grupa ostaje nekoliko procenata rezidualnih amino grupa koje su primarno derivatizovane epihlorhidrinom u korišćenoj proceduri (Smith i Gillespie, 1989). Ovo se dešava zato što su DEAE grupe sterno zaštićenije i s toga manje reaktivne od primarnih amina pa neke od njih ostanu neizreagovane nakon aktivacije matriksa epihlorhidrinom, čime se dobija miješani IMAC/IEX nosač. Epihlorhidrinski distancijali se uvode u DEAE celulozu stvaranjem veze sa azotovim atomom kao što je prikazano na slici 16a. Pod opisanim uslovima OH grupe celuloze su manje reaktivne od NH<sub>2</sub>, jer je većina “potrošena” u toku sinteze DEAE celuloze, a preostale su manje reaktivne zbog sternih smetnji. Helirajuća grupa, IDA, je ireverzibilno kuplovana na epoksi-aktiviranu DEAE-celulozu (slika 16a-c). Joni bakra formiraju reverzibilne koordinativne veze sa helirajućom grupom time stvarajući TC (slika 16d.).

### 3.1.3.1 Karakterizacija TC

Da bi se polimer bolje opisao neophodno je da mu se odrede fizičko-hemijski parametri. Tako je sadržaj vode određen sušenjem u vakuumu do konstantne mase i iznosio je 85%. Količina uvedenih epoksi grupa prije uvođenja IDA grupa je određena po metodi Axen *et al.* (1975) i iznosi 0.144 mmol/g (obračunato na suhu masu matriksa). Sadržaj bakra je određen metodom induktivno spregnuta plazma atomskom emisijom spektroskopijom (ICP-AES) i iznosi 7.3110 mg/g (obračunato na suhu masu matriksa), što je uporedivo sa komercijalno dostupnim helirajućim matriksim poput Chelating-Sepharose<sup>®</sup>.



### 3.1.3.2 Imobilizacija PPO na TC

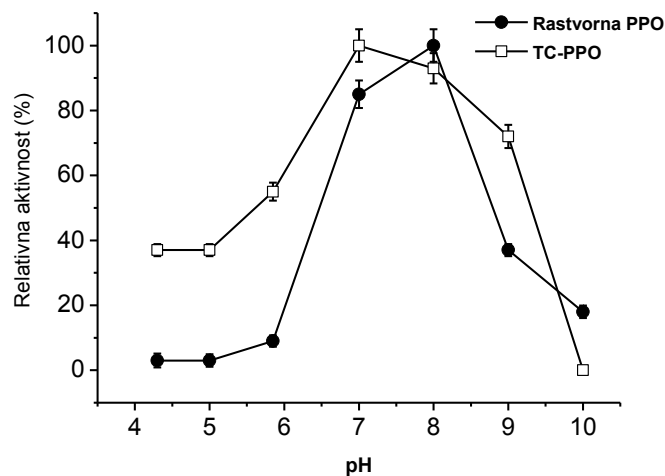
Imobilizacija PPO na TC se postiže reverzibilnim vezivanjem bakra i određenih aminokiselinskih ostataka proteina (ak1-ak3 na slici 16d). U ovom koraku, jon metala može se posmatrati kao elektron-par akceptor (Luisova kiselina) dok se N, O i S atomi aminokiselinskog bočnog ostatka mogu posmatrati kao elektron-par donori (Luisove baze). Tri aminokiseline moraju biti locirane na površini proteina da bi bile dostupne za koordinativno vezivanje. Ovaj nosač nudi veću fleksibilnost, a samim tim i dostupnost supstrata vezanom enzimu u poređenju sa konvencionalnim nosačima ovog tipa sa mnogo kraćim distancijalima.

Koristeći djelimično prečišćenu PPO pod datim uslovima imobilizacije (Poglavlje 4.1.3.2) dobijen je biokatalizator TC-PPO kome je određena specifična aktivnost od 310 000 U/g suvog nosača.

### 3.1.3.3 Uticaj pH i temperature rastvora na aktivnost TC-PPO

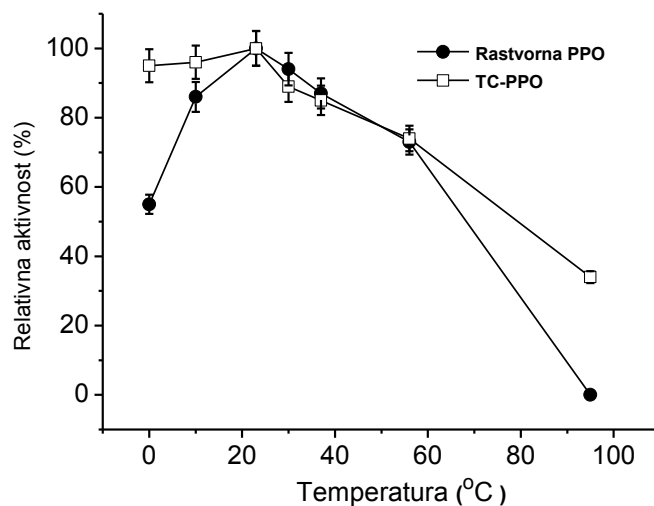
Ispitivan je uticaj temperature i pH rastvora na aktivnost TC-PPO. Svi drugi parametri reakcije su održavani konstantnim, dok je temperatura varirana u opsegu od 0 do 95°C, a pH u opsegu od 4.3 do 10.

Dobijeni eksperimentalni rezultati za uticaj početnog pH na brzinu oksidacije supstrata L-DOPA su prikazani na slici 17. Ovi rezultati pokazuju da je TC-PPO aktivan prema L-DOPA u širem opsegu pH u poređenju sa rastvornom PPO. pH optimum za TC-PPO iznosi 7,0–8,0. Ovo predstavlja radnu pogodnost, jer je pH blisko neutralnom pH poželjno za uklanjanje halogenfenolnih efluenata. Kako pKa vrijednosti za *p*-BP i *p*-CP na 25°C iznose 9.37 i 9.41, respektivno (Lideed, 2005), efikasnost njihovog uklanjanja pomoću TC-PPO će se smanjivati sa porastom pH do 9,5 i ovo je pripisano formiranju konjugovanih baza *p*-BP i *p*-CP koje ne dozvoljavaju da fenolna jedinjenja djeluju kao vodonik donori.



Slika 17. Uticaj pH rastvora na brzinu oksidacije L-DOPA rastvornom i imobilizovanom PPO. Na slici je prikazana relativna aktivnost rastvornog enzima i TC-PPO pri čemu je najvećoj aktivnosti dodijeljena vrijednost 100%.

Grafik zavisnosti aktivnosti TC-PPO od temperature rastvora je prikazan na slici 18. Određivanje temperaturnog optimuma je dalo slične krive i za rastvornu i za imobilizovanu PPO.

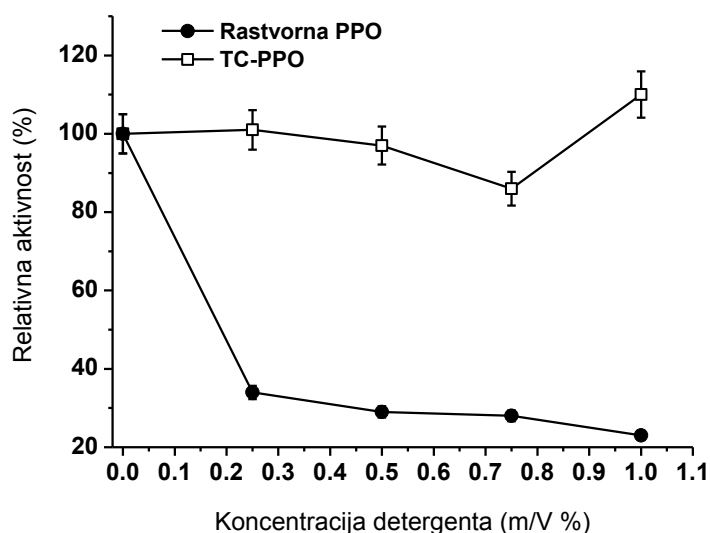


Slika 18. Uticaj temperature rastvora na brzinu oksidacije L-DOPA rastvornom i imobilizovanom PPO. Na slici je prikazana relativna aktivnost rastvornog enzima i TC-PPO pri čemu je najvećoj aktivnosti dodijeljena vrijednost 100%.

Kao što se sa grafika vidi, aktivnost PPO, a samim tim i njena sposobnost da oksiduje fenolna jedinjenja je najveća na 25°C. Povišena temperatura ima negativan efekat na aktivnost PPO; ipak, imobilizovani enzim pokazuje 34% zaostale aktivnosti na 90°C. Izlaganje niskim temperaturama bi trebalo da uspori enzimsku reakciju, ali je TC-PPO ipak pokazao skoro 100% aktivnosti na 0°C pod opisanim uslovima eseja. Ovo je još jedna interesantna karakteristika TC-PPO, jer ukazuje na to da nije potrebno regulisanje temperature za primjenu u velikim reaktorima, što predstavlja značajnu uštedu energije.

### 3.1.3.4 Uticaj detergenta na aktivnost TC-PPO

Otpadna voda je često kontaminirana detergentima, kako iz industrije, tako i iz gradskih kanalizacija, pa je potrebno ispitati efikasnost biokatalizatora u njihovom prisustvu (Prigione *et al.*, 2008). Ispitivana je stabilnost TC-PPO i PPO u prisustvu natrijum-dodecilsulfata u opsegu koncentracija 0,1-1,0% (w/V). Khan i saradnici (2006) su pokazali da PPO imobilizovana na Celite pokazuje veću otpornost ka denaturaciji indukovanoj SDS detergentom u odnosu na rastvorni enzim. Naši rezultati se slažu sa ovim podacima, pošto je stabilnost imobilizovanog oblika lako uočljiva na grafiku (slika 19), kao i to da dolazi do aktivacije TC-PPO pri koncentraciji SDS od 1%.

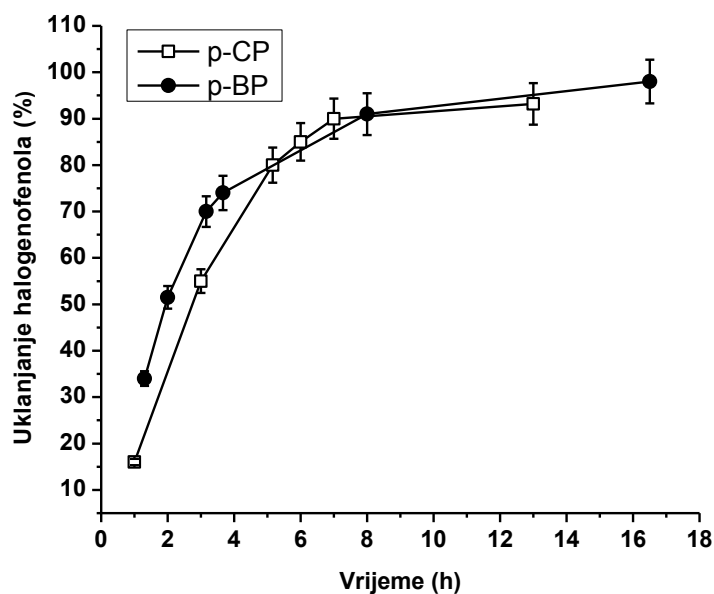


Slika 19. Uticaj SDS na aktivnost rastvorne i imobilizovane PPO. Na slici je prikazana relativna aktivnost rastvornog enzima i TC-PPO pri čemu je početnoj aktivnosti dodijeljena vrijednost 100%.

Aktivacija polifenoloksidaza submicelarnim koncentracijama SDS detergenta je dobro poznata osobina ovih enzima i to porijeklom iz biljaka, gljiva i bakterija (Espin i Wichers, 1999; Lopez-Serrano *et al.*, 2002; Moore i Flurkey, 1990). Sa druge strane, SDS denaturiše većinu proteina izazivajući konformacione promjene i tako smanjuje aktivnost rastvornog enzima. Aktivacija imobilizovane PPO može da se objasni ograničenim konformacionim promjenama koje bi bile posledica vezivanja male količine SDS koje indukuju aktivaciju enzima. Koncentracija od 1% (m/V) koja indukuje prividnu aktivaciju je 4,25 puta veća od kritične micelarne koncentracije, ali možemo da pretpostavimo da je imobilizovani enzim manje podložan dejstvu detergenta u odnosu na rastvorni enzim, pa je potrebna veća koncentracija detergenta da bi došlo do već opisane aktivacije polifenoloksidaza. Ograničene konformacione promjene su direktna osobina imobilizovanih enzima. Inkubacija rastvornog enzima sa 1,0% SDS u trajanju od 1 časa rezultuje gubitkom 77% početne aktivnosti pod istim eksperimentalnim uslovima pod kojim TC-PPO pokazuje prividnu aktivaciju. Moguće je i da prisustvo detergenta pogoduje asosovanju dobijenih polimera u rastvoru i da sprečava precipitaciju istih po katalizatoru.

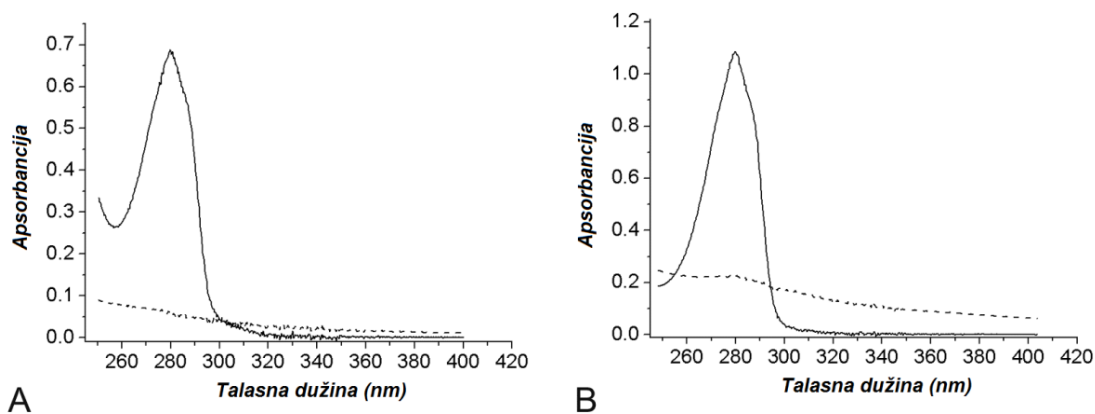
#### **3.1.3.5 Ispitivanje upotrebe TC-PPO za uklanjanje halogenfenola**

Tokom uklanjanja *p*-BP i *p*-CP dobijeni su slični rezultati. Pokazano je da je moguće ukloniti više od 90% *p*-BP za 8 časova pri koncentraciji od 100 mg/L (slika 20). *p*-CP je uklonjen istom brzinom. Ovaj eksperiment je urađen pri konstantnoj temperaturi od 25°C. pH rastvora je nepromijenjen tokom cijelog eksperimenta. Međutim, formiranje boje se zapaža kao promjena od prozirne na početku procesa do braonkaste u toku prva 2-3 časa. Nakon toga dolazi do formiranja tamno braon/crnih precipitata koji predstavljaju polimere oksidovanih halogenfenola. Ovi precipitati se djelimično adsorbuju na biokatalizatoru, a djelimično ostaju u rastvoru. Sa ciljem da se potvrdi oksidacija *p*-BP i *p*-CP i kvantifikuje nastali derivat, urađena je spektrofotometrijska analiza filtrovanih uzoraka.



Slika 20. Uklanjanje halogenofenola (100 mg/L) iz vodenih rastvora upotrebom TC-PPO. Alikvoti su uzimani u vremenskim intervalima i određivana je koncentracija halogenofenola.

Nestajanje pikova u spektru tretiranog uzorka u odnosu na spektar početnog uzorka je očigledan dokaz uklanjanja halogenofenola (slika 21).



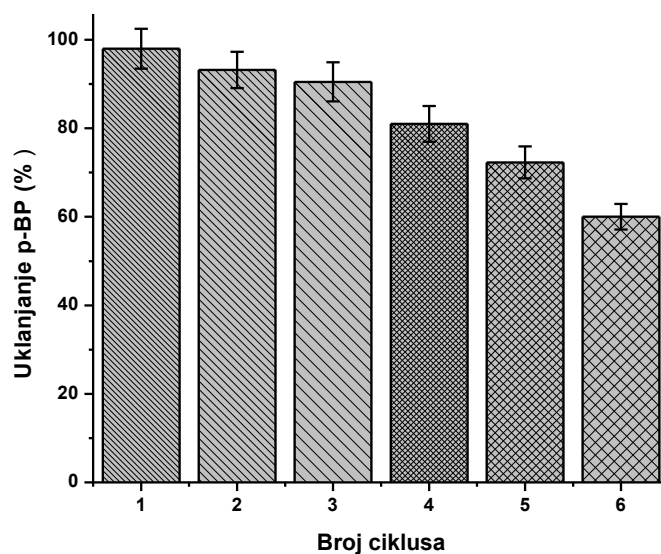
Slika 21. UV-Vis spektri tretiranih rastvora *p*-BP (A) i *p*-CP (B) (isprekidane linije) u poređenju sa spektrima početnih rastvora (puna linija).

Opisanim tretmanom koncentracija halogenofenola je smanjena ispod 10 mg/L što je gornja granica određena regulativama za ispuštanje fenolne otpadne vode u otvorene tokove (Yamada *et al.*, 2005). Skoro podjednako uspješan je postupak koji

koristi peroksidazu iz gorke tikve (Ashraf i Husain, 2010). Ipak, neki biokatalizatori dobijeni korišćenjem komercijalnih nosača poput Eupergit-a pokazuju mnogo manju efikasnost u uklanjanju halogenfenola kao što je već opisano u odjeljku 3.1.2. Ovi katalizatori mogu da uklone samo 50% of *p*-BP i 45% fenola (Pramparo *et al.*, 2010; Lončar *et al.*, 2011) i ti podaci ukazuju na potrebu za stvaranjem novih nosača i daljim poboljšanjem procesa.

### 3.1.3.6 Ispitivanje efikasnosti TC-PPO u ponovljenim ciklusima uklanjanja halogenfenola

Kako je glavni cilj imobilizacije enzima višestruka upotreba potrebno je ispitati efikasnost imobilizata za uklanjanje halogenfenola u više uzastopnih ciklusa. Za oba testirana jedinjenja imobilizat radi sa efikasnošću od preko 90% u prva tri ciklusa, od kojih svaki traje 8 časova. Nakon šest ciklusa efikasnost uklanjanja *p*-CP pada na 55%, a za *p*-BP ona iznosi 60% (slika 22).



Slika 22. Uticaj ponavljanja ciklusa na efikasnost TC-PPO.

Kao što je opisano u Odjeljku 3.1.3.5 uočena je akumulacija tamnih precipitata na imobilizatu. Akumulacija precipitata se postepeno povećava iz ciklusa u ciklus i ovo je vjerovatno razlog smanjenja efikasnosti uklanjanja u sledećim ciklusima, pošto precipitat interaguje sa vezanom PPO hidrofobnim interakcijama sprečavajući

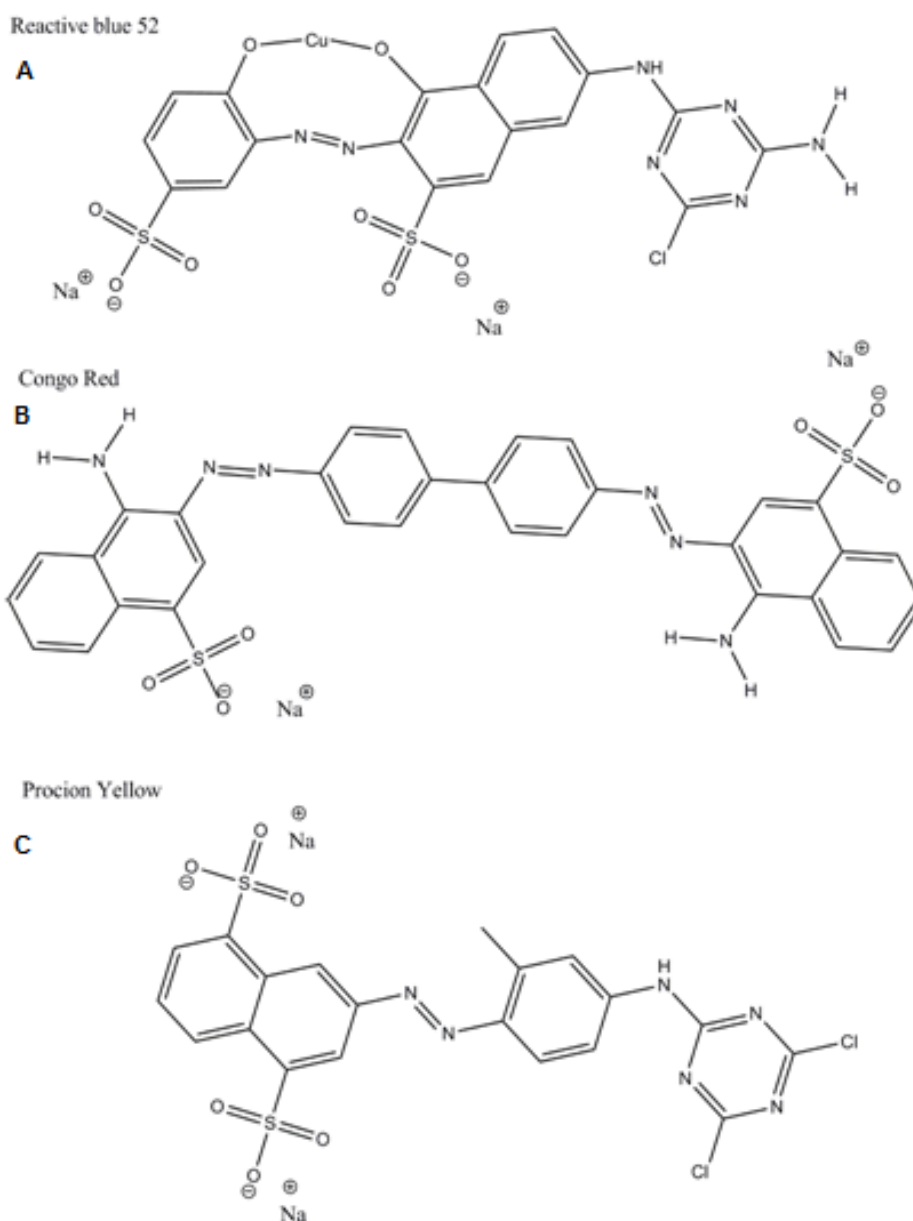
pokretljivost enzima, a moguće je da dolazi i do inhibicije, jer precipitat djeluje kao pseudo supstrat (Lončar i Vujčić, 2011). Moguće je da bi se upotrebom kontinualnog reaktora spriječilo akumuliranje produkata reakcije na biokatalizatoru. Neki autori sugeriraju primjenu koagulanasa bogatih amino grupama (poput hitozana i polietilenimina) za uklanjanje produkata reakcije (Wada *et al.*, 1993), jer je poznato da obojeni produkti koji nastaju oksidacijom fenola reaguju sa poliaminima. Da bi se vrijeme potrebno za uklanjanje fenola u bač reaktoru smanjilo moguća je upotreba koagulanasa, jer bi se uklanjanjem proizvoda dovelo do toga da reakcija teče istom brzinom kao na početku reakcije. Međutim, tu se javlja problem odlaganja generisanog čvrstog otpada, a i cijena procesa raste. Alternativa bi mogla da bude upotreba TC-PPO u kontinualnom reaktoru, jer bi se tako smanjilo kontaktno vrijeme između enzima i reaktivnih hinona, čime bi se povećao broj ciklusa sa zadovoljavajućom efikasnošću.

Iz eksperimenata sinteze novog nosača sa pipcima i njegove primjene za imobilizaciju PPO može se zaključiti da je dobijeni katalizator TC-PPO pokazao pH optimum na 7,0–8,0 i temperaturni optimum na 25°C. Imobilizovana PPO pokazuje skoro 100% aktivnosti na 0°C. TC-PPO je znatno otpornija na denaturaciju indukovanu detergentom natrijum-dodecilsulfatom (SDS) u odnosu na solubilni enzim, a pokazao je i određeni stepen aktivacije ovim detergentom pri koncentraciji od 1%. TC-PPO je testiran u šaržnom reaktoru za uklanjanje *p*-CP i *p*-BP iz vodenih rastvora. Postignuto je uklanjanje pomenutih fenola preko 90% pri koncentraciji fenola 100 mg/L. Za oba halogenfenola TC-PPO je pokazao stepen uklanjanja od preko 90% u prva tri ciklusa, nakon čega efikasnost opada do 60% nakon šest ciklusa od po 8 časova.

### **3.2 Uklanjanje boja fenoloksidazom iz krompira (*Solanum tuberosum*)**

Da bi se proširio opseg moguće primjene PPO za uklanjanje ksenobiotika, u ovom radu ispitivana je i mogućnost korišćenja djelimično prečišćenog PPO za uklanjanje 7 različitih, do sada sa ovim enzimom netestiranih tekstilnih boja, kao i tri realna uzorka (industrijska efluenta). Reprezentativne strukture testiranih boja prikazane su na slici 23. Optimizacija procesa obezbojavanja uključuje ispitivanje uticaja pH,

koncentracije PPO i dužine inkubacije. Svi parametri su optimizovani na temperaturi od 25°C.



Slika 23. Strukture boja Reactive blue 52 (A), Congo red (B) i Procion Yellow (C).

### 3.2.1 Uticaj pH na obezbojavanje tekstilnih boja

Oksidativni enzimi koji se ispituju za primjenu uklanjanja ksenobiotika iz otpadnih voda potiču iz biljaka, gljiva i bakterija. Poznato je za većinu ovih enzima da pH optimum određen sa uobičajenim supstratima za određivanje enzimске aktivnosti ne



korelišu sa optimalnim pH za uklanjanje datog ksenobiotika. Objašnjenje za ovu pojavu moguće je potražiti u složenim strukturama ksenobiotika i prisustvu različitih jonizabilnih grupa, čije naelektrisanje zavisi od pH sredine, a vezivanje za mjesto za vezivanje supstrata enzima zavisi od naelektrisanja i supstrata i površinskih amino-kiselinskih ostataka. Da li će određeni oksidativni enzim moći da oksiduje odabrane ksenobiotike na datom pH najlakše (i najpouzdanije) se određuje empirijski. Za PPO ispitivanje uticaja pH na efikasnost obezbojavanja urađeno je u četiri različita pufera (natrijum-acetat, pH 3,0 i pH 5,0, natrijum-fosfat, pH 7,0 i glicin-natrijum hidroksid, pH 9,0). Nakon 1 časa dobijeni polimerni precipitati su uklonjeni iz rastvora filtracijom na Whatman No.1 papiru, a mjerenjem apsorbancije na karakterističnoj talasnoj dužini određen je sadžaj preostale boje u odnosu na apsorbanciju početnog rastvora koja je računata kao 100%. Rezultati eksperimenata za ispitivanje uticaja početnog pH rastvora na obezbojavanje tekstilnih boja su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Uticaj početnog pH rastvora na obezbojavanje boja sa PPO (424 U/mL).

	$\lambda_{\max}$	C (mg/L)	% zaostale boje*			
			pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
<b>Aminohlorotriazinske boje</b>						
Procion yellow (PY)	420	65	7 ± 0.46	50 ± 1.06	95 ± 1.15	100
Procion red brown (PRB)	460	50	26 ± 0.86	67 ± 2.60	97 ± 1.2	100
Procion dark blue (PDB)	600	50	47 ± 1.60	93 ± 1.65	100	100
<b>Azo-boje</b>						
Reactive blue 52 (RB52)	615	50	5 ± 0.17	71 ± 2.15	91 ± 1.24	92 ± 1.7
Reactive green 15 (RG15)	625	100	9 ± 0.31	59 ± 1.69	93 ± 1.0	93 ± 1.2
Reactive yellow 125 (RY125)	390	65	11 ± 0.29	54 ± 1.87	97 ± 0.9	100
Congo red (CR)	522	65	0.5 ± 0.04	5 ± 0.03	83 ± 1.1	90 ± 0.8

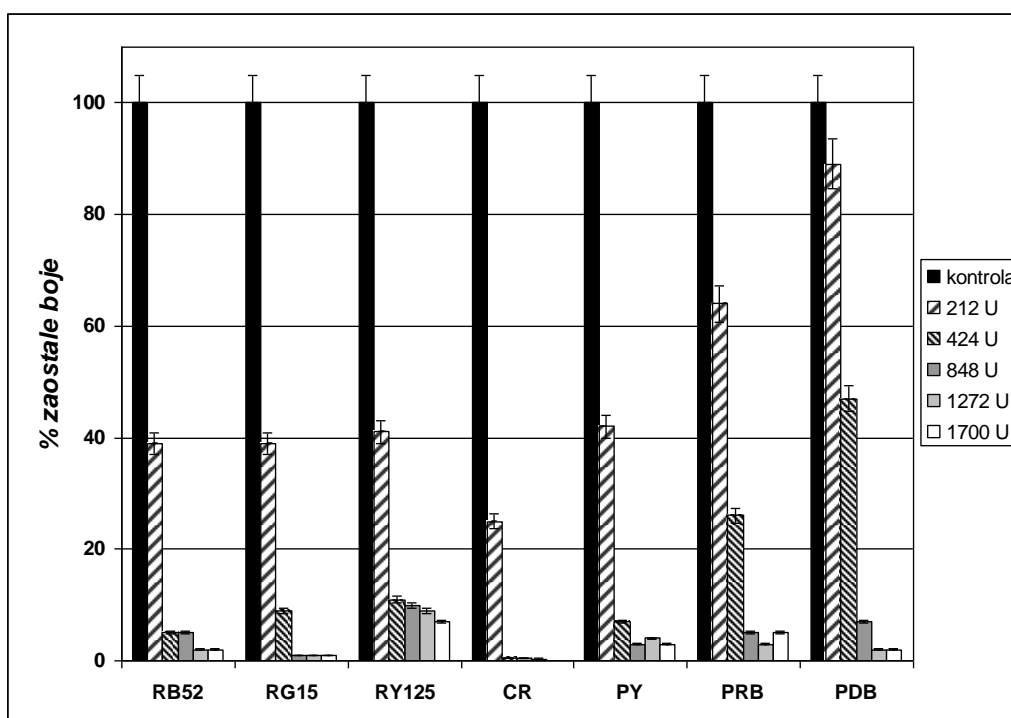
\*Statistička značajnost potvrđena je Studentovim t-testom za  $p < 0,05$ .

Postignut je veći stepen obezbojenja na nižim pH vrijednostima, sa maksimumom na pH 3,0. Postoje raniji podaci za maksimalno obezbojavanje različitim biljnim peroksidazama (Akhtar *et al.*, 2005) i mikrobnim polifenoloksidazama (Unyayar *et al.*, 2005) na kiselom pH. Povišavanjem pH na 5,0 stepen obezbojavanja se rapidno smanjuje. Ovo predstavlja prednost za upotrebu pomenutih enzima u tretmanu industrijske obojene vode, kod obojenih otpadnih voda koje su kiseli efluenti (de Souza

*et al.*, 2007). U slučajevima kada to nisu, bilo koji jeftini izvor kiseline se može koristiti da se pH podesi na 3,0.

### 3.2.2 Uticaj koncentracije PPO i dužine inkubacije na obezbojavanje

Da bi se dobio ekonomski isplativ proces, potrebno je odrediti minimalnu koncentraciju enzima potrebnu za uklanjanje određene boje (de Souza *et al.*, 2007). Varirana je koncentracija enzimske aktivnosti u opsegu od 212 U/mL efluenta do 1700 U/mL efluenta u 50 mM natrijum-acetatnom puferu pH 3,0 na 25°C 1 čas. Stepenn obezbojenja je praćen na već opisani način. Histogram prikazan na slici 24. prikazuje uticaj različite količine enzima na obezbojavanje testiranih boja. Efikasnost uklanjanja boja se postepeno povećava sa povećanjem količine dodatog enzima.



Slika 24. Nalaženje minimalne koncentracija PPO aktivnosti potrebne za obezbojavanje boja.

Za uklanjanje boja pod datim uslovima nije dovoljno 212 U/mL, iako je u slučaju boje Congo red otprilike 75% boje uklonjeno. Pri koncentracijama enzima od 424 U/mL dolazi do maksimalnog obezbojavanja boja RB52, RG15, RY125, CR i PY, što znači da dalje povećanje koncentracije enzima nije dalo značajno bolje rezultate.

Boje PRB i PDB su pokazale otpornost ka dejstvu PPO i bilo je neophodno utrošiti 1272 U/mL boje da bi se postiglo skoro potpuno obezbojenje za 1 čas (slika 24).

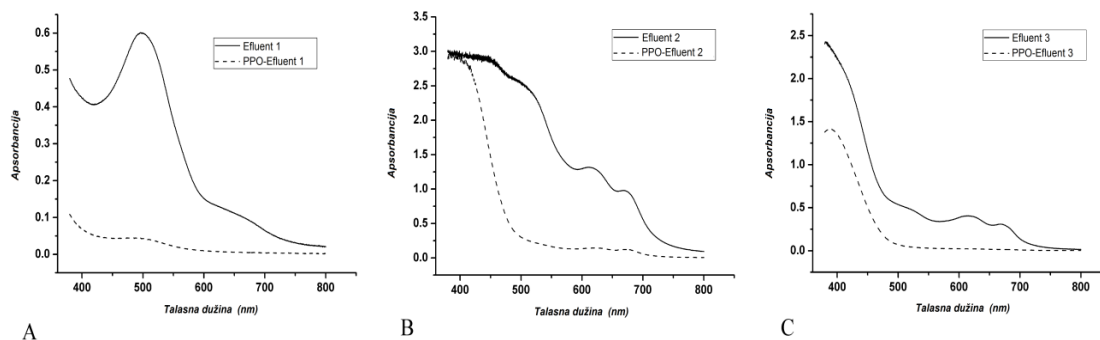
Obezbojavanje tekstilnih boja krompirovom fenoloksidazom je ispitivano i u zavisnosti od vremena reakcije (rezultati nisu prikazani). Pojava obojenih precipitata je uočena već nakon 15 minuta u slučaju boja RB52, RG15 i CR, dok je kod drugih boja precipitat postepeno nastajao tokom jednog sata. U opisanim uslovima nije dobijeno značajno povećanje obezbojenja inkubiranjem dužim od 1 časa. Postoji značajna prednost u obezbojavanju koje se postiže precipitacijom, u odnosu na obezbojavanje bez precipitacije (dobijaju se rastvorni produkti, uglavnom slučaj kod peroksidaza i lakaza). Prednost se ogleda u tome da je u prvom slučaju ukupan sadržaj organskog ugljenika značajno smanjen, dok u drugom slučaju ukupan sadržaj ugljenika ostaje nepromijenjen.

### 3.2.3 Vis i FTIR spektrometrijska analiza tekstilnih efluenata tretiranih sa PPO

Sem optimizacije procesa obezbojavanja, karakterizacija proizvoda dobijenih reakcijom enzimske oksidacije ksenobiotika je neophodna kako bi se utvrdilo narušavanje strukture koja ih čini opasnim, a to su reaktivne grupe i hromofore. U tom smislu urađene su spektrofotometrijske analize početnih obojenih rastvora i rastvora nakon enzimskog tretmana, kao i analiza dobijenih polimernih precipitata infracrvenom spektroskopijom.

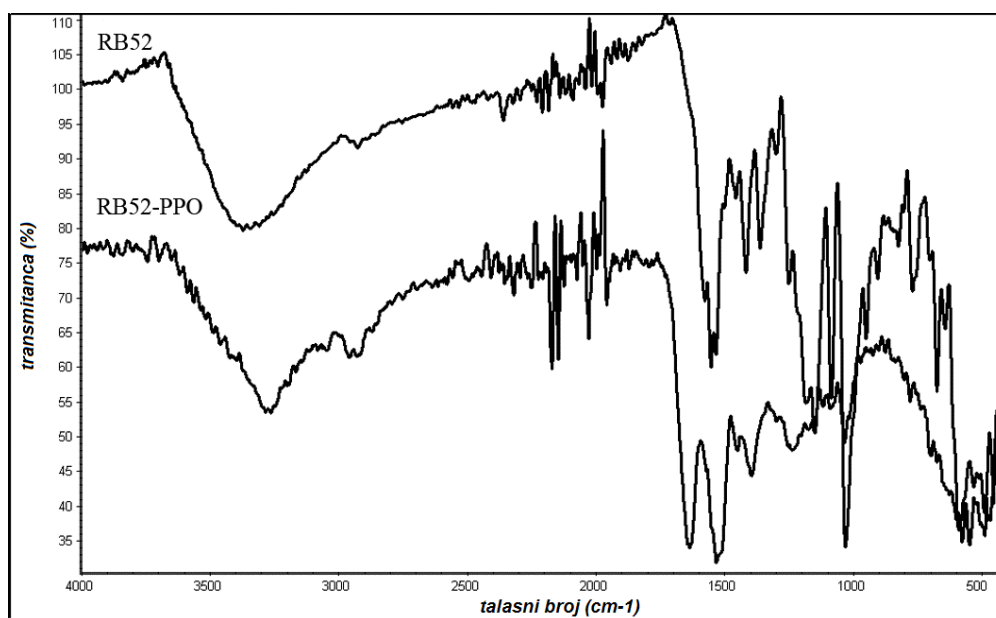
Tekstilni efluenti sakupljeni u lokalnoj bojadi tekstila analizirani su spektrofotometrijski samo u vidljivoj oblasti, jer se karakteristični apsorpcioni pikovi za hromofore boja nalaze u ovoj oblasti (slika 25). Nakon tretmana, značajno smanjenje apsorpcije (nestajanje pikova) je uočljivo u čitavom vidljivom regionu. Ovo je rezultat degradacije hromofornih grupa prisutnih u bojama (Akhtar *et al.*, 2005). Iako su efluenti nepoznatog sastava (jer su industrijske smješe boja poslovna tajna), logično je pretpostaviti da su neke od individualno testiranih boja prisutne u efluentima (ili boje sličnih struktura). Tretman ovih efluenata enzimom rezultovao je kao i kod pojedinačnih boja formiranjem nerastvornog, obojenog precipitata koji nastaje spontanom polimerizacijom hinona, što dovodi do agregacije aromatičnih zagađivača (Khan i Husain, 2007). Tretman boja i fenola enzimima daje nerastvorne agregate koje je

moгуće lako odvojiti iz smješe (Akhtar *et al.*, 2005; Lončar *et al.*, 2012; Wada *et al.*, 1995).



Slika 25. Vidljivi spektri tretiranih i netretiranih efluenata. Spektri polaznih rastvora su prikazani punom linijom, a spektri tretiranih rastvora isprekidanom. A) roze efluent, B) braonkast efluent, C) tamno zeleni efluent.

Analiza FTIR spektara početne boje RB52 i produkta koji nastaje njenom oksidacijom sa PPO pokazuje nestanak nekih pikova koji se uočavaju u početnom jedinjenju i pojavu novih pikova u dobijenom proizvodu (slika 26).



Slika 26. FTIR spektri: gornji spektar prikazuje boju RB52, dok donji prikazuje spektar osušenog precipitata dobijenog nakon tretmana RB52 sa PPO.

Spektar produkta sa širokim trakama ukazuje na formiranje polimera tokom reakcije obezbojavanja. Nekoliko važnih traka nedostaje u spektru proizvoda, kao što su traka na  $1580\text{ cm}^{-1}$  za N=N istežuće vibracije (Telke *et al.*, 2010), kao i traka na  $1188\text{ cm}^{-1}$  za fenolna C-O istezanja. Uočljive nove trake na  $1640\text{ cm}^{-1}$  i  $1530\text{ cm}^{-1}$  mogu biti pripisane *o*-hinonskim C=O i C=N istežućim vibracijama, respektivno. Trake za sulfo- i amino-grupe, kao i one karakteristične za aromatični prsten su prisutne i u spektru početne boje i u spektru proizvoda oksidacije. Novi pikovi u FTIR spektru proizvoda u poređenju sa RB52 ukazuju na formiranje polimera. Slični rezultati su dobijeni prilikom oksidativne polimerizacije  $\alpha$ -naftola i katehola kada se koristi lakaza (Aktas *et al.*, 2000, 2003). Kako su slični rezultati dobijeni i za ostale ispitivane boje u ovoj disertaciji, prikazan je samo jedan, ilustrativni rezultat.

Postojanje dvije izoforme u preparatu PPO (slika 11, odjeljak 3.1.1) može da bude odgovorno za široki spektar boja koje PPO može da oksiduje. Autori koji su ranije ispitivali upotrebu PPO (Khan i Husain, 2007) su koristili djelimično prečišćenu PPO dobijenu frakcionisanjem sirovog ekstrakta taloženjem amonijum-sulfatom, što nije primjenjivo u industriji zbog visoke cijene amonijum-sulfata i potrebe za njegovim uklanjanjem iz preparata. Za potrebe izučavanja molekuskog mehanizma oksidacije boja svakako je neophodno koristiti potpuno prečišćeni enzim i čist preparat boje.

Iz eksperimenata uklanjanja boja rastvornom PPO može se zaključiti da je pod optimizovanim uslovima 93-99.9% boja uklonjeno nakon tretmana u trajanju od 1 čas sa 424-1700 U/mL PPO, zavisno od boje. pH optimum za proces obezbojavanja za sve boje je 3,0. Korišćeni enzim je sposoban da ukloni sve testirane boje i da obezboji testirane efluente bez upotrebe medijatora. Obezbojavanje je postignuto uz formiranje nerastvornih polimera koji su uklonjeni filtriranjem ili centrifugiranjem. Formiranje polimera potvrđeno je infracrvenom spektroskopijom.

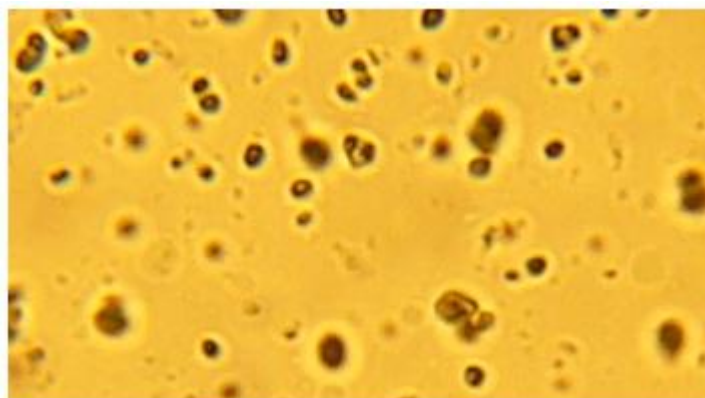
### 3.3 Uklanjanje ksenobiotika bakterijskom lakazom

U ovoj studiji je testirano oko 100 sojeva *Bacillus sp.* izolovanih iz poljoprivrednog i industrijskog zemljišta, termalnih izvora, slanih izvora, kravljeg mlijeka, krompira itd. Izolovani sojevi *Bacillus sp.* su odgajeni na sporulacionoj

podlozi i dobijene spore su testirane na lakaznu aktivnost. Kod jedanaest sojeva je detektovana lakazna aktivnost na površini spora korišćenjem supstrata ABTS i siringaldazina što se zajedno sa nemogućnošću da se oksiduje tirozin smatra dovoljnim dokazom da se radi o lakazi (Majeau *et al.*, 2010). Testirani enzimi su inhibirani azidom, a prividno inhibirani tiolnim jedinjenjima ( $\beta$ -merkaptioetanol, L-cistein, ditiotreitrol) koja zapravo ometaju stvaranje ABTS radikala (Johannes i Majcherzyk, 2000). Izolovani sojevi su identifikovani korišćenjem metode sekvenciranja 16S rDNA.

### 3.3.1 Identifikacija izolovanih sojeva i dobijanje spora iz različitih *Bacillus* sp.

Testiranje potencijala bakterijskih lakaza za tretman otpadne vode se obično izvodi upotrebom čitavih spora. Ovo je posledica rigoroznog procesa izolovanja enzima iz spora koji rezultuje dobijanjem male količine aktivnog enzima. Prilikom jednog od pokušaja izolovanja lakaze iz spora dobijen je prinos od samo 6% od početne aktivnosti (Held *et al.*, 2005). Međutim, autori Claus i Filip (1997) su pokušali ekstrakciju lakaze iz spora *Bacillus sphaericus* tretmanom enzimima, kiselinom, bazom, detergentima, organskim rastvaračima i sonifikacijom i nijedna od isprobanih metoda nije dala rezultat. Ekstrakt spore dobijen sa izoamilalkoholom je bio pozitivan na lakaznu aktivnost. Nakon centrifugiranja aktivnost je detektovana samo u talogu, čime je pokazano da je lakaza vezana za ostatke spora (što su potvrdili i mikroskopijom). Iz ovoga se može zaključiti da izolovanje lakaze iz spora nije moguće/isplativo, pa je ovu lakazu moguće koristiti ili kao čitave spore ili je proizvesti rekombinantnom heterologom ekspresijom čime bi se dobio rastvorni enzim.



Slika 27. Preparat spora obojenih po Šefer-Fulton.

Sojevi su zasijani u Petrijevim šoljama sa sporulacionom podlogom i inkubirani 4 dana na 37 °C. Nakon toga spore su sakupljene sa sporulacione podloge. Potvrda o prisustvu spora i odsustvu vegetativnih ćelija dobijena je bojenjem po Šefer-Fulton. Preparat je posmatran pod svjetlosnim mikroskopom (slika 27). Na slici se uočavaju spore zelene boje.

### **3.3.2 Provjera prisustva lakazne aktivnosti u sporama *Bacillus sp.***

Urađena je pretraga spora koje eksprimiraju aktivnu lakazu na površini spora u mikrotitar pločicama koristeći ABTS na pH 4,0 (0,1 M acetatni pufer) i na pH 7,0 (0,1 M fosfatni pufer). Pretraga je urađena na 37°C. Aktivne spore oksiduju ABTS koji mijenja boju iz svijetlo zelene u tamno zeleno/plavu. Uočava se da neki sojevi pokazuju aktivnost i na pH 7 i na pH 4, ali je promjena boje intenzivnija na pH 4 što se slaže sa publikovanim podacima (Cho *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2002; Reiss *et al.*, 2011).

Testiranjem svih sojeva dobijeno je devet sojeva koji su pokazali najvišu aktivnost. To su sojevi 12B1, MB 20, BBS 14, MB 7, MB 24A, MB 5B, MB 17B, MB 22A, MB 16B i BBS 6. Ovi sojevi su testirani sa siringaldazinom (SGZ) na pH 4 i pH 7. Aktivnost je detektovana u svim sojevima na pH 7, što je u saglasnosti sa publikovanim podacima (Claus, 2003).

#### **3.3.2.1 Dobijanje pojedinačnih kolonija *Bacillus sp.***

Dobijanje pojedinačnih kolonija *Bacillus sp.* je urađeno metodom razblaženja tako što su aktivne spore zasijane na hranljivom agaru, a dobijene pojedinačne kolonije presijane na sporulacionu podlogu; nakon inkubacije na 37°C, 4 dana, skupljene su spore.

#### **3.3.2.2 Određivanje aktivnosti lakaza**

Lakazna aktivnost je određena za spore dobijenih pojedinačnih kolonija sojeva *Bacillus sp.* Od svakog soja je testirano 2-6 dobijenih pojedinačnih kolonija. Jedinica enzimske aktivnosti je izražena kao ona količina enzima koja katalizuje transformaciju

1  $\mu$ mol supstrata u minuti. Specifična aktivnost je izražena u U/g, odnosno aktivnost po jedinici mase suvih spora. Korišćeni supstrati su ABTS i SGZ. Esej je rađen na pH 4 za ABTS i pH 7 za SGZ na temperaturi od 60°C. Rezultati su prikazani u tabeli 5.

Formula za izračunavanje enzimske aktivnosti (U/g) je:

$$Aktivnost = \frac{A \cdot V_{smješe} \cdot R}{e \cdot l \cdot m}$$

A – apsorbancija, V – zapremina reakcione smješe, e – ekstinkcioni koeficijent, l – debljina kivete, m – masa suvih spora, R – razblaženje.

Tabela 5. Aktivnost lakaza iz spora dobijenih pojedinačnih kolonija sojeva *Bacillus sp.*

Soj	Aktivnost	Aktivnost
	(U/g) ABTS	(U/g) SGZ
<b>12B1</b>	<b>1037</b>	<b>93</b>
<b>BBS 14</b>	<b>970</b>	<b>80</b>
BBS 6	400	26
MB 16B	260	15
MB 17B	500	40
MB 20	650	29
MB 22A	400	54
<b>MB 24A</b>	<b>1080</b>	<b>100</b>
MB 5B	400	30
MB 7	460	14

Najaktivniji sojevi su 12B1, BBS14 i MB24a. Oni su korišćeni u daljim eksperimentima.

### 3.3.3 Identifikacija izolovanih sojeva *Bacillus sp.*

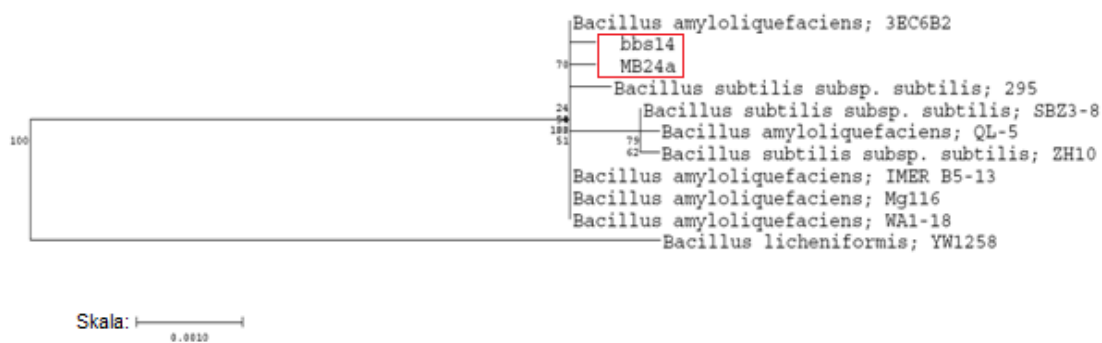
Najčešće korišćeni genski marker za proučavanje bakterijske filogenije i taksonomije je 16S rDNA gen, tj. njegova sekvencija. Ovaj gen spada u grupu „čuvarkuća“ (eng. housekeeping) gena. To su obično geni koji se konstitutivno



ekspimiraju i neophodni su za odvijanje osnovnih ćelijskih funkcija. Gen 16S rDNA kodira 16S ribozomalnu RNA koja ulazi u sastav 30S male subjedinice prokariotskih ribozoma i njena veličina je oko 1,5 kbp. Razlozi za odabir 16S rDNA gena za genski marker su: (1) prisutan je kod skoro svih bakterija, (2) njegova funkcija se nije promijenila tokom vremena, sugerirajući da su nasumične promjene sekvencije dobar pokazatelj vremenske udaljenosti vrsta (evolucije) i (3) sekvencija ovog gena dužine 1500 bp je dovoljno velika za potrebe bioinformatičke analize.

Za potrebe taksonomske identifikacije sojeva kao templat DNA korišćena je hromozomska DNA izolovana iz prekonocnih kultura odabranih sojeva metodom ekstremno brzog izolovanja DNA (Cheng i Jiang, 2006). Urađen je PCR za 16S rDNA gen tri najaktivnija soja, BBS 14, 12B1 i MB 24A. Korišćeni su prajmeri koji su specifični za rod *Bacillus* (Lane 1991). Gen 16S rDNA je umnožen lančanom reakcijom polimerizacije (PCR) u 30 ciklusa sa standardnim prajmerima 20F (5'- GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') i 1492R (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Temperatura hibridizacije prajmera (aniling temperatura, eng. annealing) je 45°C.

Proizvodi PCR reakcije su analizirani elektroforetski na 1% agaroznom gelu. Nakon završene elektroforeze PCR produkti su isječeni iz gela i ekstrahovani rastvorom iz Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) komercijalnog kita, a zatim prečišćeni hromatografski na kolonici (iz istog kita). Ekstrahovani produkti su sekvencirani. Na osnovu fenotipskih karakteristika i 16S rDNA homologije sekvencija, izolatima BBS14, 12B1 i MB24a je potvrđena pripadnost rodu *Bacillus*, a sva tri soja su po homologiji pripadnici vrste *B.amyloliquefaciens* (99% sličnosti). Pored toga, generisano je filogenetsko stablo dobijenih 16S rDNA sekvencija korišćenjem sekvencija dostupnih u Ribosomal Database Project ([URL:https://rdp.cme.msu.edu](https://rdp.cme.msu.edu)). Sa filogenetskog stabla se uočava srodnost sa ostalim sojevima *B.amyloliquefaciens*, kao i evolutivna bliskost ovih sojeva sa sojevima *B.subtilis* (slika 28). Sojevi *B.amyloliquefaciens*, kao i izolovani sojevi se nalaze na kraćim granama u odnosu na sojeve *B.subtilis* što ukazuje na genetsku udaljenost ove dvije vrste. Međutim kako razmjernik označava skalu vjerovatnoće od 0,001 supstitucije po nukleotidu, onda proizilazi zaključak da su vrste *B.subtilis* i *B.amyloliquefaciens* veoma bliske i da je za neke sojeve, na osnovu ove metode, teško reći o kom soju se radi.

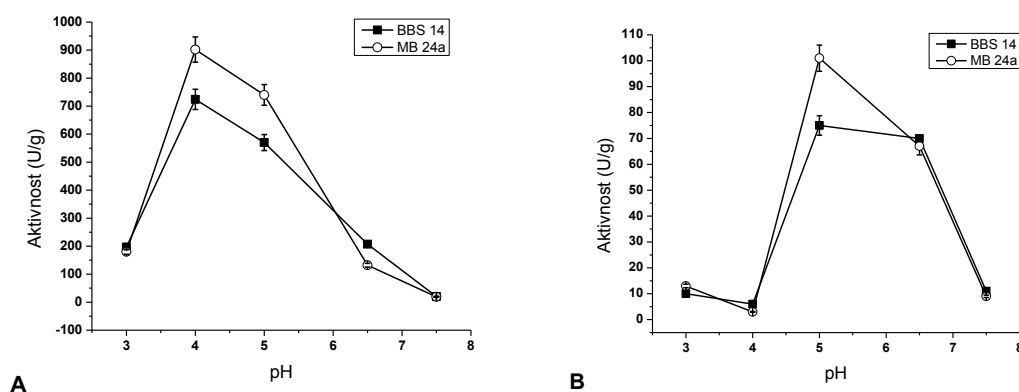


Slika 28. Filogenetska analiza sekvencija za 16S rDNA gena sojeva BBS14 i MB24a i druge srodne *Bacillus* vrste. Brojevi na mjestima grananja označavaju procenat “bootstrap sampling”, dobijenog od 1000 replika. *B.licheniformis* YW1258 je korišćen kao vangrupna vrsta (eng. outgroup), da bi se ukazalo na udaljenost prethodnog grananja evolutivnog stabla.

### 3.3.4 Karakterizacija lakaza

#### 3.3.4.1 Određivanje pH optimuma lakaza

Optimalna temperatura i pH vrijednost sredine su glavni limitirajući faktori za primjenu enzima u bilo kojoj grani biotehnologije, tako da je jedan od prvih koraka u provjeri podobnosti enzima za određenu primjenu, u ovom slučaju uklanjanje ksenobiotika, određivanje pH optimuma. On je određen za sojeve MB 24A i BBS 14. Rezultati su prikazani na slici 29.



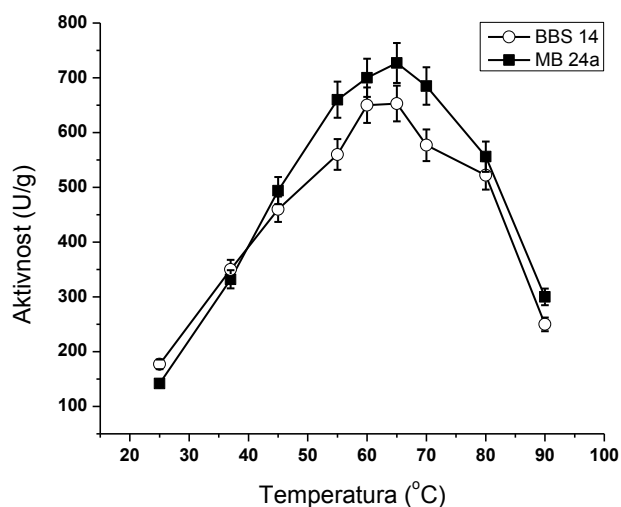
Slika 29. Ispitivanje zavisnosti aktivnosti lakaze od pH vrijednosti rastvora. Korišćeni su supstrati ABTS (A) i SGZ (B).

Sa grafika se vidi da se optimalno pH za aktivnost lakaza mijenja u zavisnosti od supstrata i iznosi 4 za ABTS, odnosno 6,5 za siringaldazin, što je u skladu sa

publikovanim podacima (Cho *et al.*, 2011; Koschorreck *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2002; Reiss *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Ovaj podatak nam govori da pH optimum određen za karakteristični supstrat ne može da nas uputi na pogodno pH za uklanjanje ksenobiotika, jer se radi o složenim strukturama sa jonizabilnim grupama koje o(ne)mogućavaju prilaz mjestu za vezivanje supstrata na površini enzima ili aktivnom mjestu enzima, pa je pH optimum potrebno empirijski odrediti. Optimizaciju procesa je moguće uraditi za pojedinačne, specifične slučajeve, mada to nije održiv način rada. Rješenje problema može se naći u upotrebi enzimskih koktela različitih pH i temperaturnih optimuma, kao i supstratnih specifičnosti.

### 3.3.4.2 Određivanje temperaturnog optimuma lakaza

Temperaturni optimum je određen u opsegu od 25-100°C pri čemu je korišćen supstrat ABTS. Rađeno je sa 0,1 M acetatnim puferom, pH 4 (optimalno pH). Rezultati za tri testirana soja su predstavljeni grafički na slici 30.



Slika 30. Zavisnost aktivnosti lakaza na sporama sojeva BBS14 i MB24A od temperature.

Temperaturni optimum lakaza je u slučaju sojeva BBS14 i MB24a 65°C, dok je u slučaju soja 12B1 znatno viši, 80-85°C. Temperaturni optimum lakaza iz raznih vrsti *Bacillus sp.* varira od 40 °C do 85 °C, a njihov pregled je dat u tabeli 6.

Tabela 6. Usporedni prikaz temperaturnih optimuma testiranih sojeva i literaturnih vrijednosti za srodne vrste.

Soj	temp.opt. (°C)	Forma enzima	Referenca
<i>Bacillus sp.</i> ADR	40	Ekstraćel. sekr.	Telke <i>et al.</i> , 2010
<i>B. sphaericus</i>	60	Spore	Claus i Filip 1997
<i>B.licheniformis</i> LS04	60	Spore	Lu <i>et al.</i> , 2011
<i>B. subtilis</i> WD23	60	Spore	Wang <i>et al.</i> , 2011
<b><i>B.amyloliquefaciens</i> BBS14</b>	<b>65</b>	<b>Spore</b>	<b><i>Ova disertacija</i></b>
<b><i>B.amyloliquefaciens</i> MB24a</b>	<b>65</b>	<b>Spore</b>	<b><i>Ova disertacija</i></b>
<i>B. pumilus</i>	70	Rekombinantni	Reiss <i>et al.</i> , 2011
<i>B. subtilis</i>	75	Spore i rekomb.	Martins <i>et al.</i> , 2002
<i>B.subtilis</i>	75	Rekombinantni	Pereira <i>et al.</i> , 2009
<i>B.subtilis</i> DB104	80	Spore (rekomb.)	Cho <i>et al.</i> , 2011
<b><i>B.amyloliquefaciens</i> 12B1</b>	<b>80</b>	<b>Spore</b>	<b><i>Ova disertacija</i></b>
<i>B.licheniformis</i> DSM13	85	Rekombinantni	Koschorreck <i>et al.</i> , 2008

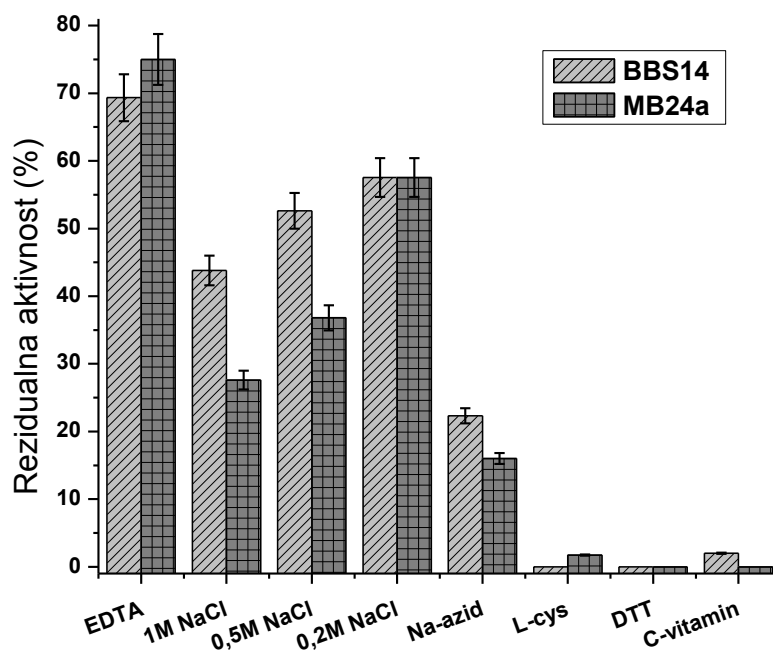
Za sojeve BBS 14 i MB 24a možemo zaključiti da pokazuju umjereno visoke temperaturne optimuma, a kako je vrijednost za najviši temperaturni optimum dobijena za soj *B.amyloliquefaciens* 12B1, on je odabran za kloniranje i ekspresiju lakaze u *E.coli*. Dalja karakterizacija spora ovog soja je urađena uporedo sa rekombinantno dobijenim enzimom (Poglavlje 3.4.4).

### 3.3.4.3 Ispitivanje dejstva inhibitora na aktivnost lakaza sojeva BBS14 i MB24a

Ispitivana su dejstva različitih reagenasa na aktivnost enzima. Za ispitivanje uticaja inhibitora korišćeni su klasični lakazni inhibitori: dinatrijum-etilendiamintetraacetat (Na<sub>2</sub>EDTA), L-cistein (L-cys), natrijum-azid (NaN<sub>3</sub>), ditiotreitrol (DTT), askorbinska kiselina i NaCl. Ovi reagensi heliraju Cu<sup>2+</sup> jone, modifikuju aminokiselinske ostatke i mijenjaju konformaciju enzima.

Finalne koncentracije inhibitora su bile 1 mM, osim EDTA (10 mM) i NaCl koji je ispitan u koncentracijama od 0,2, 0,5 i 1 M. Rađeno je na optimalnom pH za ABTS

(pH 4,0) i temperaturi od 37°C. Rezultati su prikazani na slici 31. kao procenat rezidualne aktivnosti u odnosu na kontrolu.



Slika 31. Uticaj inhibitora i različitih koncentracija NaCl na aktivnost lakaze.

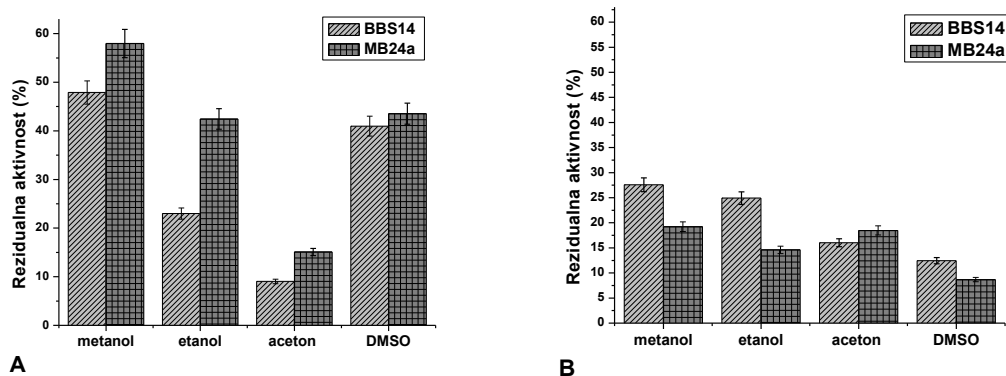
Rezultati pokazuju da su lakaze potpuno inhibirane prisustvom DTT, L-cys i askorbinske kiseline (slika 31). Jak inhibitorni efekat DTT, L-Cys i askorbinske kiseline odgovara ranije opisanim inhibitornim efektima na lakaze gljiva i bakterija (Forootanfar *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011; Telke *et al.*, 2010).

Kako je lakaza ukotvljena u omotač spore, koji se sastoji od velikog broja umreženih proteina (Hullo *et al.*, 2001), rezistentnost na dejstvo metalnih helatora (EDTA) se može objasniti sternom zaštitom jona bakra koji čine aktivna mjesta lakaze (Lu *et al.*, 2011). Lakazna aktivnost u prisustvu 10 mM EDTA je inhibirana 25% za soj MB24a i 30% za soj BBS14 (slika 31), što je uporedivo sa lakazom iz soja Bacillus ADR (Telke *et al.*, 2010) koja je inhibirana 30% u prisustvu dva puta manje koncentracije EDTA (5mM). Neki sojevi, poput *B.licheniformis* LS04 (Lu *et al.*, 2011) pokazuju potpunu rezistenciju na dejstvo EDTA (10mM), kao i lakaza 12B1 (odjeljak 3.4.4).

Proces industrijskog bojenja zahtjeva prisustvo elektrolita u rastvoru boje. Neutralni elektroliti poput NaCl su neophodni da bi se postiglo veliko iskorišćenje boje. U bojenju pamuka koncentracija NaCl se kreće od 25-30g/L (~0,5 M) za tamnije tonove i oko 15 g/L za svjetlije tonove, ali u nekim slučajevima može da bude i do 50 g/L (Fibre2Fashion, internet stranica). Jedna od glavnih prepreka za primjenu lakaza u tretmanu voda je rad u prisustvu velike koncentracije hlorida (Jimenez-Juarez *et al.*, 2005). Lakaza iz *B.licheniformis* LS04 (Lu *et al.*, 2011) ima relativnu aktivnost od 105% u prisustvu 0,5 M NaCl i 78% u prisustvu 1M NaCl. Slično, bakterijska lakaza klonirana iz morskog metagenoma zadržava početnu aktivnost u prisustvu 1M NaCl (Fang *et al.*, 2011), dok je većina lakaza iz gljiva inaktivirana NaCl u koncentracijama većim od 100 mM zbog njihove inherentne osjetljivosti ka halidima (Jimenez-Juarez *et al.*, 2005). Visoka rezistencija lakaze na sporama ka NaCl predstavlja prednost, jer efluenti iz tekstilne i sličnih industrija obično imaju visoki sadržaj soli (Fang *et al.*, 2011).

#### **3.3.4.4 Ispitivanje uticaja organskih rastvarača na aktivnost lakaza**

Kako se u otpadnoj vodi mogu naći neki organski rastvarači (prilikom proizvodnje boja ili ispuštanjem efluenta nakon bojenja „vat“ bojama, rastvornih u organskim rastvaračima), potrebno je ispitati uticaj organskih rastvarača na aktivnost lakaze. Druga industrijska primjena lakaze koja zahtjeva rezistentnost na organske rastvarače bila bi organska sinteza ili sinteza nekih farmaceutika. Od organskih rastvarača ispitan je uticaj acetona, metanola, etanola i dimetilsulfoksida (DMSO) pri finalnim koncentracijama od 25% i 50%. Smješa je po dodatku rastvarača inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi nakon čega je dodat ABTS (Wang *et al.*, 2011). Posle 10 min inkubiranja na 37°C, određena je rezidualna aktivnost. Rezultati su prikazani na slici 32. kao procenat rezidualne aktivnosti u odnosu na kontrolu.



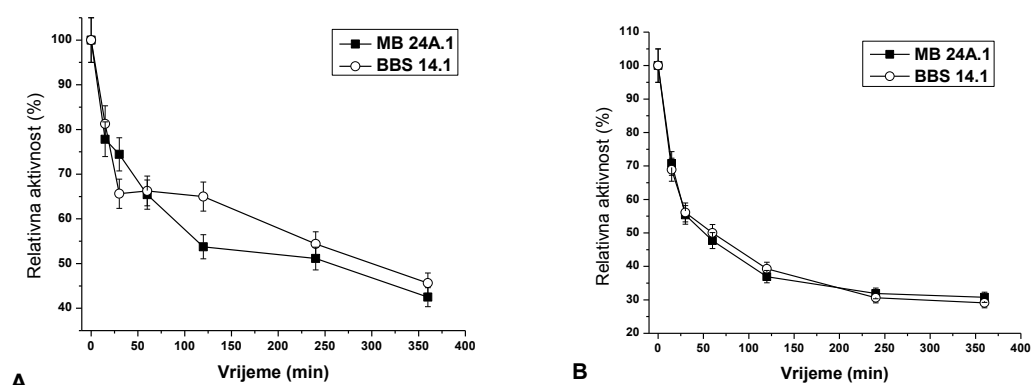
Slika 32. Ispitivanje uticaja organskih rastvarača na lakaznu aktivnost u koncentracijama od 25% (A) i 50% (B).

Nestabilnost lakaze (i uopšteno enzima) u organskim rastvaračima se pripisuje deformaciji proteinske strukture kao posledica hidrofobnog efekta ili zamjene molekula vode molekulima rastvarača u aktivnom mjestu enzima. Enzimske reakcije u prisustvu organskih rastvarača bi omogućile pristup u vodi nerastvornim supstratima, što bi pomoglo u detoksifikaciji mnogih otpornih zagađivača (Torres *et al.*, 2003).

Pokazano je da se neke bakterijske lakaze aktiviraju prisustvom organskih rastvarača pri koncentraciji od 20% (Lu *et al.*, 2011), dok je za neke pokazano da ih metanol snažno inhibira (Wang *et al.*, 2011). Lakaza soja MB24a pokazuje veću rezistenciju na dejstvo rastvarača pri koncentraciji od 25% u poređenju sa lakazom soja BBS14. Međutim, pri koncentraciji rastvarača od 50% lakaza BBS14 zadržava veći procenat početne aktivnosti.

#### 3.3.4.5 Temperaturna stabilnost lakaza

Temperaturna stabilnost enzima je važan parametar za industrijsku primjenu. Određena je temperaturna stabilnost lakaze na 50°C i 65°C. Zaostala aktivnost je određivana ABTS-om na pH 4. Rezultati su prikazani na slici 33.



Slika 33. Ispitivanje temperaturne stabilnosti lakaza na 50°C (A) i 65°C (B).

Vidi se da je vrijeme poluživota enzima na 50°C oko 4 časa, dok je na 65°C oko 1 čas, što lakaze ovih sojeva svrstava među umjereno termostabilne enzime.

### 3.3.5 Primjena lakaza u obezbojavanju

Za testiranje primjene cijelih spora sa lakaznom aktivnosti u obezbojavanju korišćene su boje indigo carmine (IC), Congo red (CR) i Reactive black 5 (RB 5). Koncentracija boja iznosila je 50 mg/mL. Testirano je obezbojavanje u zavisnosti od početnog pH. Step en obezbojavanja je prikazan u tabeli 7. Kao što se vidi testirane spore pokazuju visoku efikasnost u uklanjanju boje Congo red na blago kiselom i neutralnom pH, dok su boje Indigo carmin i RB5 slabo podložne dejstvu lakaza.

Tabela 7. Uticaj početnog pH rastvora na obezbojavanje testiranih boja sa lakazama na sporama sojeva MB24A i BBS 14.

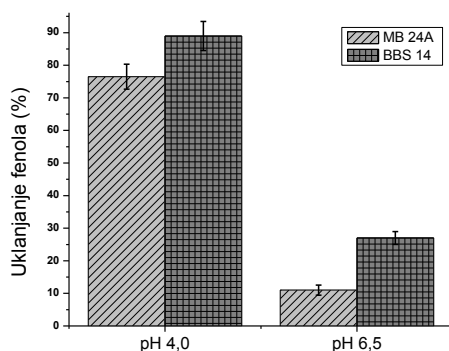
	$\lambda_{\max}$	C (mg/L)	% zaostale boje				
			pH 3,0	pH 4,5	pH 5,7	pH 6,5	pH 8,0
<b>MB 24A</b>							
Indigo carmine (IC)	610	50	74,67	99,39	97,05	98,22	86,53
Reactive black 5 (RB5)	603	50	53,14	94,32	98,85	100	100
Congo red (CR)	565/495	50	83,09	38,15	<b>13,83</b>	23,74	78,87
<b>BBS 14</b>							
Indigo carmine (IC)	610	50	72,39	100	99,06	95,94	76
Reactive black 5 (RB5)	603	50	52,36	92,8	98,49	100	99,03
Congo red (CR)	565/495	50	85,81	19,26	<b>12,47</b>	23,27	73,59



Najveća efikasnost za Congo red je dobijena pri pH 5,7 i iznosi nešto više od 85% obezbojenja, tj. zaostaje 13-14% boje u rastvoru.

### 3.3.6 Primjena lakaza za uklanjanje fenola

Testirana je mogućnost lakaza da uklanjaju fenol u prisustvu 0,5 mM ABTS-a kao medijatora (Kurniawati i Nicell, 2007). Uklanjanje fenola je testirano pri koncentraciji od 25 mg/L na pH 4 i 6 nakon 6 sati inkubiranja. Rezultati su prikazani na slici 34.



Slika 34. Uklanjanje fenola (25 mg/L) na pH 4 i 6,5 sa ABTS medijatorom (0,5mM).

Procenat uklanjanja je veći na pH 4 u odnosu na pH 6. Slični podaci su publikovani u literaturi, gdje je uklanjanje fenola u prisustvu ABTS-a bolje pri kiselim uslovima (pH 3-6) (Kurniawati i Nicell, 2007). Testirano je i uklanjanje fenola pri većim koncentracijama fenola (50 mg/L i 100 mg/L) nakon 20 časova inkubiranja, na pH 4. Rezultati su prikazani na Tabeli 8. Testirane lakaze su postigle uklanjanje fenola u prisustvu ABTS-a kao medijatora, naročito pri ekvimolarnoj i višoj koncentraciji medijatora. Test sa 100  $\mu$ M ABTS-om nije dao rezultat (nije prikazano), što se slaže sa literaturnim podacima, gdje je pokazano da se fenoli bolje uklanjaju pri ekvimolarnim i većim koncentracijama medijatora u odnosu na fenol (Kurniawati i Nicell, 2007).

Tabela 8. Uklanjanje fenola pri koncentracijama od 50 i 100 mg/L fenola i 0,5 mM medijatora (ABTS).

Konc.fenola (mg/L)	uklanjanje fenola (%)	
	MB 24A	BBS 14
50	47.0	42.5
100	31.0	35.5

### 3.4 Uklanjanje ksenobiotika rekombinantno proizvedenom lakazom iz soja *B.amyloliquefaciens* 12B1 eksprimiranoj u *E. coli* BL21

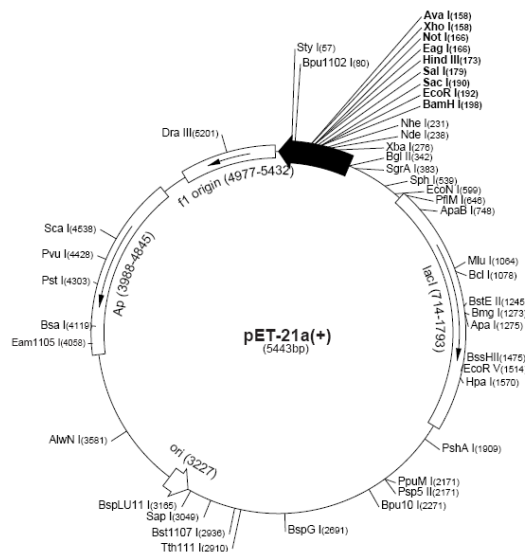
Zahvaljujući visokom redoks potencijalu bakra tipa I, lakaze iz gljiva imaju mnogo prednosti za komercijalnu primjenu u odnosu na biljne i bakterijske enzime. Međutim, enzimi iz gljiva imaju i nekoliko nedostataka, kao što su spori rast gljiva, a time i spora produkcija i poteškoće u kontrolisanju glikozilovanja pri rekombinantnoj produkciji (Rodgers *et al.*, 2010). Zbog toga je u okviru ove disertacije ispitana mogućnost rekombinantne produkcije lakaze kloniranjem Lacc gena iz soja *B.amyloliquefaciens* 12B1 za čiju je lakazu iz omotača spora pokazano da ima temperaturni optimum 80°C (Poglavlje 3.4.4). Sa aspekta isplativosti redizajniranja enzima, bakterijske lakaze iz roda *Bacillus* (Hullo *et al.*, 2001; Koschorreck *et al.*, 2008) su pogodnije za genetske manipulacije od lakaza iz gljiva (Koschorreck *et al.*, 2009). Sem toga, bakterijske lakaze pokazuju veću termostabilnost, između ostalog i zato što su asocirane sa omotačem spore (Martins *et al.*, 2002). Bakterijski ekspresioni sistemi i tehnike dirigovane evolucije su dobro razvijeni, pa bakterijske lakaze mogu da posluže kao model sistem za razvijanje procesa obezbojavanja, delignifikacije i uklanjanje ksenobiotika iz otpadne vode.

Lakaza prirodno imobilizovana na sporama *Bacillus sp.* ima prednost da ne zahtjeva dodatne korake za imobilizaciju i pokazuje veliku stabilnost, ali ipak u ovom obliku nije potpuno primjenjiva za tretman otpadnih voda. Sporulacija zahtjeva gajenje bakterija na sporulacionoj podlozi nekoliko dana, a prinos enzimske aktivnosti je mali. Mogućnost prelaska spora u vegetativni oblik, a samim tim i prestajanje postojanja

lakazne aktivnosti i nekontrolisan rast bakterija u otpadnoj vodi su dodatni razlozi za rekombinantnu produkciju lakaza. Sa ciljem dobijanja željenog enzima u većoj količini, korisno je proizvoditi enzime iz *Bacillus sp.* u poznatom bakterijskom domaćinu. Za ove svrhe, *E. coli* je najjednostavniji i jedan od najčešće korišćenih mikroorganizama (Baneyx i Mujačić, 2004, Puertas i Betton, 2009). *E. coli* ekspresioni sistem se dugo koristi za produkciju aktivnih enzima i unutarćelijski i vanćelijski (Baneyx, 1999, Pines, 1999). Zbog toga je u okviru ove disertacije razvijena proizvodnja rekombinantne lakaze kloniranjem Lacc gena u ekspresioni vektor pET21a i heterologom u *E. coli*. Tako proizvedeni rekombinantni enzim je okarakterisan i ispitana je njegova primjena u uklanjanju ksenobiotika.

### 3.4.1 Kloniranje Lacc gena u ekspresioni vektor pET21a

Ekspresioni pET sistem je razvijen za potrebe kloniranja i ekspresije rekombinantnih proteina u *E. coli*. Ciljani geni se kloniraju u pET plazmide (slika 35) pod kontrolom jakih bakteriofagnih T7 transkripcionih i (opciono) translacionih signala; ekspresija se indukuje obezbjeđivanjem izvora T7 RNA polimeraze u ćeliji domaćinu. T7 RNA polimeraza je selektivna i aktivna toliko da, kada je potpuno indukovana, skoro svi resursi ćelije se aktiviraju za potrebe ekspresije ciljnog gena. U izuzetnim slučajevima, željeni produkt čini i do 50% ukupnih ćelijskih proteina nekoliko sati nakon indukcije. Nivo ekspresije je moguće umanjiti jednostavnim smanjenjem doze inducera, čime se povećava prinos solubilnog proteina. Važna prednost pET sistema je mogućnost da održi gen transkripciono tihim kada inducer nije prisutan. Gen od interesa se prvo klonira korišćenjem sojeva koji ne sadrže gen za T7 RNA polimerazu, tako eliminišući nestabilnost plazmida koja je posledica produkcije proteina potencijalno toksičnih za ćeliju. Kad se potvrdi uspješno kloniranje ciljanog gena u pET plazmid u ne-ekspresionom domaćinu, moguće je indukovati ekspresiju na dva načina. Jedan je inficiranje domaćina sa  $\lambda$ CE6, fagom koji nosi gen za T7 RNA polimerazu pod kontrolom  $\lambda pL$  i  $pI$  promotora, a drugi (danas mnogo češći) način je transfer plazmida u ekspresioni soj koji sadrži hromozomsku kopiju T7 RNA polimeraznog gena pod *lacUV5* kontrolom. U drugom slučaju, ekspresija se indukuje dodatkom izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) u bakterijsku kulturu (Sambrook i Russell, 2001).



Slika 35. Mapa pET21a vektora sa uvećanim mjestom za kloniranje inserta.

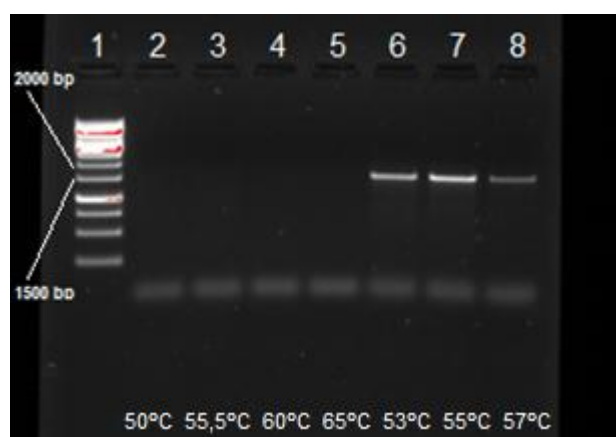
Pvi korak u kloniranju je bio izolovanje hromozomske DNA iz prekonocne kulture *B.amyloliquefaciens* 12B1 koja je korišćena kao DNA templat. Za umnožavanje gena za lakazu PCR reakcijom korišćeni su prajmeri dizajnirani prema lakazi iz *B.amyloliquefaciens* DSM7 iz NCBI baze podataka (Gene ID: 9780652), kao i prajmeri za lakazu iz *B.licheniformis* (Koschoreck, 2008). Korišćeni prajmeri sa dodatim nukleotidima za kasniju digestiju restrikcionim enzimima i optimizovana aniling temperatura su dati su tabeli 9.

Tabela 9. Lista prajmera korišćenih u eksperimentima umnožavanja DNA fragmenta. Podvučeni nukleotidi su mjesta prepoznavanja od strane restrikcionih enzima.

Ime prajmera	Sekvencija	Restr. enzim	Referenca
Kosc Fw	CGGTGCATATGAAACTTGAAAAATTCGTTGACCGGC	NdeI	Koschorreck, 2008.
Kosc Rev	CGTCGAATTCCTTATTGATGACGAACATCTGTCACTTC	EcoRI	Koschorreck, 2008.
CotA Fw	GCA <u>CAT ATG</u> ATG GCA CTT GAA AAA TTT GC	NdeI	<i>Ova disertacija</i>
CotA Rev	ACT <u>GAA TTC</u> TTA CTG CTT TTC TGT GAC GTC	EcoRI	<i>Ova disertacija</i>

Reakcioni uslovi za PCR su optimizovani korišćenjem *Taq* DNA polimeraze (porijeklom iz *Thermus aquaticus*) (DreamTaq, Fermentas) po uputstvu proizvođača. PCR reakcije su urađene korišćenjem gradijent PCR aparata. Vrijeme trajanja polimerizacije, tj. elongacije zavisi od dužine produkta i iznosi otprilike 1min/kbp za *Taq* polimerazu i 2min/kbp za *Pfu* polimerazu (Sambrook i Russell, 2001). Nakon optimizacije reakcionih uslova, polimerizacija je rađena sa *Pfu* polimerazom (Fermentas), koja daje PCR proizvod sa slijepim krajevima. Ove polimeraze posjeduju „proofreading” aktivnost, pa je vjerovatnoća unošenja greške mnogo manja u odnosu na *Taq* DNA polimerazu.

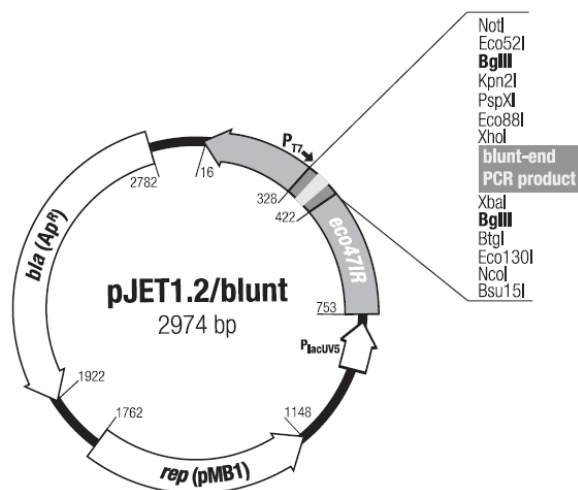
Prilikom optimizovanja PCR reakcije urađeno je testiranje različitih aniling temperatura korišćenjem gradijent PCR mašine. Dobijeni su PCR proizvodi korišćenjem novodizajniranih prajmera; fragmenti odgovaraju masi između 1,5-2 kbp (slika 36). Sa slike 36. se uočava da prajmeri za lakazu iz *B.licheniformis* ne daju proizvod ni na jednoj od četiri različite testirane aniling temperature (50, 55,5, 60 i 65°C), dok prajmeri dizajnirani na osnovu pretpostavljenog gena iz soja *B.amyloliquefaciens* DSM7 daju najintenzivniju traku kada se za annealing temperaturu uzme 55,0°C (položaj 7 na gelu), dok za temperature 53,0°C i 57,0°C daju trake slabijeg intenziteta (položaji 6 i 8 na gelu). U daljem radu korišćen je program sa temperaturom hibridizacije prajmera na 55,0°C.



Slika 36. Elektroforetska analiza dobijenih PCR fragmenata korišćenjem dva para prajmera za lakazu (molekulski markeri – traka 1; PCR reakcija sa Kosc Fw/Kosc Rev prajmerima – trake 2-5; PCR reakcija sa CotA Fw/CotA Rev prajmerima – trake 6-8).

Za potrebe kloniranja u pET21a ekspresioni vektor potrebno je proizvesti PCR proizvod sa lepljivim krajevima kako bi se favorizovala reakcija ligacije sa T4 DNA ligazom. Lepljivi krajevi se dobijaju digestijom PCR proizvoda i vektora sa restrikcionim enzimima. U ovoj disertaciji korišćen je pristup direkcionog kloniranja, tj. korišćena sa dva različita restrikciona enzima koja daju različite lepljive krajeve čime se izbjegava da se fragment insertuje u vektor u pogrešnoj orijentaciji. Digestija PCR proizvoda restrikcionim enzimima je često problematičan korak u kloniranju, jer restrikcioni enzimi pokazuju daleko manju efikasnost na PCR proizvodu u odnosu na plazmid (Sambrook i Russell, 2001). Zbog toga je u ovoj disertaciji korišćen postupak subkloniranja, tj. kloniranja fragmenata umnoženih *Pfu* ili KOD polimerazom (koje daju slijepo krajeve) u linearizovani vektor sa slijepim krajevima nakon čega je urađena digestija restrikcionim enzimima.

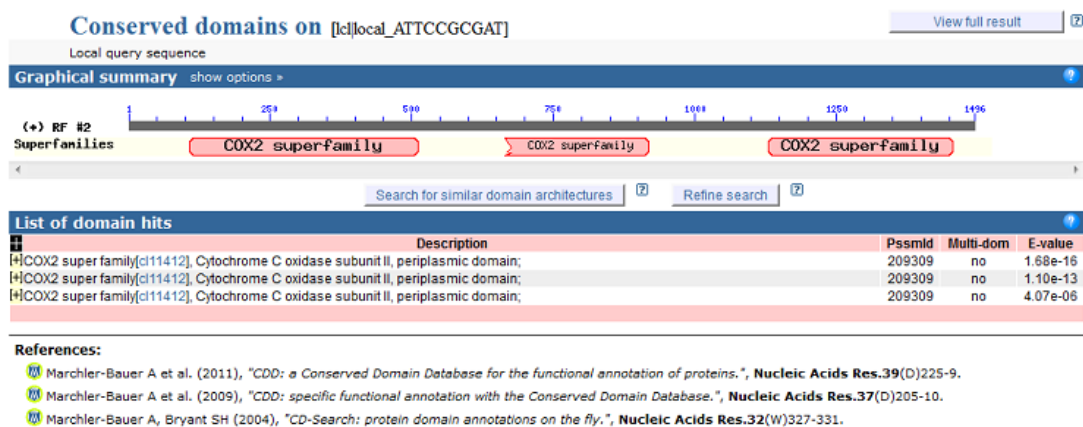
Umnoženi Lacc fragmenti su klonirani u pJET1.2/blunt vektor koji je zatim korišćen za transformaciju *E. coli* Top10 ćelija. Vektor pJET1.2/blunt (slika 37) je linearizovani vektor za kloniranje koji prihvata inserte od 6 bp do 10 kbp. PCR produkti sa slijepim krajevima dobijeni nekom od „proofreading” DNA polimeraza mogu direktno da se koriste za ligaciju. Svi standardni sojevi *E. coli* mogu da se transformišu ovim vektorom. Recirkulisani pJET1.2/blunt vektor eksprimira letalni restrikcioni enzim nakon transformacije. Rezultat toga je da samo rekombinantni klonovi koji sadrže željeni insert rastu na selektivnom medijumu.



Slika 37. Mapa pJET1.2/blunt vektora sa uvećanim mjestom za insertovanje PCR produkta.

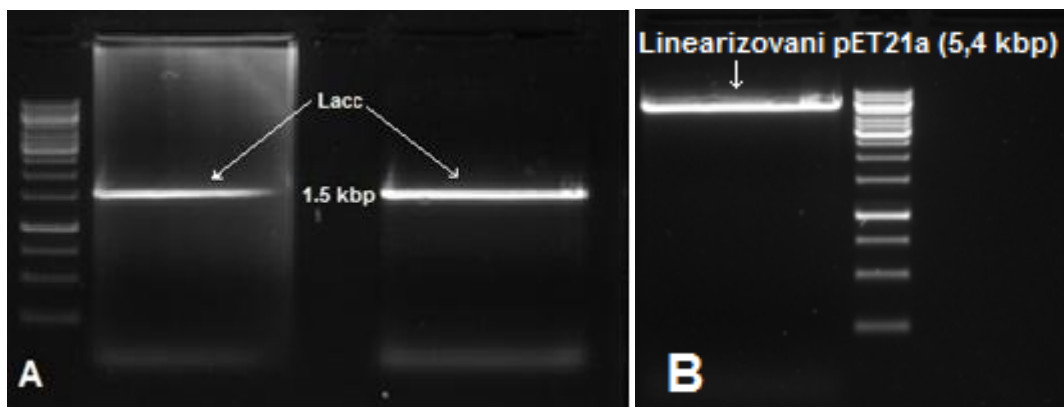
Transformisane ćelije su zasijane na selekcionu podlogu sa ampicilinom. Pozitivni klonovi su odgajeni u prekonocnim kulturama i iz njih je izolovan plazmid korišćenjem komercijalnog kita. Urađena je provjera prisustva gena u plazmidu tako što je nakon dvostruke restrikcione digestije sa parom enzima EcoRI/NdeI reakciona smješa elektroforetski analizirana. Plazmidi koji su bili pozitivni na prisustvo inserta od 1,5 kbp su sekvencirani. Analizom dobijene sekvencije potvrđeno je da klonirani gen kodira lakazu koja ima najviše sličnosti sa genima za lakazu drugih sojeva *B.amyloliquefaciens* (slika 2).

Korišćenjem alatke “Konzervirani Domeni” dostupnoj na NCBI serveru (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) urađena je analiza dobijene sekvencije za lakazu i time je potvrđena pripadnost Citohrom C oksidaznoj superfamiliji, odnosno prisustvo tri konzervirana domena karakteristična za Cu-oksidaze (slika 38).



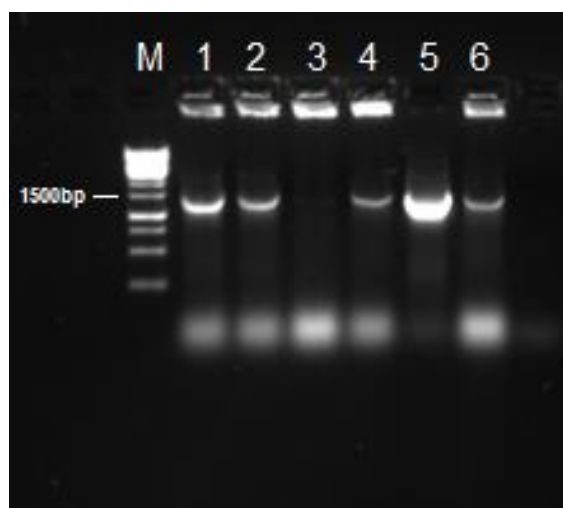
Slika 38. Poređenje sekvencije dobijenog Lacc gena sa NCBI bazom podataka i korišćenje programskog paketa za pronalaženje konzerviranih domena. Dobijeni rezultat pokazuje da klonirani gen kodira enzim koji pripada COX2 superfamiliji proteina. Slika je dobijena korišćenjem Conserved domains search alatke NCBI servisa (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

Za potrebe kloniranja u ekspresioni vektor izolovani plazmid pJET1.2-Lacc je digestovan parom restrikcioni enzima NdeI/EcoRI. Reakciona smješa je elektroforetski razdvojena, pa je traka koja odgovara genu za lakazu ekstrahovana iz gela. Istim parom restrikcioni enzima digestovan je i vektor pET21a, koji je takođe prečišćen elektroforezom i ekstrakcijom iz gela (slika 39).



Slika 39. Restrikciona digestija Lacc gena i pET21a da bi se dobili “lepljivi krajevi” neophodni za ligaciju T4 DNA ligazom.

Urađena je ligacija Lacc gena i linearizovanog pET21a vektora korišćenjem T4 DNA ligaze. Ligaciona smješa je korišćena za transformaciju elektrokompetentnih *E.coli* TOP10 ćelija. Nakon selekcije pozitivnih klonova na LBamp pločama i ColonyPCR provjere prisustva inserta, urađeno je izolovanje plazmida i ekspresionim vektorom pET21a-Lacc transformisane su *E. coli* BL21 ćelije. Dobijeni klonovi su provjereni selekcijom na LBamp pločama, kao i ColonyPCR metodom (slika 40).



Slika 40. ColonyPCR provjera pozitivnih klonova *E. coli* BL21 pET21a-Lacc.



### 3.4.2 Ispitivanje ekspresije rekombinantne lakaze

Pet pozitivnih klonova *E. coli* BL21 pET21a-Lacc je testirano da bi se uporedili nivoi ekspresije lakaze. Korišćen je 0,25 mM IPTG za indukciju ekspresije kada kultura dostigne OD ~1, pri čemu je dodavan i 2 mM CuSO<sub>4</sub> (finalna koncentracija) da bi se omogućilo dobijanje nativnog enzima (Koschorreck, 2009). Nakon liziranja ćelijskog taloga ultrazvukom urađeno je određivanje lakazne aktivnosti i potvrđeno da klon 5 ima najveći nivo ekspresije (Tabela 10), što odgovara rezultatima dobijenim u ColonyPCR eksperimentima (slika 40).

Tabela 10. Poređenje aktivnosti lakaze produkovane različitim klonovima.

Oznaka klona	Relativna aktivnost (%)
1	46,43
2	67,86
4	64,28
5	100,00
6	53,57

#### 3.4.2.1 Ispitivanje uticaja koncentracije Cu<sup>2+</sup> jona na ekspresiju lakaze

Ekspresija rekombinantne lakaze se pospješuje dodatkom egzogenog bakra i smanjenjem temperature (Koschorreck *et al.*, 2008). Pokazano je da je samo jedan dio eksprimiranog enzima katalitički aktivan, vjerovatno zbog nedovoljne intraćelijske koncentracije bakra (Koschorreck *et al.*, 2008). Povećanje intraćelijske koncentracije bakra dodatkom egzogenog bakra je ograničeno toksičnim efektom bakra. Za neke bakterijske rekombinante lakaze moguće je uraditi rekonstituisanje neaktivnog enzima inkubiranjem sa jonima bakra ili dijalizom prema rastvoru koji sadrži jone bakra (Li *et al.*, 2007), a za neke druge poput CotA iz *B.licheniformis* to nije moguće (Koschorreck *et al.*, 2008). U ovom radu ispitan je uticaj koncentracije dodatih Cu<sup>2+</sup> jona prilikom indukcije ekspresije IPTG-om. Ispitan je uticaj dodatih Cu<sup>2+</sup> jona u opsegu 0,2–4 mM, pri čemu je najveća pokazana razlika između najmanje (0,2 mM) i najveće korišćene

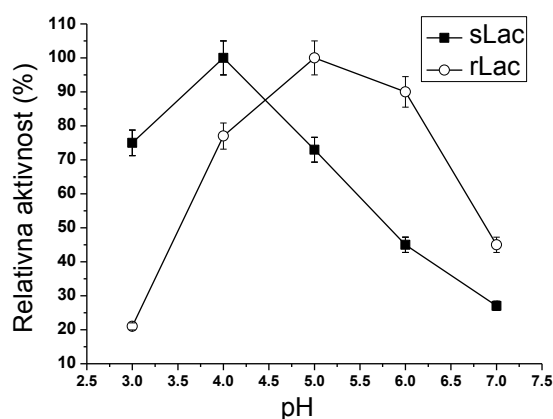
(4,0 mM) koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$  jona – dobijeno je dvostruko povećanje enzimске aktivnosti. Nasuprot Koschorreck *et al.* (2008) rezultatima gdje je dodati bakar toksičan u koncentracijama većim od 2 mM, u našem slučaju najveća aktivnost dobijena je korišćenjem 4 mM  $\text{CuSO}_4$ .

### 3.4.3 Izolovanje i prečišćavanje rLac iz *E. coli* BL21 pET21a-Lacc

Rekombinantna lakaza je djelimično prečišćena homogenizacijom ćelijskog taloga ultrazvukom, rasoljavanjem i jednim hromatografskim korakom na koloni Q-Sepharose, čime je postignuto uklanjanje ćelijskih komponenti koje bi mogle da interferiraju u eksperimentima obezbojavanja. Aktivne frakcije su spojene i koncentrovane liofilizacijom i naknadnim rastvaranjem. Ovako pripremljen preparat lakaze je korišćen za dalju karakterizaciju lakaze i eksperimente uklanjanja ksenobiotika. Koristeći ABTS supstrat, određena je aktivnost poluprečišćene lakaze i ona iznosi 0,235 U/mL, što približno odgovara aktivnosti referentnog enzima, lakaze iz *T.versicolor* (0,291 U/mL).

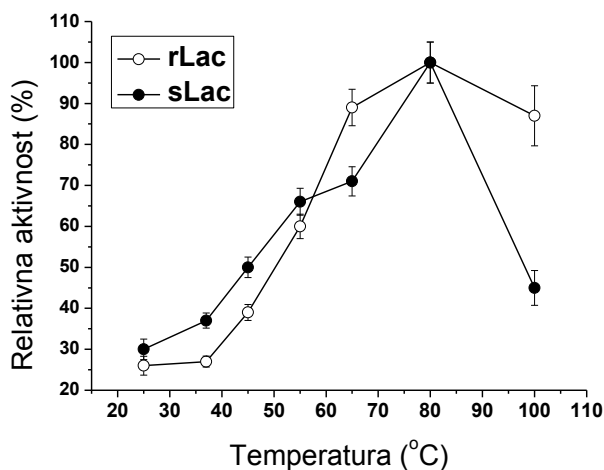
### 3.4.4 Određivanje biohemijskih parametara korišćenih lakaza

Kao što je napomenuto u odjeljku 3.3.4.1, prije moguće primjene enzima za potrebe biotehnologije, neophodno je odrediti im pH i temperaturni otpimum. Određeni su parametri za lakaze na sporama soja 12B1 (sLac) i rekombinantno dobijene lakaze kloniranjem gena koji kodira lakazu iz soja *B.amyloliquefaciens* 12B u *E. coli* Bl 21 (rLac), kao i za referentnu lakazu iz gljive *Trametes versicolor* (TvLac) i za rekombinantnu hloroperoksidazu (CPO) iz gljive *Caldariomyces fumago* proizvedenoj u *Aspergillus niger*. Za sLac i TvLac pH optimum iznosi 4,0, dok je pH optimum za rLac pomjeren u odnosu na nativni enzim za čitavu pH jedinicu i iznosi 5,0, mada je manje definisan i kreće se u intervalu 4-6, sa maksimum na pH 5 (slika 41). Ovo može biti posledica drugačijeg ponašanja lakaze kada se ne nalazi ukotvljena u proteinski omotač spore.



Slika 41. Ispitivanje pH optimum rekombinantno proizvedene lakaze (rLac) i lakaze na sporama soja 12B1 (sLac).

Temperaturni optimumi sLac i rLac značajno odudaraju od temperaturnih optimuma TvLac i CPO. Temperaturni optimum za CPO je 35 °C (<http://www.brenda-enzymes.info>), a za TvLac se kreće oko 50°C, dok je temperaturni optimum za sLac i rLac 85°C.

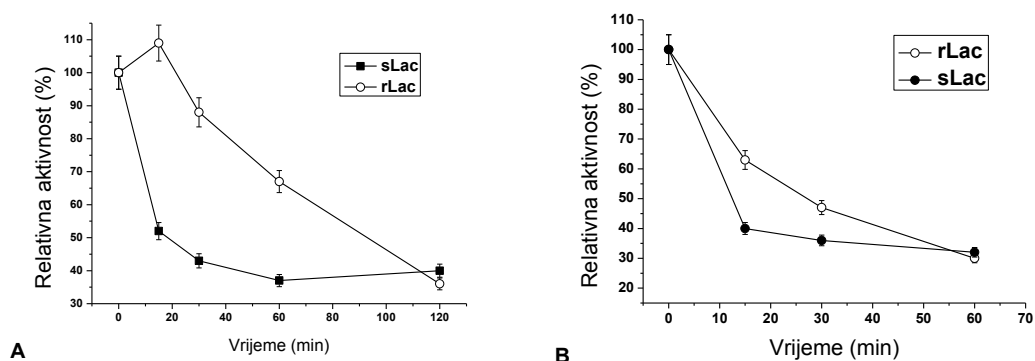


Slika 42. Ispitivanje zavisnosti enzimske aktivnosti od temperature rekombinantno proizvedene lakaze (rLac) i lakaze na sporama soja 12B1 (sLac).

Iako sLac i rLac imaju približno iste profile zavisnosti aktivnosti od temperature (slika 42), uočava se da rLac pokazuje veću aktivnost na 100°C.

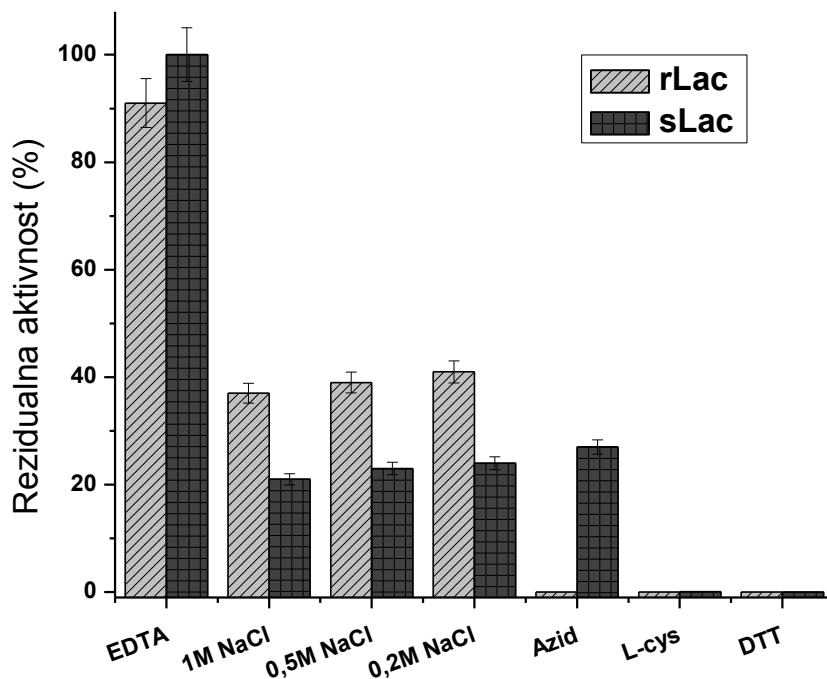
Po pitanju temperaturne stabilnosti, kod TvLac i CPO dolazi do potpune inaktivacije enzima već nakon inkubiranja od 15 min na 50°C, dok je polужivot rLac

mnogo duži kako na 50°C (nije prikazano), tako i na 65°C i 80°C (slika 43). Poluživot lakaze iz soja 12B1 se poklapa sa poluživotom lakaze na sporama prirodnog izolata *Bacillus* SF (Held *et al.*, 2005). Temperaturna stabilnost rLac je mnogo veća u odnosu na sLac. Na slici 43A uočava se blaga aktivacija rLac na početku inkubiranja na 65°C, nakon čega slijedi pad aktivnosti. Proteinski omotač prividno smanjuje aktivnost sLac, pa je porast aktivnosti na početku inkubacije moguće objasniti konformacionim promjenama u proteinskom omotaču koje za kratko vrijeme omogućavaju veći kontakt enzim-supstrat (Martins *et al.*, 2002), nakon čega dolazi do denaturacije proteina. Iz ovih eksperimenata ne možemo da kažemo da li rLac zaista ima veću termostabilnost ili je sLac prividno manje termostabilan zbog denaturacije proteinskog omotača koji kolabira i onemogućuje kontakt sLac i supstrata. Visoka termostabilnost rLac bi mogla da omogući njenu upotrebu za direktan tretman toplih efluenata odmah nakon ispuštanja (kod bojenja direktnim bojama), što bi omogućilo povratak vruće vode u proces, a samim tim i značajnu uštedu energije.



Slika 43. Temperaturna stabilnost rekombinantno proizvedene lakaze (rLac) i lakaze na sporama soja 12B1 (sLac). (A) 65 °C, (B) 80 °C.

Uticaj inhibitora je ispitivan pod istim uslovima koji su opisani u odjeljku 3.3.4.3. Na slici 44. dat je uporedni prikaz rezultata dobijenih za sLac i rLac. Testirani enzimi pokazuju izuzetnu rezistenciju na dejstvo 10 mM EDTA, 90% za rLac i 100% rezidualne aktivnosti za sLac. Među publikovanim podacima, samo lakaza soja *B.licheniformis* LS04 (Lu *et al.*, 2011) pokazuju isti stepen rezistencije na EDTA.



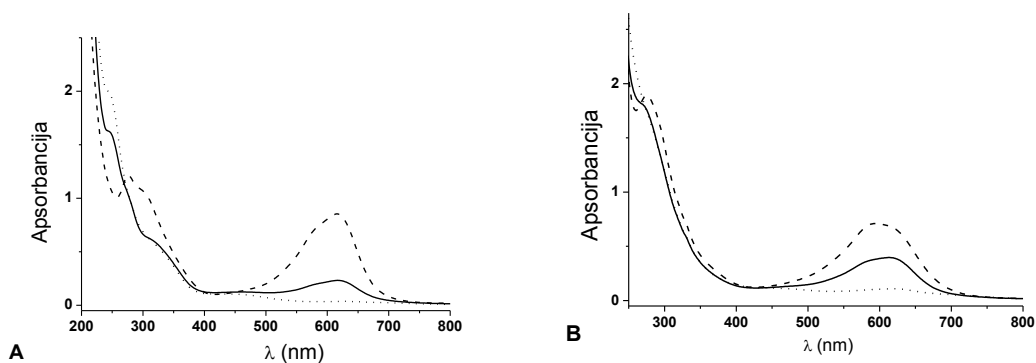
Slika 44. Ispitivanje uticaja inhibitora i različitih koncentracija hloridnih jona (NaCl) na aktivnost rekombinantno proizvedene lakaze (rLac) i lakaze na sporama soja 12B1 (sLac).

U odnosu na lakaze sojeva BBS14 i MB24a, sLac i rLac pokazuju manju rezistenciju na velike koncentracije hloridnih jona, pri čemu rLac zadržava ~40% aktivnosti, dok sLac zadržava 20-30% aktivnosti. Pokazana je potpuna inhibicija L-cisteinom i ditiotreitolom, kao i za lakaze sojeva BBS14 i MB24a. Međutim, sLac pokazuje specifičnu osobinu-rezistenciju na inhibiciju azidnim jonom, dok pri istoj koncentraciji lakaza koju opisuju Lu *et al.* (2011) zadržava samo 23% aktivnosti.

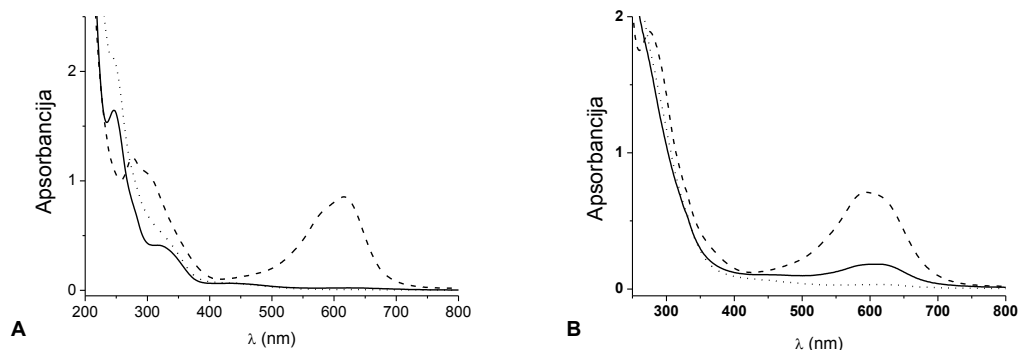
### 3.4.5 Primjena rekombinantno proizvedene lakaze u obezbojavanju

U ovim eksperimentima korišćena je djelimično prečišćena rekombinantno proizvedena lakaza i referentna lakaza iz *T.versicolor* proizvedena fermentacijom na sladnom ekstraktu. Kako se radi o ekstracelularnom enzimu, on nije prečišćen, već je koncentrovan 10x, liofilizacijom i naknadnim rastvaranjem. Enzimske aktivnosti su iznosile 0,235 U/mL za rLac i 0,291 U/mL za TvLac. Korišćene su boje RB52, RG15 i

PDB pri koncentraciji boje od 50 mg/L, a ispitivan je uticaj pH na efikasnost obezbojavanja na 37°C sa mućkanjem na 150 o/min. Već nakon 1 časa primjećuje se nestanak boje u rastvorima PDB i RB52. Snimljeni su UV-Vis spektri, a najbolji rezultati koji su dobijeni su prikazani na slikama 45 i 46.



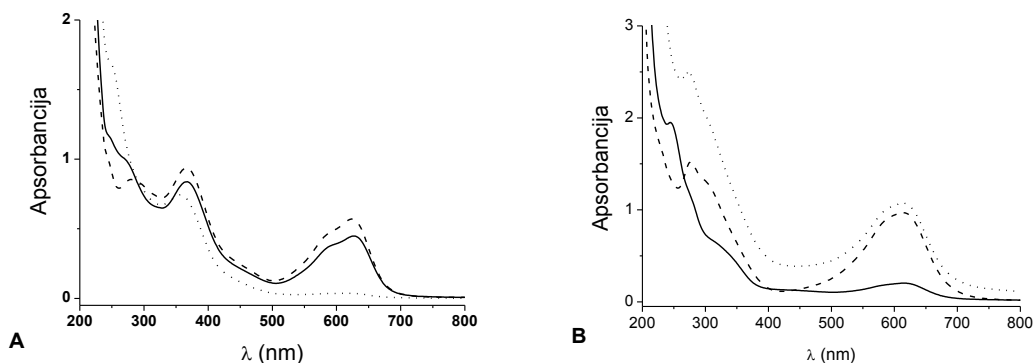
Slika 45. UV/Vis spektri boja RB52 (A) i PDB (B) snimljeni nakon tretmana lakazama u toku 1h na pH 4,0. Kontrola (isprekidana linija), uzorak tretiran rLac (puna linija), uzorak tretiran TvLac (tačkasta linija).



Slika 46. UV/Vis spektri boja RB52 (A) i PDB (B) snimljeni nakon tretmana lakazama u toku 20h na pH 4,0. Kontrola (isprekidana linija), uzorak tretiran rLac (puna linija), uzorak tretiran TvLac (tačkasta linija).

Rekombinantna lakaza, za razliku od lakaze iz *T.versicolor* nije bila u stanju da obezboji boju RG15 na pH 4 (slika 47A). Međutim, ono što je zanimljivo je rezultat koji je dobijen na pH 7, pri čemu lakaza iz *T.versicolor* nije mogla da oksiduje boje RB52 i PDB, a rLac je oksidovala sa približno istom efikasnošću kao i na pH 4 (prikazan je spektar samo za eksperiment sa RB52, slika 47B). Ovo je još jedan od podataka koji

govori u prilog bakterijskim lakazama, jer iako je nivo produkcije ovih enzima znatno manji u odnosu na gljivne, ipak razlike u supstratnoj specifičnosti i pH i temperaturnim optimumima mogu omogućiti ovim enzimima primjenu tamo gdje to nije moguće uraditi sa gljivnim enzimima, a to je upravo na neutralnom i nešto baznijem pH.



Slika 47. UV/Vis spektri boja RG15 (A) i RB52 (B) snimljeni nakon tretmana lakazama u toku 20h na pH 7,0. Boja RG15 je tretirana na pH 4, a RB52 na pH 7. Kontrola (isprekidana linija), uzorak tretiran rLac (puna linija), uzorak tretiran TvLac (tačkasta linija).

### 3.5 Uklanjanje ksenobiotika peroksidazom iz rena (*Armoracia rusticana*)

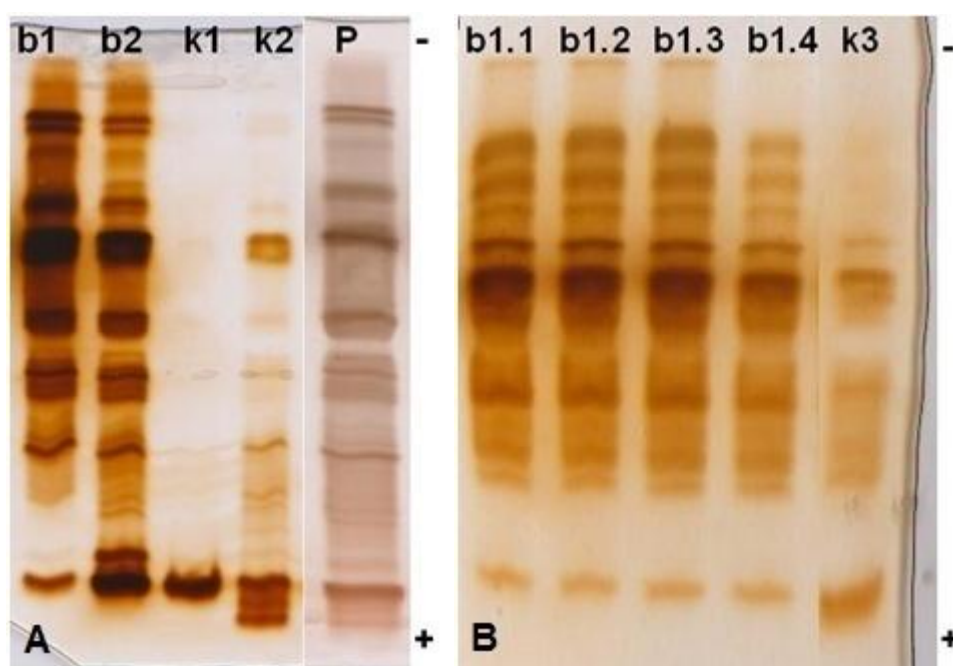
#### 3.5.1 Hromatografsko frakcionisanje izoformi peroksidaze

Kako se za potrebe komercijalne upotrebe HRP (dijagnostika, imuno esej, obilježavanje proteina i sl.) koristi bazna izoforma HRP, jedan od ciljeva ovog rada bio je testiranje baznih i kiselih izoformi kako bi se našla moguća primjena kiselih izoformi HRP (koje se u procesu prečišćavanja HRP-C izoforme odbacuju). Dobijeni podaci mogu da budu zanimljivi i sa aspekta fundamentalne enzimologije, jer pokazuju različitu supstratnu specifičnost ovih izoenzima i ukazuju na to da se vjerovatno mjesta za vezivanje supstrata razlikuju, a moguće je i da zbog različitog stepena glikozilacije pristup supstratu nije isti.

Preparat peroksidaze dobijen po ranije opisanoj proceduri (Vujčić, 2002) je rasoljen na koloni Sephadex-a G 25. Rasoljeni uzorak je frakcionisan na koloni XK 16/10 Q-Sepharose FF, ekvilibriranoj u 5 mM natrijum fosfatnom puferu pH 7,1  $\chi=594$

$\mu\text{S}/\text{cm}^2$ . Sakupljena je nevezana frakcija, a vezane peroksidaze su eluirane 0,5 M NaCl u istom puferu.

Dobijene frakcije su analizirane izoelektričnim fokusiranjem (IEF) u pH gradijentu od 3 do 10, na poliakrilamidnom gelu. Razdvojene peroksidaze su detektovane zimogramski reakcijom sa gvajakolom i vodonik peroksidom. Peroksidaze se uočavaju kao braon obojenje na IEF gelu, a intenzitet boje odgovara zastupljenosti odgovarajućih izoformi (slika 48). Na osnovu rezultata zimograma frakcionisanih peroksidaza iz početnog preparata može se zaključiti da je frakcija k1 kisele peroksidaze zadovoljavajuće prečišćenosti (slika 48, uzorak k1), pa je korišćena za dalji rad. Bazne frakcije b1 i b2 su kontaminirane kiselim izoformama (uočavaju se u donjem dijelu gela), s toga je za dalji rad bilo neophodno njihovo rehromatografisanje. Frakcija b1 je korišćena za rehromatografiju. Sakupljene su četiri nevezane frakcije (b1.1, b1.2, b1.3, b1.4). Eluiranje je nastavljeno sa 0,5 M NaCl u istom puferu i sakupljena je jedna frakcija kiselih peroksidaza (k3).



**Slika 48.** Zimogramska detekcija peroksidaza frakcionisanih na koloni Q-Sepharose FF. (A) b1-bazne peroksidaze 1, b2-bazne peroksidaze 2, k1- kisele peroksidaze 1, k2- kisele peroksidaze 2, P- početni preparat peroksidaze. (B) rehromatografisanje frakcije b1 na Q-Sepharose FF. b1.1- b1.4- sakupljene frakcije baznih peroksidaza, k3- kisele peroksidaze 3. (-)=pI 10, (+)=pI 3.

Analitičkim izoelektričnim fokusiranjem i zimogramskom detekcijom pri istim uslovima je provjerena efikasnost rehromatografije frakcije b1 (slika 48B). Na



zimogramu (slika 48B) su uočava smanjen udio kisele izoforme peroksidaze u frakcijama baznih peroksidaza. Određena je peroksidazna aktivnost u frakcijama dobijenim rehromatografisanjem frakcije b1. Rezultati su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Enzimska aktivnost prečišćenih izoformi peroksidaza na koloni Q-Sepharose FF. b1 – prva nevezana frakcija, b2 – druga nevezana frakcija, k1 – prva eluirana frakcija sa 0,5 M NaCl, k2 – druga eluirana frakcija sa 0,5 M NaCl. P – početni preparat peroksidaze. Enzimska aktivnost frakcija dobijenih rehromatografisanjem frakcije b1. b1.1 – prva nevezana frakcija, b1.2 – druga nevezana frakcija, b1.2 – treća nevezana frakcija, b1.4 – četvrta nevezana frakcija, k3 – frakcija eluirana sa 0,5 M NaCl.

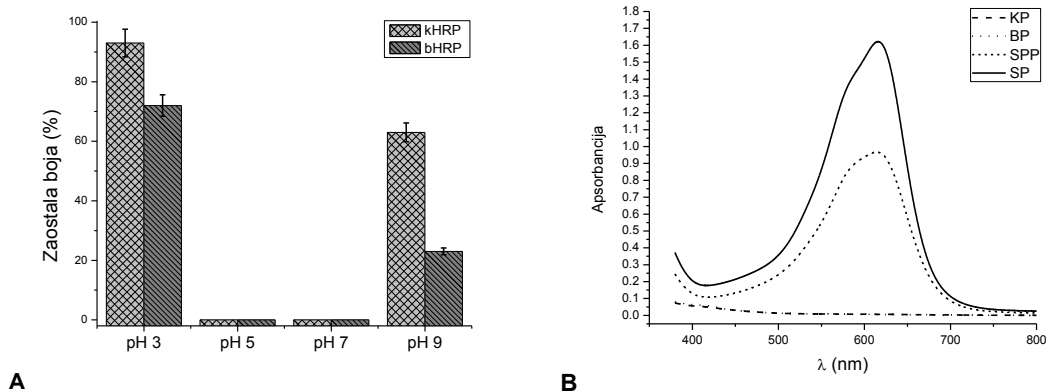
Prečišćene frakcije		Rehromatografisane frakcije	
Oznaka frakcije	Enzimska aktivnost (U/mL)	Oznaka frakcije	Enzimska aktivnost (U/mL)
b1	71,58	<b>b1.1</b>	<b>78,64</b>
b2	34,4	b1.2	85,55
<b>k1</b>	<b>7,2</b>	b1.3	79,2
k2	12,0	b1.4	13,89
P	133,2	k3	11,58

U daljem radu su korišćene frakcije **k1** kao glavne kisele peroksidaze (KP) i **b1.1** kao glavne bazne peroksidaze (BP). BP je razblaživana 10 x za dalji rad, kako bi jedinice enzimske aktivnosti glavnih baznih i glavnih kiselih peroksidaza bile približno izjednačene (7,2 U/mL za KP i 7,89 za BP).

### 3.5.2 Poređenje efikasnosti izoformi HRP za uklanjanje tekstilnih boja

Za potrebe poređenja KP i BP testirane su azo boje (RB52, RG15, CR, MO, RBBR), kiselna diazo boja (AB) i predstavnik aminohlorotriazinskih boja (PDB).

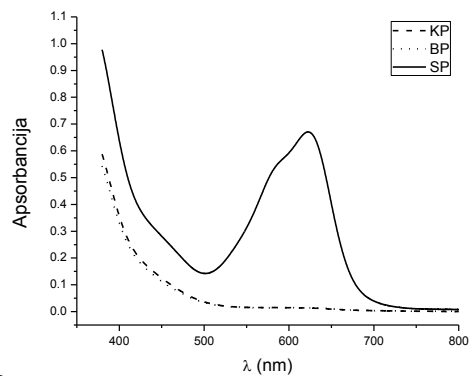
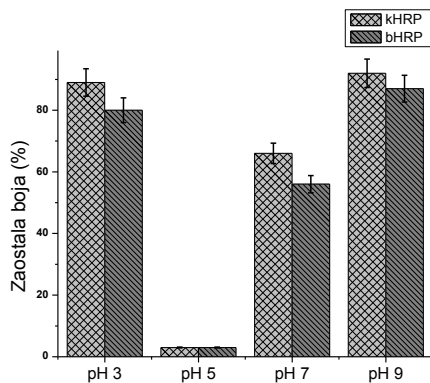
Rad je započeo obezbojavanjem RB 52 (Drimaren blue X-3LR), koja spada u kategoriju reaktivnih boja, pri različitim reakcionim uslovima. Nakon toga sniman je vidljiv spektar reakcione smješe sa najvećim obezbojavanjem. Rezultati obezbojavanja su prikazani na slici 49.



Slika 49. Obezbojavanje RB52 u zavisnosti od pH i izoforme HRP (A) i spektar nakon obezbojavanja RB52 na pH 5,0 (B). Legenda: B-bazna peroksidaza, K-kisela peroksidaza, SPP- rastvor RB52 sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SP- rastvor RB52.

Sa slike 49. možemo da zaključimo da je najbolje obezbojavanje postignuto na pH 5,0 i pH 7,0 dejstvom BP i KP (100%). Na osnovu spektra obezbojavanja RB52 na pH 7,0 prikazanog na slici 6, vidi se da je uticaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na boju primjetan, ali nedovoljan za potpunu dekolorizaciju. Vidljiv je nestanak karakterističnog  $A_{max}^{625}$ , odnosno došlo je do promjene hromogene grupe boje. Za postizanje 99% obezbojavanja RB52 po literaturnim podacima je potrebno zagrijavanje reakcione smješe na 35°C i veća koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,55 mM) (da Silva *et al.*, 2011). U našem testu to nije dalo najbolji rezultat, već je bila dovoljna temperatura od 25°C i finalna koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od 0,44 mM. Razlike je moguće objasniti time da je Silva (2011) koristio komercijalni preparat peroksidaze, a u dobijenom stepenu obezbojavanja vjerovatno ima udjela i veća koncentracije peroksida. Na slici 49B se uočava značajan uticaj vodonik-peroksida na obezbojavanje RB52.

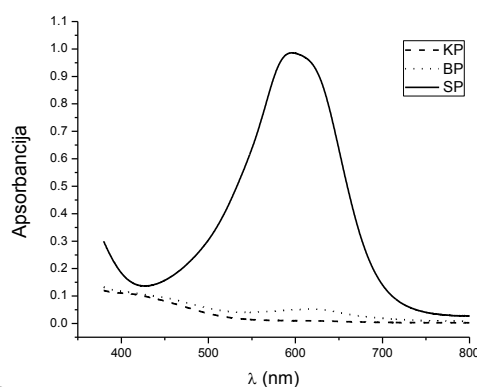
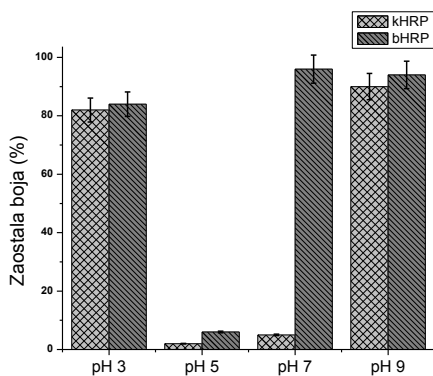
Slični rezultati dobijeni su i sa RG 15 (Drimaren green X-2BL), slika 50, koja takođe spada u kategoriju reaktivnih boja. Kao što se sa slike 51 vidi najbolje obezbojavanje (98%) je postignuto dejstvom KP na pH 5,0. Na osnovu spektra vidljivo je smanjenje karakterističnog  $A_{max}^{615}$  uslijed djelovanja KP. Očigledno je i ovdje došlo do promjene u strukturi hromogene grupe RG 15. Ipak, uočavamo veliku specifičnost KP za obezbojavanje RG 15, u odnosu na BP, pri istim reakcionim uslovima.



**A** **B**  
Slika 50. Obezbojavanje RG 15 u zavisnosti od pH i izoforme HRP (A) i spektar nakon obezbojavanja RG 15 na pH 5,0 (B). Legenda: B-bazna peroksidaza, K-kisela peroksidaza, SP-rastvor RG15.

Ovo je prva potvrda da isti preparat HRP može da ima različitu efikasnost zavisno od sadržaja prisutnih izoformi u preparatu koji je korišćen u reakciji obezbojavanja. Ovo je nametnulo potrebu daljih testiranja efikasnosti KP i BP u obezbojavanju različitih boja, pri istim reakcionim uslovima.

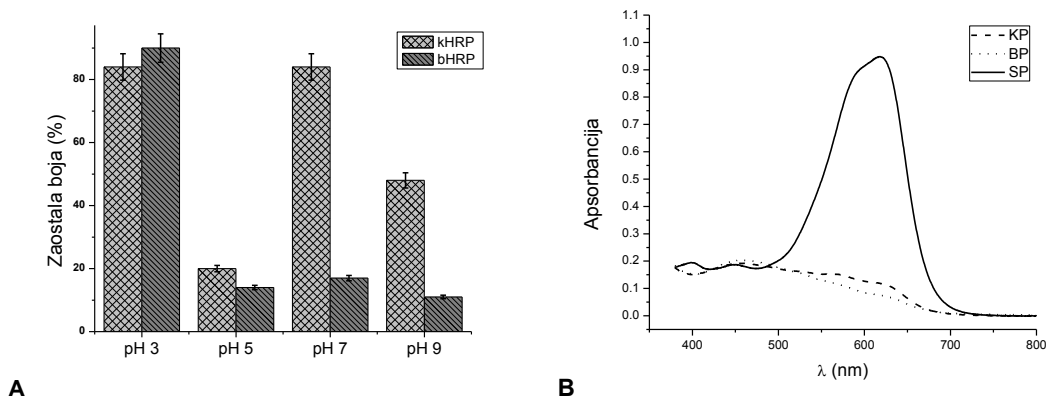
Prva u tom nizu je bila boja čija je struktura nepoznata, sa komercijalnim imenom Procion dark blue (PDB) i koja pripada aminohlorotriazinskim bojama. Ova boja se pokazala veoma podložnom djelovanju HRP. Bilo je potrebno svega 5 minuta da dođe do vidljivog nestanke boje (slika 51). Nakon 1 časa procenat obezbojavanja je iznosio 99% dejstvom KP na pH 5,0 i 98% na pH 7,0. I ovdje je potvrđena različita supstratna specifičnost BP i KP prema boji.



**A** **B**  
Slika 51. Obezbojavanje PDB u zavisnosti od pH i izoforme HRP (A) i spektar nakon obezbojavanja PDB na pH 5,0 (B). Legenda: B-bazna peroksidaza, K-kisela peroksidaza, SP-rastvor PDB.

Na spektru prikazanom na slici 51B vidljiv je gubitak karakterističnog  $A_{max}^{600}$ . Uticaj dodatog  $H_2O_2$  na obezbojavanje rastvora PDB je zanemarljiv.

U okviru degradacije kiselih diazo boja ispitivano je obezbojavanje boje Amido black 10B (AB), koja se pokazala kao veoma podložna obezbojavanju pod uticajem HRP u širem opsegu pH (slika 52). Dejstvom BP i smešom KB i BP postignuto je 92% obezbojavanje AB 10B.

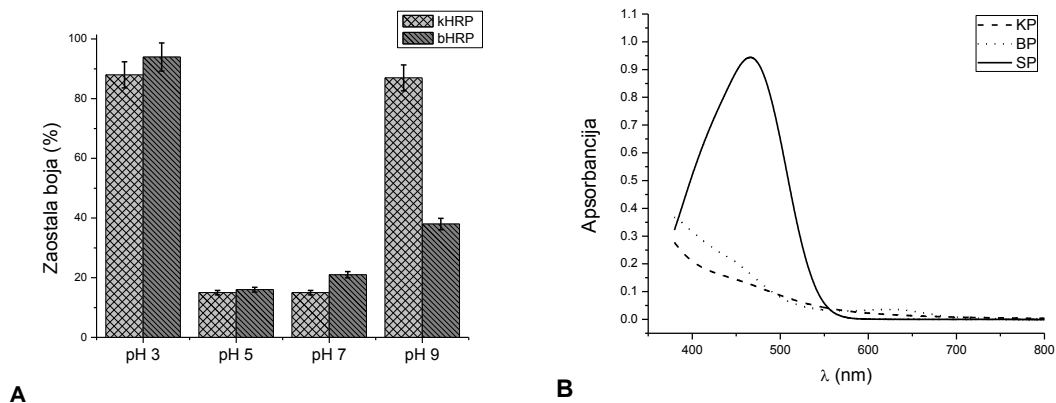


Slika 52. Obezbojavanje AB u zavisnosti od pH i izoforme HRP (A) i spektar nakon obezbojavanja AB na pH 9,0 (B). Legenda: B-bazna peroksidaza, K-kisela peroksidaza, SP-rastvor AB.

Osim smanjenja  $A_{max}^{620}$  vidljiva je i promjena spektra derivata boje nakon djelovanja HRP (pomeranje  $A_{max}$  na 490nm – hipsokromni efekat), slika 52B. Obezbojavanje Amido crne 10b na pH 5,0 je u skladu sa dosadašnjim literaturnim podacima tretiranja ove boje sa HRP (80-90%). 92% obezbojenje na pH 5,0 dejstvom HRP je postignuto (Onder *et al.*, 2011), ali tek na 50°C.

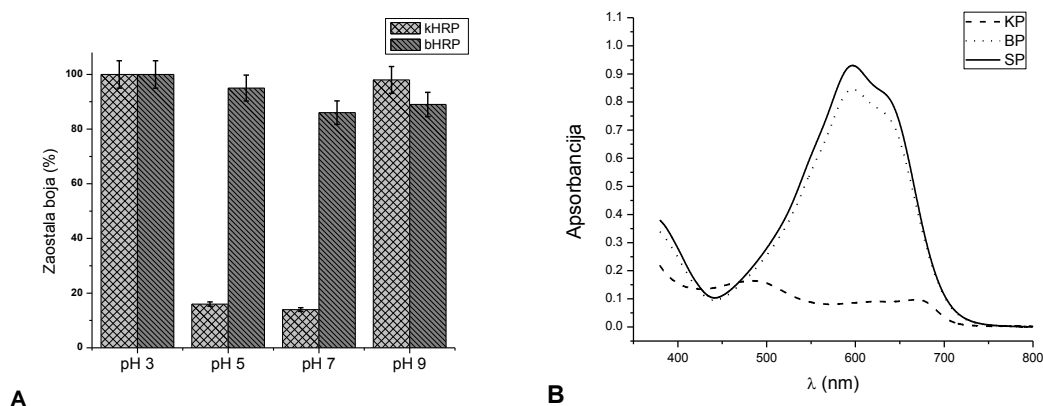
Metil Orange-MO (Acid Orange 52) spada u kategoriju azo boja. Najbolje obezbojenje (87%) je postignuto KP na pH 7,0 (slika 53). Proces obezbojavanja je praćen hipsokromnim efektom  $A_{max}^{460}$ . Visok stepen obezbojenja MO je postignut i na pH 5,0 (84%). Obezbojavanje MO na pH većem od pH 5,0 nije u skladu sa dosadašnjim rezultatima, koji prikazuju smanjenje efikasnosti obezbojavanja sa porastom pH. Hemijski modifikovanom HRP je postignuto obezbojavanje MO na pH većem od 3,0 (Liu *et al.*, 2006). Potpuno uklanjanje MO je postignuto peroksidazom iz *Momordica charantia* samo uz dodatak medijatora (Akhtar *et al.*, 2005). Problem

ostajanja medijatora u rastvoru nakon obezbojavanja čini da ovaj rezultat ima samo teorijski, ali ne i praktični značaj.



Slika 53. Obezbojavanje MO u zavisnosti od pH i izoforme HRP (A) i spektar nakon obezbojavanja MO na pH 7,0 (B). Legenda: B-bazna peroksidaza, K-kisela peroksidaza, SP-rastvor MO.

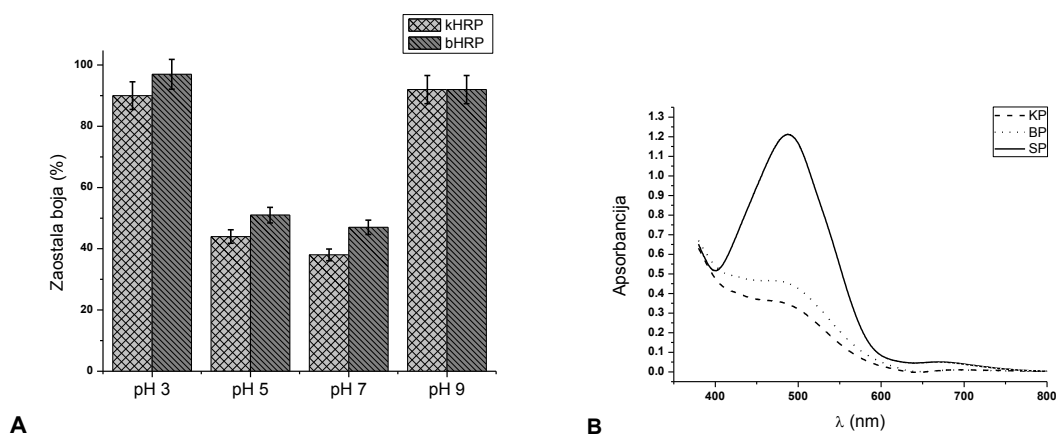
U obezbojavanju reaktivnih azo boja ima najviše problema, pa je dio naših napora usmjeren na prikupljanje što većeg broja ovakvih boja i testiranje efikasnosti njihovog obezbojavanja. Remazol brilliant blue R (Reactive blue 19, RBBR) je jedna od često testiranih azo-boja. Nakon 5 minuta nestanak boje je bio vidljiv (gubitak karakteristične plave boje). Nakon 15 minuta obezbojenje je iznosilo na pH 5,0 84%, slika 54.



Slika 54. Obezbojavanje RBBR u zavisnosti od pH i izoforme HRP (A) i spektar nakon obezbojavanja RBBR na pH 7,0 (B). Legenda: B-bazna peroksidaza, K-kisela peroksidaza, SP-rastvor RBBR.

Sa spektra prikazanog na slici 54, vidljivo je značajno smanjenje  $A_{max}^{595}$  (praktično njegovo nestajanje) usled delovanja KP. Postignuto obezbojavanje Remazol brilliant blue je u skladu sa dosadašnjim literaturnim podacima (da Silva *et al.*, 2011), sa razlikom što reakciona smeša nije inkubirana na 35°C i koncentracija  $H_2O_2$  je bila veća. Obezbojavanje Remazol brilliant blue u našim eksperimentima je postignuto na temperaturi 25°C pri finalnoj koncentraciji  $H_2O_2$  0,44 mM. Takođe dobijeni rezultati su u suprotnosti sa inhibicijom HRP RBBR na pH većim od 6,0 (Bhunia *et al.*, 2001). Rezultati dobijeni sa RBBR su utoliko značajniji, jer se zna da mogućnost degradacije ove boje koreliše sa mogućnošću degradacije polihlorovanih bifenila (PCB) (Chroma *et al.*, 2002).

Kongo crveno (Congo red - CR) je takođe diazo boja, ali sa benzidinskim jezgrom, slika 23B. Koristi se prevashodno u industriji bojenja celuloznih vlakana.



Slika 55. Obezbojavanje CR u zavisnosti od pH i izoforme HRP (A) i spektar nakon obezbojavanja CR na pH 7,0 (B). Legenda: B-bazna peroksidaza, K-kisela peroksidaza, SP-rastvor CR.

Najbolje obezbojavanje je postignuto na pH 5,0 dejstvom KP (84,8%). Spektri pokazuju praktično nestajanje  $A_{max}^{490}$  (slika 55).

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da efikasnost uklanjanja boja frakcijom kiselih peroksidaza u nekim slučajevima odgovara efikasnosti baznih peroksidaza (RB52, RG15 i MO), a u specifičnim slučajevima, kao što je obezbojavanje PDB, RBBR i CR daje znatno bolje rezultate. Ovo je važno sa dva aspekta. Prvi je poznata činjenica da iz mogućnosti uklanjanja RBBR možemo da ekstrapoliramo mogućnost

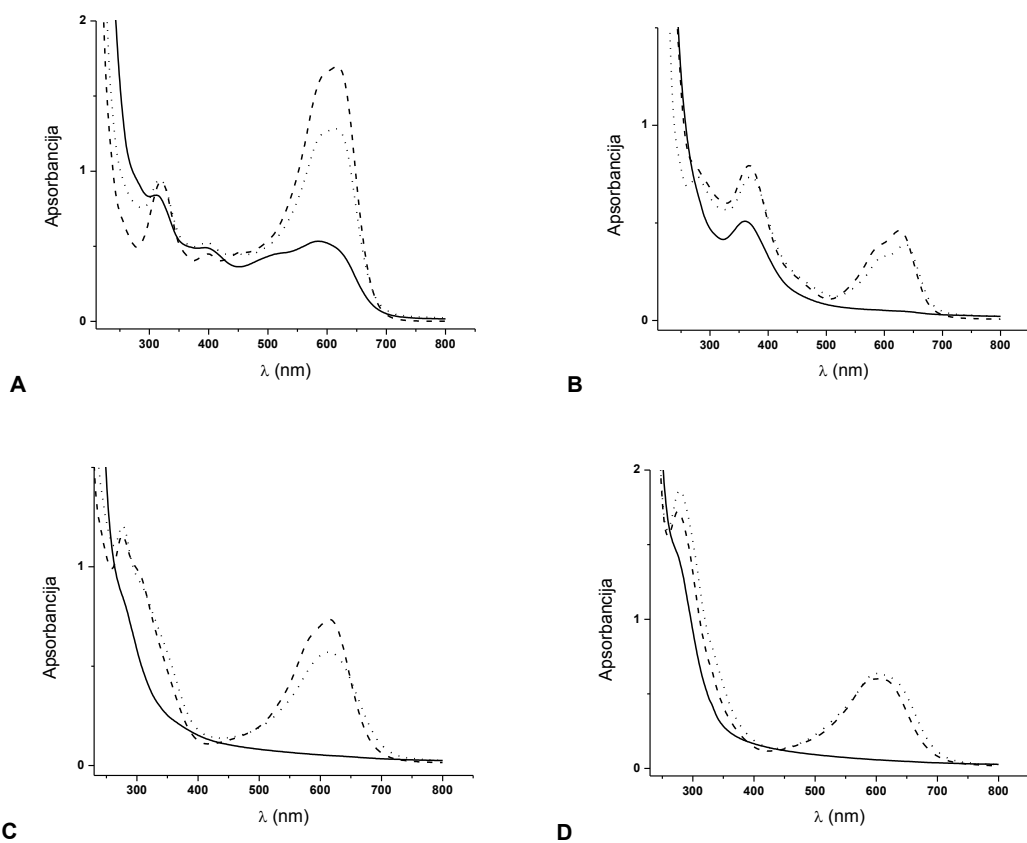
uklanjanja jako rezistentnih ksenobiotika, kao što su PCB (Chroma *et al.*, 2002). Drugi aspekt je isključiva upotreba baznih peroksidaza u komercijalnim preparatima i odbacivanje kiselih peroksidaza u procesu prečišćavanja, što ovaj enzim čini praktično besplatnim za upotrebu u tretmanu otpadnih voda.

### 3.6 Primjena CPO u obezbojavanju reaktivnih boja i halogenfenola

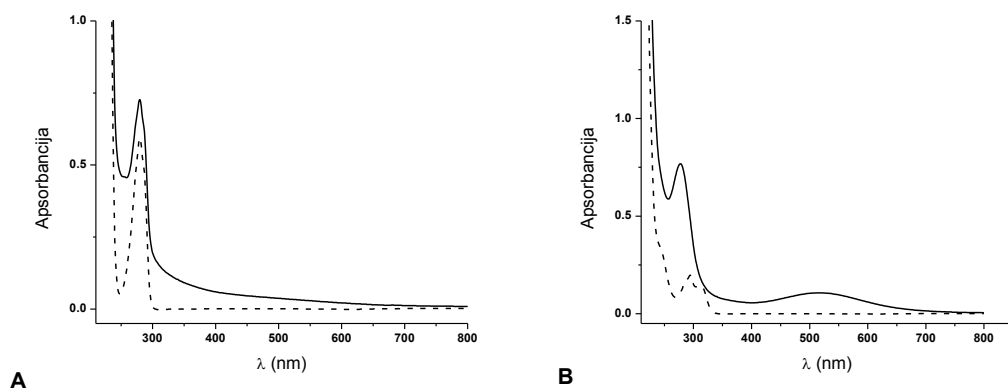
Hloroperoksidazu odlikuju jedinstvene osobine među testiranim enzimima. Pored peroksidazne i katalazne aktivnosti, ovaj enzim ispoljava i hlorinujuću/dehlorinujuću aktivnost, pa je stoga zanimljivo ispitati njen potencijal za uklanjanje reaktivnih boja. Testirane su sledeće boje: PDB, RB52, RG15, AB i fenoli *p*-CP, *p*-BP i TCP. Finalna koncentracija boja je 50 mg/L. Testovi su urađeni u 0,1 M acetatni puferu, pH 5. Ispitan je uticaj vodonik-peroksida i *terc*-butil peroksida (tBuOOH) na obezbojavanje, jer je poznato da, pri organskim sintezama, CPO vrlo brzo disproporcioniše vodonik peroksid katalaznom aktivnošću (Pešić *et al.*, 2012), dok je tBuOOH manje podložan tom dejstvu.

Uzorcima su snimljeni UV-Vis spektri nakon 2 časa inkubiranja boja sa CPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i CPO/tBuOOH na sobnoj temperaturi, a najbolji dobijeni rezultati su prikazani na slici 56. Uočava se da su spektri boja inkubiranih sa CPO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> skoro identični spektrima početnih rastvora boja, što ukazuje na nemogućnost CPO da iskoristi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za oksidaciju boja (slika 56). Nasuprot tome, na slici 56. jasno je vidljivo nestajanje karakterističnih apsorpcionih pikova svake od testiranih boja nakon inkubiranja sa CPO i tBuOOH, iz čega se može zaključiti da tBuOOH vjerovatno zbog svoje sterne zaštićenosti pokazuje rezistenciju na katalaznu aktivnost CPO, pa je time dobar ko-supstrat za oksidaciju aromatičnih struktura.

Efikasnost CPO za uklanjanje ksenobiotika testirana je i na fenolima (*p*-CP, *p*-BP i 2,4,6 trihlorfenol–TCP). Nihove finalne koncentracije u sintetičkoj otpadnoj vodi su bile 50 mg/L. Testiranje je urađeno na pH 3, 5 i 6 u odgovarajućim 50 mM puferima (acetat, pH 3,0 i pH 5,0; fosfat, pH 6,0). Spektri su snimljeni nakon 1h, a najbolji dobijeni rezultati su prikazani na slici 57.



Slika 56. UV-Vis spektri boja i dobijenih proizvoda nakon tretmana CPO sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i tBuOOH. Amido black 10A (A), Reactive Green 15 (B), Reactive blue 52 (C), Procion Dark blue (D). Kontrola (isprekidana linija), CPO + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tačkasta linija) i CPO + tBuOOH (puna linija).



Slika 57. UV-Vis spektri dobijeni snimanjem uzoraka nakon uklanjanja *p*-CP (A) i TCP (B) na pH 6 korišćenjem CPO i tBuOOH. Legenda: kontrola (isprekidana linija), uzorak nakon tretmana (puna linija).



Pokazano je da CPO brže uklanja *p*-CP (33%) nego *p*-BP (15,5%). Prilikom inkubiranja CPO sa trihlorfenolom uočava se pojava roze boja, vjerovatno kao posledica formiranja polimera. Kako postupak određivanja trihlorfenola sa 4-AAP nije moguć, zaključak je samo kvalitativan. CPO pokazuje veći stepen efikasnosti uklanjanja ksenobiotika na pH 5 - 6, nego na pH 3, što je čini komplementarnim enzimom sa prethodno (u ovoj disertaciji) opisanim enzimima time omogućavajući potencijalnu primjenu u koktelu enzima koji bi djelovao na široki spektar ksenobiotika.

U eksperimentima primjene CPO za uklanjanje boja i fenola pokazali smo da ono što su Pešić *et al.* (2012) pokazali vezano za oksidaciju Cbz-etanolamina sa CPO, važi i za oksidaciju boja – CPO je izrazito efikasnija kada koristi tBu-peroksid, a ne vodonik-peroksid. Na spektrima se uočava potpuni nestanak hromofore odgovorne za karakteristične apsorpcione pikove, pa ovi rezultati zajedno sa pokazanim potencijalom za uklanjanje halogenfenola otvaraju novi pravac za primjenu hloroperoksidaze.

### 3.7 Zaključci

- Razvijena je procedura prečišćavanja PPO iz krompira šaržnom (bač) hromatografijom na QAE-Sepahdex, pri čemu ova procedura daje prinos od 69%; djelimično prečišćena PPO pokazuje aktivnost od 8600 U/mL.
- Testirana je efikasnost vezivanja PPO za 11 komercijalnih i sintetisanih nosača, pri čemu se kao najefikasniji pokazao Eupergit C 250L.
- Eupergit C250L-PPO je postigao 45% uklanjanja *p*-bromfenola, a nakon osam uzastopnih ciklusa od po 5h, efikasnost uklanjanja pada na 55%.
- Sintetisan je novi nosač uvođenjem iminodiacetatnih grupa u potrošenu DEAE celulozu, za koje su zatim joni bakra koordinativno vezani, time omogućivši imobilizaciju PPO koordinativnim vezivanjem atoma N, O ili S u bočnim aminokiselinskim ostacima na površini proteina.
- Dobijeni katalizator TC-PPO ima pH optimum na 7,0 – 8,0 i temperaturni optimum na 25°C, a zadržava skoro 100% aktivnosti na 0°C. TC-PPO je znatno otpornija na dejstvo detergenta u odnosu na solubilni enzim, a pokazala je i određeni stepen aktivacije ovim detergentom pri koncentraciji od 1%.
- TC-PPO je testirana u šaržnom reaktoru za uklanjanje *p*-CP i *p*-BP. Postignuto je uklanjanje preko 90% pri koncentraciji fenola 100 mg/L.
- Za oba halogenfenola TC-PPO ima stepen uklanjanja od preko 90% u prva tri ciklusa, nakon čega efikasnost opada do 60% nakon šest ciklusa od po 8 časova.
- Optimalno pH za uklanjanje tekstilnih boja za rastvornu PPO iznosi 3,0.
- Pod optimizovanim uslovima 93–99.9% boja je uklonjeno tretmanom od 1 čas sa 424–1700 U/mL PPO, zavisno od boje. Formiranje polimera potvrđeno je infracrvenom spektroskopijom.
- Na lakaznu aktivnost su testirane spore dobijene iz oko sto sojeva *Bacillus sp.* izolovanih iz prirode, a lakaze iz tri najaktivnija soja su okarakterisane.
- Izolovani sojevi su identifikovani korišćenjem metode sekvenciranja 16S rDNA i potvrđeno je da se radi o sojevima vrste *Bacillus amyloliquefaciens*.
- pH optimum za aktivnost lakaza mijenja se u zavisnosti od supstrata i iznosi 4,0 za ABTS, odnosno 6,5 za siringaldazin.
- Temperaturni optimum lakaza sojeva BBS14 i MB24a je 65°C.

- Nativne lakaze iz sva tri soja, kao i rekombinantno proizvedena lakaza pokazuju rezistenciju na inhibiciju sa EDTA, kao i umjerenu rezistenciju na dejstvo visoke koncentracije hloridnih jona, a u 25% metanolu zadržavaju 50–60% aktivnosti.
- Lakaze sojeva BBS 14 i MB24a imaju vrijeme poluživota na 50°C oko 4 časa, dok je na 65°C oko 1 čas, što lakaze ovih sojeva svrstava među umjereno termostabilne enzime.
- Lakaze sojeva BBS 14 i MB 24a postižu 85% uklanjanja boje Congo red, dok se uklanjanje fenola (31– 47%) postiže sa ABTS medijatorom (0,5 mM).
- Lacc gen je kloniran iz *B.amyloliquefaciens* 12B1 u pET21a vektor i eksprimiran u *E. coli* BL21.
- Postoji velika sličnost sekvencije kloniranog gena sa genima za lakazu iz drugih vrsta *Bacillus* sp.
- pH optimum za sLac iznosi 4,0, dok za rLac on iznosi 5,0.
- Temperaturni optimum lakaza sLac i rLac je 80–85°C.
- Pokazano je da je rLac termostabilan na 80°C, a temperaturna stabilnost rLac je mnogo veća u odnosu na sLac na 50, 65 i 80°C.
- Korišćenjem rLac postignuto je obezbojavanje boja RB52 i PDB na pH 4,0, a sa približno istom efikasnošću i na pH 7,0, što je značajna prednost ovog enzima u odnosu na lakaze iz gljiva.
- Razvijena je procedura frakcionisanja kiselih i baznih izoformi HRP.
- Pokazano je da uklanjanje boja frakcijom kiselih peroksidaza u slučajevima PDB, RBBR i CR daje znatno bolje rezultate u odnosu na bazne peroksidaze.
- Pokazano je da efikasnost uklanjanja ksenobiotika hloroperoksidazom zavisi od vrste korišćenog peroksida i da se najbolji rezultati dobijaju korišćenjem tBuOOH.
- CPO izuzetno efikasno uklanja boja AB, RG15, RB52 i PDB.
- Rezultati ovog rada (Lončar *et al.*, 2011, 2012; Lončar i Vujčić 2011) kao i naši nepublikovani rezultati pokazuju da bi koktel oksidativnih enzima (rastvornih i imobilizovanih) mogao da služi za uklanjanje širokog spektra ksenobiotika iz otpadne vode.

## 4. Eksperimentalni dio

### Spisak glavne korišćene opreme:

FPLC sistem Pharmacia LCC501-plus

Tehnička vaga Mettler PE 3600 i analitička vaga Mettler

Protočni vodeni termostat Pharmacia Biotech, Multitemp III

Kada za horizontalnu elektroforezu Pharmacia LKB Multiphor II

Kada za horizontalnu elektroforezu Hoefer HE33

Ispravljači Pharmacia Biotech EPS 3500, Pharmacia ECPS 2000/300, Bio Rad

Inkubator-mučkalica IKA KS 4000i control

Inkubator Memmert INB 300

Kolone za hromatografiju proizvođača LKB, Pharmacia i GE

Spektrofotometri Philips PU 8630, Shimadzu UV1800 i Nano Drop 1000

Konduktometar i pH metar, InoLab

Centrifuga, miniSpin plus, Eppendorf

Eppendorf Vacuum Concentrator Model 5301

iCap 6500Duo with a CID86 chip detector, Thermo Scientific, UK

ETHOS 1, Advanced Microwave Digestion System, MILESTONE, Italy

Nicolet 6700FT-IR, Thermo Scientific

Eppendorf Personal MasterCycler i Bio Rad S1000 PCR MasterCycler

Bio Rad Geldoc EZ

Bio Rad Micropulser Electroporator

### Spisak korišćenih kitova za molekularnu biologiju:

PureYield™ Plasmid Miniprep System, Promega

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen

GoTaq® Green Master Mix, Promega

DreamTaq i Pfu polimeraze, Fermentas i KOD polimeraza, Toyobo

Sve ostale korišćene hemikalije su bile kvaliteta p.a. i kupljene su od firmi Merck (Darmstadt, Germany) i Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hromatografski matriksi tipa Sephadex i Sepharose su kupljeni od firme GE Healthcare Life Sciences.

## 4.1. Uklanjanje fenola fenoloksidazom iz krompira (*Solanum tuberosum*)

### 4.1.1 Prečišćavanje PPO

#### 4.1.1.1 Priprema sirovog ekstrakta

Crveni krompir (*Solanum tuberosum*) je kupljen u lokalnom supermarketu i inkubiran je na 3°C 12h. Nakon toga, cijeli (oprani) krompiri su homogenizovani u LaLane's sokovniku uz dodatak par kapi zasićenog rastvora Na<sub>2</sub>S. Homogenat (1L) je centrifugiran na 3500 o/min na 4°C. Dobijeno je 600 mL bistrog supernatanta (sirovi ekstrakt) koji je zatim rasoljen prema 10 mM Na-fosfatnom puferu pH 7,3 na koloni 6x60 cm Sephadex G25 Coarse.

#### 4.1.1.2 Prečišćavanje PPO bač hromatografijom na QAE-Sephadex

60 g prethodno nabubrenog QAE Sephadex A-50 je ekvilibrisano sa 10 zapremina 10 mM Na-fosfatnog pufera, pH 7,3 (provjeravan je konduktivitet i pH u eluatu dok nisu dobijene identične vrijednosti na ulazu i izlazu). Ekvilibrisani i dezaerisani jonoizmjenjivač je dodat u 680 mL rasoljenog sirovog ekstrakta i miješan na magnetnoj miješalici 30 min u atmosferi bez kiseonika (pod azotom). Nevezani proteini su isprani sa 3 zapremine početnog (ekvilibracionog) pufera, a PPO je eluirana sa 500 mL 0,75M NaCl u 10 mM Na-fosfatnom puferu pH 7,3. Ovako dobijen djelimično prečišćen preparat PPO je čuvan na -20°C do upotrebe.

#### 4.1.1.3 Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje je urađeno korišćenjem Multiphor II sistema za horizontalnu elektroforezu (Pharmacia-LKB Biotechnology) po uputstvu proizvođača. Fokusiranje je urađeno na 7,5% poliakrilamidnom gelu sa amfolitima pH opsega 3,0-10,0, na konstantnoj snazi od 7W u trajanju od 1,5h na 10°C. Nakon fokusiranja jedan dio gela je bojen bojom CBB. Zimogramska detekcija PPO je urađena na drugom dijelu gela (sa ponovljenim uzorcima) koji je ispran dva puta po 5 min dejonizovanom vodom,

a zatim ekvilibrisan u 100 mM fosfatnom puferu pH 7,4 (2 x 5 min). Nakon toga gel je uronjen u 10 mg/mL rastvor L-DOPA u 100 mM fosfatnom puferu pH 7,4 i inkubiran 10 min na 30°C. Nakon pojave braon traka koje se odnose na aktivnost PPO, gel je skeniran na HP ScanJet G3110 skeneru.

#### **4.1.2 Imobilizacija PPO na različitim nosačima**

Svaki nosač je izmjerjen u triplikatu (po 10 mg) i dodat u 200 µL preparata enzima (8471 U/mL). Ista masa nosača je dodata i u 0,9% NaCl kao slijapa proba. Smješe su ostavljene 24 h na IKA KS125 orbitalnoj mućkalici na 400 rpm. Biokatalizatori su odvojeni centrifugiranjem i isprani šest puta sa 0,9% NaCl. Za dalja ispitivanja tri najaktivnija biokatalizatora su pripremljena na analogan način na skali od 1 g.

##### **4.1.2.1 Određivanje aktivnosti PPO**

Aktivnost PPO je određivana korišćenjem supstrata L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA) na 25°C mjerenjem početne brzine formiranja dopahroma (Kwon i Kim, 1996). Standardna smješa za određivanje aktivnosti sastoji se od 0,1 mL rastvora enzima u 1,5 mL 9,3 mM L-DOPA u 50 mM Tris HCl pH 7,0. Apsorbancija na 475 nm je mjerena korišćenjem spektrofotometra (Philips UV-VIS-NIR PU 8630 ili Shimadzu UV1800). Jedna jedinica PPO aktivnosti je definisana kao ona količina enzima koja katalizuje povećanje apsorbancije za 0,001 u minuti na 25°C.

Aktivnost PPO imobilizata je određivana korišćenjem modifikovane procedure po Kwon i Kim (1996). 10 mg polusuvog biokatalizatora (enzim + nosač) je dodato u 800 µL 2.325 mM L-DOPA u 50 mM Tris HCl puferu pH 7.0 na 25 °C. Smješa je miješana 3 min i zatim centrifugirana na 14000 o/min. Povećanje apsorbancije zbog formiranja dopahinona u rezultujućem supernatantu je mjerena na 475 nm. Slijepa proba sadrži 10 mg samog nosača umjesto biokatalizatora, ostale komponente su iste. Ovo je neophodno obzirom na to da su neki od nosača (MTM, MTM obogaćen sa 10% Ti, Greensand i Birm) pokazali inherentno svojstvo oksidacije L-DOPA. Specifična

aktivnost imobilizovane PPO je definisana kao povećanje apsorbancije od 0.001 u minuti po gramu imobilizata pod opisanim uslovima.

#### *4.1.2.2 Ispitivanje mogućnosti korišćenja imobilizovane PPO u šaržnom reaktoru*

Uklanjanje fenola iz sintetičke otpadne vode je ispitivano sa 100 mg polusuvog biokatalizatora koji je dodat u 3 mL 2,5 i 10 mM rastvora fenola, *p*-CP i *p*-BP. Inkubacija je trajala 5h uz mućkanje na IKA KS125 mućkalici da bi se obezbijedio kontinualan dotok kiseonika. Nakon 5h u rastvorima je određivana koncentracija zaostalih fenola koristeći 4-aminoantipirinski (AAP) test (Wagner i Nicell, 2001).

#### *4.1.2.3 Određivanje koncentracije fenola*

Koncentracija fenola je određena kolorimetrijskim testom u kom fenolna jedinjenja reaguju sa 2,08 mM AAP i 8,34 mM kalijum-fericijanidom u 0,25 M natrijum-bikarbonatu dajući crvenu boju hinonskog tipa koja ima apsorpcioni maksimum na 510 nm.

Potrebni rastvori:

1. 0.25 M NaHCO<sub>3</sub> (1.05 g u 50 mL H<sub>2</sub>O)
2. 10.4 mM 4–AAP (21.2 mg u 10 mL rastvora 1)
3. 41.7 mM K-fericijanida (137.3 mg u 10 mL rastvora 1)

Postupak

SP: 600  $\mu$ L r.1. + 200  $\mu$ L r.2. – vorteksovati pa dodati 200  $\mu$ L r.3. – sačekati 6 min pa izmjeriti A<sup>510</sup>

Proba: 50  $\mu$ L rastvora fenola + 550  $\mu$ L r.1. + 200  $\mu$ L r.2. – vorteksovati pa dodati 200  $\mu$ L r.3. – sačekati 6 min pa izmjeriti A<sup>510</sup>

Konstrukcija kalibracione krive

Napraviti štok rastvor fenola: 18.82 mg fenola + 10 mL 96% EtOH = 20 mM fenol

Od štoka napraviti serijskim razblaženjem sa d.vodom (1:1) rastvora koncentracija 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mM. Od ovih rastvora uzeti po 50  $\mu$ L i razblažiti sa 950  $\mu$ L d.vode. Time se dobijaju rastvori sledećih koncentracija: 1, 0.5, 0.25, 0.125 i 0.0625 mM.

#### **4.1.2.4 Određivanje životnog vijeka Eupergit C250L-PPO imobilizata pri uklanjanju 4-hlorfenola**

Efikasnost uklanjanja *p*-CP je ispitivana u osam uzastopnih ciklusa od po 5 sati sa Eupergit C250L-PPO imobilizatom. Između svakog od ciklusa imobilizat je sakupljen centrifugiranjem i ispran tri puta sa puferom.

#### **4.1.3 Sinteza novog nosača sa pipcima i njegova primjena za imobilizaciju PPO**

Komercijalno dostupna DEAE-celuloza (Sigma-Aldrich) je korišćena u ovoj disertaciji. Međutim, korišćena je potrošena DEAE-celuloza, tj ona koja više nije pogodna za prečišćavanje proteina, jer je korišćena u velikom broju ciklusa i ne pruža potrebnu rezoluciju za razdvajanje proteina.

5 g nabubrene korišćene DEAE celuloze je resuspendovano u 20 ml 3 M NaOH i 2 ml epihlorhidrina. Aktivacija matriksa je trajala 2h uz miješanje, nakon čega je ispran i prebačen u rastvor koji sadrži 2 g NaOH, 3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 4.3 g IDA. Suspenzija je ostavljena da se inkubira 2 h na 50 °C, a zatim na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon ispiranja sa 500 mL vode, dobijeni tentacle matriks je napunjen jonima bakra (1 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O u 25 ml H<sub>2</sub>O), ponovo ispran sa vodom, a zatim i sa 7% sirćetnom kiselinom. TC nosač je do upotrebe čuvan u 20% etanolu na 4 °C.

##### **4.1.3.1 Karakterizacija TC nosača**

Sadržaj vode je određen u 10 ponovljenih mjerenja uzimanjem 200 mg polusuvog TC-PPO koji je sušen na 60 °C u Eppendorf vakuum koncentratoru (Model 5301) do dobijanja konstante mase.

Količina vezanih epoksi grupa prije uvođenja IDA grupa je određen po metodi Axen *et al.* (1975), dok je količina Cu(II) jona određena induktivno-spregnutom plazma



apsorpciono-emisionom spektroskopijom (ICP-AES) na aparatu iCap 6500Duo, opremljenom sa CID86 čip detektorom (Thermo Scientific, UK). Instrumentalni uslovi za ICP-AES su RF snaga: 1150W, plasma pogled: aksijalni, protok gasa za raspršivanje: 0.50 L/min, protok pomoćnog gasa: 0.50 L/min, protok gasa za hlađenje: 12 L/min, brzina pumpe za analizu: 50 rpm). TC je prethodno rastvoren u 10 ml 65% HNO<sub>3</sub>, 0.2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pomoću ETHOS 1, naprednog sistema za mikrotalasnu digestiju (MILESTONE, Italy). Mikrotalasna digestija je urađena po dvostepenom programu, prvi koji uključuje grijanje na 200 °C 15 min i drugi koji održava temperaturu na 200 °C tokom 20 min. Uzorak je zatim razblažen do 25 mL. Slijepa proba je pripremljena na isti način bez uzorka.

#### ***4.1.3.2 Imobilizacija PPO na TC***

150 mg suvog nosača TC (1 g polusuvog) je ekvilibrisan sa 25 mL 0.15 M kalijum-fosfatnog pufera pH 7.0 sa 0.5 M NaCl da bi se spriječila nespecifična jonska adsorpcija. TC nosač je zatim resuspendovan u 30 ml enzimskog preparata (192000 U). Ista količina nosača je dodata u 0.5 M NaCl kao slijepa proba. Smješe su ostavljene na IKA orbitalnoj mućkalici na 400 o/min da se mućkaju 12h. Biokatalizatori su sakupljeni centrifugiranjem na 14000 x g, nakon čega su isprani po šest puta sa 30 mL 0.9% NaCl (dok sav nevezani enzim nije ispran).

#### ***4.1.3.3 Uticaj pH i temperature rastvora na aktivnost TC-PPO***

##### ***4.1.3.3.1 Određivanje pH optimuma TC-PPO i PPO***

Da bi se odredio pH optimum TC-PPO prema L-DOPA, 10 mg TC-PPO i 50 µl PPO je inkubirano 30 min sa 750 µl odgovarajućeg 50 mM pufera (acetatni, pH 4.3-5.8; Tris-HCl, pH 7.0-8.0; kalijum-fosfatni, pH 9.0-10.0), nakon čega je dodato 250 µl rastvora 9.3 mM L-DOPA. Dalji koraci su isti kao što je opisano u odjeljku 4.1.2.1.

#### 4.1.3.3.2 Određivanje temperaturnog optimuma TC-PPO

Da bi se odredio temperaturni optimum TC-PPO prema L-DOPA, 10 mg TC-PPO i 50 µl PPO je preinkubirano sa 750 µl kalijum-fosfatnog 50 mM pufera pH 7,0 na odgovarajućoj temperature (0-95 °C) nakon čega je dodato 250 µl rastvora 9,3 mM L-DOPA preinkubiranog na istoj temperaturi. Dalji koraci su isti kao što je opisano u odjeljku 4.1.5. Za rastvorni enzim je korišćena procedura opisana u odjeljku 4.1.2.1. Najvećoj izmjerenoj aktivnosti je pripisana vrijednost 100%.

#### 4.1.3.4 Uticaj detergenta na aktivnost TC-PPO

Rastvorni i imobilizovani enzim su inkubirani sa SDS detergentom (0,25-1,0%) u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu pH 7,0 na 25 °C 100 min. Zaostala PPO aktivnost je određivana kao što je opisano u 4.1.2.1 i 4.1.3.3.1. Aktivnost netretiranog enzima je uzeta kao kontrola (100%).

#### 4.1.3.5 Ispitivanje upotrebe TC-PPO za uklanjanje halogenfenola u šaržnom reaktoru

Uklanjanje halogenfenola iz sintetičke otpadne vode je ispitivano sa 30 mg suvog biokatalizatora (310 000 U/g) koji je dodat u 20 mL 100 mg/L rastvora *p*-CP i *p*-BP rastvorenih u 50 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0. Uzorci su inkubirani na orbitalnoj mućkalici da bi se obezbijedio kontinualni dotok kiseonika. Rastvori fenola su oksigenisani produvanjem vazduha u trajanju od 10 min neposredno prije tretmana.

##### 4.1.3.5.1 UV spektrofotometrijska analiza rastvora halogenfenola nakon tretmana sa TC-PPO

Da bi se potvrdilo uklanjanje *p*-BP i *p*-CP dejstvom TC-PPO, urađena je spektralna analiza u UV oblasti. Spektri su snimljeni aparatom Cintra 40 UV Vis Spectrometer u opsegu 200–380 nm. Spektri su snimljeni za rastvore *p*-BP i *p*-CP prije i posle tretmana sa TC-PPO kao što je opisano u 4.1.8.8.

#### **4.1.3.6 Ispitivanje efikasnosti TC-PPO u ponovljenim ciklusima uklanjanja halogenfenola**

Ponavljanjem ciklusa opisanih u odjeljku 4.1.8.8. je ispitivan poluživot TC-PPO. Između ciklusa imobilizat je sakupljen filtracijom i ispran tri puta fosfatnim puferom pH 7,0.

## **4.2 Uklanjanje boja fenoloksidazom iz krompira (*Solanum tuberosum*)**

### **4.2.1 Uticaj pH na aktivnost PPO obezbojavanje tekstilnih boja**

Koncentracije i karakteristični apsorpcini maksimumi ( $\lambda_{\max}$ ) za četiri azo i tri aminohlorotriazinske boje korišćene u ovim eksperimentima su dati u tabeli 4. Koncentracije su odabrane tako da apsorbancija početnog rastvora na  $\lambda_{\max}$  bude 1,0. Svaka od boja je inkubirana 1h sa PPO (424 U/mL) u odgovarajućem 50 mM puferu (natrijum-acetat, pH 3,0 i pH 5,0; natrijum-fosfat, pH 7,0; glicine-NaOH, pH 9,0) na 25°C. Nastali precipitati su uklonjeni filtracijom kroz Whatman No1 filter papir ili centrifugiranjem na 600 x g i sadržaj zaostale boje je određen mjerenjem apsorbancije na  $\lambda_{\max}$ . Početna apsorbancija za svaku od boja na  $\lambda_{\max}$  je uzeta kao kontrola i dodijeljena joj je vrijednost 100%. Stepen dekolorizacije (Rd) je definisan formulom:  $Rd (\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ , gdje je  $A_0$  apsorbancija netretirane boje, dok je  $A_1$  izmjerena apsorbancija nakon tretmana.

### **4.2.2 Uticaj koncentracije PPO i dužine inkubacije na obezbojavanje**

Uticaj koncentracije PPO na brzinu obezbojavanja je analiziran za svaku od testiranih boja sa povećanjem koncentracije PPO u opsegu od 212-1700 U/mL boje u 50 mM natrijum-acetatnom puferu pH 3.0 na 25°C za 1h.

Efekat dužine inkubiranja je praćen inkubiranjem rastvora boje sa PPO (424 U/mL) u 50 mM natrijum-acetatnom puferu, pH 3,0 na 25°C u vremenskom periodu od 0–5 časova. Stepen obezbojenja je praćen na karakterističnom  $\lambda_{\max}$  kao što je prethodno opisano u odjeljku 4.2.1.

### 4.2.3 Vis i FTIR spektrometrijska analiza tekstilnih efluenata tretiranih sa PPO

#### 4.2.3.1 Vis spektrofotometrijska analiza tekstilnih efluenata nakon tretmana sa PPO

Tekstilni efluenti su čuvani na sobnoj temperaturi. Izmjerena je pH vrijednost i u svim efluentima iznosi 7,1. Podešavanje pH na 3,0 je urađeno dodatkom razblažene sirćetne kiseline. Zakišeljavanje nije imalo vidljivih efekta na efluente. Obezbojavanje je urađeno dodatkom 424 U/mL PPO u svaki od efluenata. Vidljivi spektri efluenata su snimljeni na spektrofotometru Cintra 40u opsegu 380 – 800 nm prije i posle tretmana sa PPO.

#### 4.2.3.2 FTIR spektrometrijska analiza boje Reactive blue 52 i produkta dobijenog nakon tretmana sa PPO

FTIR spektri boje Reactive blue 52 (RB52) i njenog polimernog produkta su snimljeni u opsegu od 400-4000 nm korišćenjem metode prigušene totalne refleksije (eng. attenuated total reflectance, ATR) na FTIR spektrofotometru (Nicolet 6700FT-IR, Thermo Scientific) što je i ranije opisano u literaturi (Aktas *et al.*, 2000, 2003). Polimerni produkt je sakupljen centrifugiranjem nakon tretmana sa PPO i osušen do konstantne suve mase na Eppendorf vakuum koncentratoru.

## 4.3 Uklanjanje ksenobiotika bakterijskom lakazom

### 4.3.1 Identifikacija izolovanih sojeva i dobijanje spora iz različitih *Bacillus sp.*

#### 4.3.1.1 Izolovanje divljih sojeva (*wt*) *Bacillus sp.* iz zemljišta

*Priprema uzoraka sa terena za izolovanje bakterijske kulture* – 1 g zemlje je rastvoren u 99 ml sterilisane dejonizovane vode i dobro je promiješan, zatim je 1 ml tog rastvora prebačeno u epruvetu. Krompir je izrendan na veoma sitne komade, pa je 1 g krompira dodat u 99 ml sterilisane dejonizovane vode, dobro promiješan, a zatim je 1 ml tog rastvora prebačeno u epruvetu. 1 mL čistog, nerazblaženog kravljeg mlijeka je prebačeno u jednu epruvetu, a takođe je napravljen i razblažen uzorak 1:50 u sterilnoj vodi. Epruvete sa uzorcima, pokrivene aluminijskom folijom, inkubirane su u

vodenom kupatilu na 80°C 10 min. Nakon hlađenja do sobne temperature uzorci su zasijani na LBagar podloge i inkubirani 24h na 37°C. Uočava se bakterijski tepih karakteristične (sluzave) morfologije za vrste roda *Bacillus*.

Oznaka	Lokacija sakupljanja
MB7	Bogatić termalni izvor
MB22A	Tuleži, pljoprivredno zemljište
MB5B	Bogatić termalni izvor
MB20	razblaženo kravlje mleko
MB16B	Borča, zemlja iz dvorišta
MB24A	Ovča banja, slani izvor vode
MB17B	krompir
12B1	Zemlja
BBS6	Laboratorijska zbirka sojeva

#### 4.3.2 Provjera prisustva lakazne aktivnosti u sporama *Bacillus*

##### 4.3.2.1 Dobijanje spora

Izolovane kolonije su zasijane na sporulacionu podlogu. Sporulaciona podloga (1L) se sastoji od:

Sastojak	Masa (g)
Hranljivi agar	41,300
KCl	1,000
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,250
MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O	0,002
Destilovana voda	do 1L

*Autoklaviranje 20 min, 121 °C.*

Nakon autoklaviranja dodaju se mikrofiltrirani rastvori:  $\text{CaCl}_2$  (finalna konc.  $5 \times 10^{-4} \text{M}$ ) i  $\text{FeSO}_4$  (finalna konc.  $10^{-6} \text{M}$ ). Inkubiranje traje 3 dana na  $37^\circ\text{C}$  (Schaeffer *et al.*, 1965). Spore se sastružu ezom sa podloge, a zatim suspenduju u sterilnoj vodi i tretiraju lizozimom (0,1 mg/ml), 10-20 min na  $37^\circ\text{C}$  da bi se lizirale preostale vegetativne ćelije. Spore se zatim prečiste sukcesivnim ispiranjem sa 1M NaCl, 0,14M NaCl, 0,1% SDS i sterilnom vodom pri čemu svi rastvori sadrže 10 mM EDTA. Spore se zatim zagrijavaju 10 min na  $80^\circ\text{C}$  i dva puta ispiraju sterilnom dejonizovanom vodom (Lu *et al.*, 2012). Od sakupljenih spora su dobijene pojedinačne kolonije metodom razblaženja, tako što su spore razblažene do  $10^{-9}$ . Razblaženja su pravljena sterilnom destilovanom vodom od početnog uzorka (kome je dodato 1 ml dest. vode). Razblaženja od  $10^{-5}$  do  $10^{-9}$  su zasijana na hranljivom agaru u Petri šoljama koristeći ezu po Drigalskom. Na čvrstu podlogu je sipano po 25  $\mu\text{l}$  odgovarajućeg razblaženja spora i ravnomjerno razvučeno po površini podloge. Zasijane Petri šolje su ostavljene na  $37^\circ\text{C}$ , 24 časa, nakon čega su spore sakupljene po gore opisanoj proceduri.

#### 4.3.2.2 Pretraga spora sa aktivnom lakazom na pH 4 i pH 7

Puferi:

##### 0,1 M acetatni pufer, pH 4:

Glacijalna kiselina                    5,69 ml

Voda    do 1 L

pH podešeno 1 M rastvorom NaOH

##### 0,1 M fosfatni pufer, pH 7:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$                                     12 g

Voda    1L

pH podešeno 1 M rastvorom NaOH

##### 20 mM ABTS:

ABTS    10,29 mg

Voda    1 ml

Od ovog rastvora su pravljene ostali rastvori odgovarajuće koncentracije

1 mM siringaldazin:

SGZ	2,9 mg
DMF	500 $\mu$ l
Voda	7,5 ml

Siringaldazin je potrebno ostaviti na sobnoj temperaturi par sati da se kompletno rastvori.

Prečišćene spore su suspendovane u po 1 ml destilovane vode, koje su zatim 10 x razblažene. Pretraga aktivnosti lakaza je urađena u mikrotitar ploči (96 mjesta) pri čemu je sastav smješe u svakom bunaru bio:

Spore (10x razblažene u vodi)	50 $\mu$ l
Pufer (0,1 M acetatni, pH 4 ili 0,1 M fosfatni, pH 7)	50 $\mu$ l
Supstrat (2 mM ABTS ili 1 mM SGZ)	100 $\mu$ l

Po dodavanju supstrata ploča je inkubirana na 37°C, 30 min. Pozitivan rezultat je bio pojava zelene boje za ABTS ili roze za SGZ.

**4.3.2.3 Određivanje lakazne aktivnosti spora**

Sastav reakcione smješe:

Pufer	850 $\mu$ l
Spore (10 x razblažene)	50 $\mu$ l
Supstrat (ABTS, SGZ)	100 $\mu$ l

Enzimska aktivnost prema ABTS-u je određivana koristeći 1 mM ABTS supstrat u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4 na 60°C. Vrijeme inkubiranja je 5 min, nakon čega su reakcione smeše centrifugirane (14500 rpm, 1 min) i mjerena je  $A_{436\text{ nm}}$  u supernatantu. Za siringaldazin se koristi 0,1 M fosfatni pufer, pH 7 u kome je siringaldazinu finalna koncentracija 0,1 mM. Vrijeme inkubiranja je 10min nakon čega se uzorak centrifugira i mjeri se  $A_{525\text{ nm}}$  u bistrom supernatantu.

Masa suvih spora je određena tako što je u prethodno odmerenim ependorfima sipano po 250 µl 10 x razblaženih spora. Suspenzije su uparene do suva na vakuum koncentratoru i iz razlike masa ependorfa sa i bez spora je dobijena masa suvih spora, nakon čega je preračunata specifična aktivnost lakaza na sporama.

#### 4.3.3 Identifikacija izolovanih sojeva *Bacillus* sp.

##### LB podloga:

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Voda do	1L

Autoklaviranje 20 min, 121 °C.

Prekonoćne kulture bakterija odgajene u LB podlozi su korišćene za ekstrakciju DNA.

##### 4.3.3.1 Izolovanje DNA iz bakterija

Korišćena je metoda ekstremno brze ekstrakcije DNA iz Bakterija (Cheng *et al.*, 2006). Koraci u dobijanju DNA su opisani niže:

- Pripremljena je prekonoćna bakterijska kultura.
- Potrebni rastvori :

<b>STE pufer</b> : 100 µL NaCl	<b>TE pufer</b> : 10 mM TrisHCl
10 mM TrisHCl	1 mM EDTA
1 mM EDTA	pH 8.0
pH 8.0	

**Trisom zasićen fenol** : 2 mL fenola + 2 mL 1,5 M TrisHCl pH 8,8. Dobro se miješa 30 min i drži u toploj vodi. Kad se izdvoje dvije faze, izbacuje se gornja faza u kojoj je pufer i dodaje se ponovo isti pufer. pH fenola treba da bude 8 ! Postupak se ponavlja sve dok pH donjeg fenolskog sloja ne bude 8.



- a) 1 mL ćelijske suspenzije se centrifugira na 8000g 2 min.
- b) Odbaci se supernatant.
- c) Talog se resuspenduje u 400 µL STE pufera pH 8.0.
- d) Centrifugira se na 8000g 2 min.
- e) Ponove se koraci c) i d).
- f) Talog se resuspenduje u 200 µL TE pufera pH 8.0.
- g) Doda se 100 µL trisom zasićenog fenola pH 8.0 (uzima se samo donji sloj) i vorteksuje 60s.
- h) Centrifugira se na 13 000 g 5 min da se odvoji vodena faza od organske.
- i) 160 µL gornjeg, vodenog sloja prebaci se u čist ependorf od 1,5 mL i doda 40 µL TE pufera, a zatim i 100 µL hloroforma.
- j) Centrifugira se na 13 000 g 5 min da se odvoji vodena faza (gornji sloj) od organske
- k) Lizat (vodena faza) se ekstrahuje hloroformom sve dok se u međufazi više ne nalazi bijela boja ( 2 – 3x). Uzima se gornji sloj a baca se donji hloroformski sloj.
- l) 160 µL gornjeg vodenog sloja se prebaci u čist ependorf od 1,5 mL, doda se 40 µL TE pufera i 5 µL RNA-ze ( 10 mg/mL ) i inkubira se 10 min na 37 °C.
- m) Doda se 100 µL hloroforma, dobro izmiješa i centrifugira se 5 min na 13 000 g
- n) 150 µL gornje vodene faze prebaci se u čist ependorf, on sadrži čistu DNA i može da se koristi direktno ili da se čuva na – 20 °C do upotrebe.

#### **4.3.3.2 Identifikacija sojeva *Bacillus* sp. poređenjem 16 S rDNA sekvencija**

Korišćeni sojevi su identifikovani analizom sekvencija 16 S rDNA gena. Genomska DNA izolovana je po proceduri opisanoj u 4.3.3.1. Gen 16S rDNA je umnožen lančanom reakcijom polimerizacije (PCR) sa standardnim prajmerima 20F (5'- GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') i 1492R (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Lane 1991). Za umnožavanje gena korišćena je KOD Hot Start Polimeraza (Novagen, TOYOBO) porijeklom iz *Thermococcus kodakaraensis*. Ovaj proizvod predstavlja smještu KOD HiFi DNA Polimeraze i dva monoklonska antitijela koja inhibiraju DNA polimerazu i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost tokom pripremanja PCR reakcije na sobnoj

temperaturi. Ovim se postiže dobijanje vjerodostojnog proizvoda, velika brzina polimerizacije i procesivnost KOD HiFi sa visokom specifičnošću antitijelom postignutog Hot Start početka reakcije. Nespecifično umnožavanje je spriječeno, jer su onemogućena pogrešna spajanja prajmera sa templatom koja se dešavaju tokom pripreme reakcije i početnog povišenja temperature.

Sastav reakcione smeše:

60 µl vode PCR kvaliteta (bez prisustva nukleaza)  
10 µl 10X PCR pufer za KOD Hot Start DNA Polimerazu  
10 µl dNTP (finalna koncentracija 0.2 mM)  
4 µl MgSO<sub>4</sub> (finalna koncentracija 1 mM)  
2 µl DNA matrice  
6 µl 5' prajmer (5 pmol/µl, finalna koncentracija 0.3 µM)  
6 µl 3' prajmer (5 pmol/µl, finalna koncentracija 0.3 µM)  
2 µl KOD Hot Start DNA Polimeraza (1 U/µl)  
100 µl ukupna zapremina

Program za PCR mašinu:

1. Inicijalna denaturacija 2 min 94 °C
2. Denaturacija 15 s 94 °C
3. Vezivanje prajmera 30 s 45 °C
4. Umnožavanje 30 s 72 °C (20 s/kbp)
5. finalno umnožavanje 5 min 72 °C
6. Hlađenje reakcije na 8 °C.

Koraci 2-4 su ponovljeni 30 puta.

Čitava reakcija je zatim elektroforetski razdvojena na 1,5% agaroznom gelu u 0,5% TBE puferu sa SYBR safe (Invitrogen) bojom za DNA. Nakon elektroforeze traka koja odgovara poziciji markera za masu od 1,5 kbp je isječena sterilnim skalpelom i fragment je ekstrahovan iz gela komercijalnim kitom Qiagen Gel Extraction kit. Koncentracija ekstrahovanog fragmenta je izmjerena NanoDrop 1000

spektrofotometrom i iznosila je ~60 ng/ $\mu$ L. Fragmenti su sekvencirani korišćenjem istog para prajmera.

Seqmatch alatka je korišćena za pretragu sličnih sekvencija sakupljenih u Ribosomal Database Project-II Release 10 (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>) (Cole *et al.*, 2009) paralelno sa BLASTN pretragom (Altschul *et al.*, 1997). Filogenetsko stablo je konstruisano pomoću programske alatke TreeBuilder koja se nalazi u okviru RibosomalDatabase projekta.

#### 4.3.3.3 Potopna elektroforeza DNA na agaroznom gelu

##### TBE pufer (5 x koncentrovani):

Tris	54 g
Borna kiselina	27,5 g
EDTA, 0,5 M (pH 8)	20 ml

Za rad se koristi 10x razblaženi pufer.

##### 1% agarozni gel:

Agarozna	0,3 g
TBE pufer 0,5x	30 ml

Agarozna je rastvorena u puferu u mikrotalasnoj pećnici, a zatim razlivena u sistem za nalivanje gela. Nakon geliranja češljevi su izvađeni, a gel je prebačen u horizontalnu kadu sa 0,5x TBE puferom. Na gel je nanošeno po 10  $\mu$ l uzorka koji je prethodno pomješan sa 2  $\mu$ l komercijalne boje (6x koncentrovana). Naneto je i 5  $\mu$ l standarda Fermentas 1 kb Gene Ruler.

Nakon elektroforeze gel je bojen na sledeći način:

50 ml vode, 5 $\mu$ l etidijum-bromida	20 min
Ispiranje vodom	4x

Trake su vizuelizovane iluminacijom UV svjetlom, a slika zabilježena Canon digitalnim aparatom ili BioRad GelDoc EZ sistemom za snimanje gelova.

#### 4.3.4 Karakterizacija lakaza

##### 4.3.4.1 Određivanje pH optimuma lakaza

Smješe su inkubirane 5 min sa odgovarajućim puferom (odjeljak 4.1.3.3), a potom je dodat supstrat i nakon 10 min izmjerena apsorbancija supernatanta. U slučaju pH optimuma za SGZ, rađeno je na temperaturi od 37°C dok je za ABTS rađeno na 65°C.

##### 4.3.4.2 Određivanje temperaturnog optimuma lakaza

Da bi se odredio temperaturni optimum lakaza prema ABTS supstratu, spore su preinkubirane u 900 uL natrijum-acetatnog 50 mM pufera pH 4,0 na odgovarajućoj temperaturi (0-95 °C) nakon čega je dodato 100 µl 10 mM rastvora ABTS preinkubiranog na istoj temperaturi. Dalji koraci su isti kao što je opisano u odjeljku 4.3.2. Najvećoj izmjerenoj aktivnosti je pripisana vrijednost 100%.

##### 4.3.4.3 Ispitivanje dejstva inhibitora na aktivnost lakaza sojeva BBS14 i MB24a

Napravljeno je po 5 ml 100 mM vodenih rastvora korišćenih inhibitora i 2 M rastvor NaCl. Za njihovo pravljenje su izmerene sledeće količine supstancija:

EDTA	0.1861 g
DTT	0.0771 g
Askorbinska kiselina	0.0881 g
L-cistein	0.0877 g
NaN <sub>3</sub>	0.0325 g
NaCl	0.58 g

Sastav reakcionih smješa:

Pufer (0,1 M acetatni, pH 4)	750 µl
Spore (10 x razblažene)	50 µl
Inhibitor	100 µl
ABTS (10 mM)	100 µl

U slučaju NaCl finalne koncentracije soli su bile 0,2, 0,5 i 1 M.

***4.3.4.4 Ispitivanje uticaja organskih rastvarača na aktivnost lakaza***

Sastav reakcionih smeša:

Rastvarač	500 µl (za 50%) ili 250 µl (za 25%)
Spore (10 x razblaženih)	50 µl
Pufer (0,1 M acetatni, pH 4)	350 µl (za 50%) ili 600 µl (za 25%)

Po dodatku rastvarača reakciona smješa je inkubirana 15 min na 37°C nakon čega je dodat supstrat (ABTS) i posle 10 min inkubiranja mjerena je apsorbancija na 436 nm.

***4.3.4.5 Temperaturna stabilnost lakaza***

Sastav reakcione smješe:

Pufer (0,1 M acetatni, pH 4)	850 µl
Spore (20 x razblažene)	50 µl
ABTS (10 mM)	100 µl

Suspenzija spora u puferu je inkubirana u vodenom kupatilu na 50°C, odnosno na 65°C. U određenim vremenskim intervalima uzorci su uzimani i stavljeni u frižider. Za nulto vreme deo spora je odmah stavljen u frižider. Kada su svi uzorci uzeti, ostavljeni su na 37°C, 5 min, nakon čega je dodato po 100 µl 10 mM ABTS-a i smeše inkubirane na 37°C 10 min. Mjerena je  $A_{436 \text{ nm}}$ .

#### 4.3.4.6 Primjena lakaza u obezbojavanju

##### Pravljenje rastvora boja, 0,5 mg/ml:

Boja	2,5 mg
Voda	5 ml

Svi korišćeni puferi su već navedeni. Vrijeme inkubacije je 24 časa i rađeno je na 25°C uz mješanje na rotacionoj mućkalici IKA KS125. Proces obezbojavanja je praćen spektrofotometrijski. Prije mjerenja apsorbancije, smješe su centrifugirane i korišćen je supernatant. Procenat obezbojenja je izračunat uzimajući da je vrijednost apsorbancije početnog uzorka 100%.

##### Sastav reakcione smješe:

Spore (koncentrovane)	50 µl
Pufer (acetatni, pH 3, 4,5, 5,7, 6,5 i tris, pH 9,2)	850 µl
Boja	100 µl

Apsorbancije su merene na 610 nm za indigo carmine, 565 i 495 nm za Congo red (u zavisnosti od pH reakcione smeše), i 603 nm za RB 5.

##### Sastav reakcionih smješa za različite koncentracije spora:

Spore	200, 100, 50 i 20 µl
Pufer (acetatni, pH 3, 4,5, 5,7, 6,5 i tris, pH 9,2)	1,6, 1,7, 1,75 i 1,78 ml
Boja	200 µl

Ovaj test je rađen samo za Congo red boju i apsorbancija je mjerena na 565 nm (za pH 3 i 4,5) i 495 nm (za pH 5,7, 6,5 i 9,2).

##### Sastav reakcione smješe sa inhibitorom (azidom):

Boja (congo red)	200 µl
Spore (koncentrovane, prethodno inkubirane sa 5 mM azidom)	100 µl
Pufer (0,1 M acetatni, pH 5,7)	1,7 ml

Spore su inkubirane u 5 mM azidu, 30 min. Posle inkubiranja spore su isprane destilovanom vodom i dodate u reakcionu smješuu.

#### *4.3.4.7 Primjena lakaza za uklanjanje fenola*

##### Sastav smješe za 0,25 mM fenol

Spore (koncentrovane)	50 µl
ABTS (1mM)	1 ml
Pufer (0,1 M acetatni, pH 4 i 6,5)	700 µl
Fenol (2 mM)	250 µl

Rastvor fenola je napravljen na sledeći način:

##### Za 100 mM fenol:

Fenol	0,19 g
Voda	20 ml

##### Za 2 mM fenol:

Fenol (100 mM)	2 ml
Voda	98 ml

##### Sastavi smješa za 50 i 100 mg/L fenola:

Spore (koncentrovane)	50 µl
Fenol (400 mg/L)	250 µl (za 100 mg/L) i 125 µl (za 50 mg/L)
Pufer (0,1 M acetatni, pH 4)	600 µl (za 100 mg/L) i 725 µl (za 50 mg/L)
ABTS (1 mM)	100 µl (za 100 µM) i 500 µl (za 500 µM)

Rastvor fenola (400 mg/L) je napravljen na sledeći način:

Fenol	100 mg
Voda	250 ml

Koncentracija fenola je određivana spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije supernanta. Kontrole su sadržavale sve sem spora. Prilikom mjerenja fenola kao i kod boja smeše su prvo cenrifugirane i za mjerenje apsorbancije su korišćeni supernatanti.

### 4.3.5 Zamrzavanje najaktivnijih pojedinačnih kolonija

Sastav smeša za zamrzavanje:

Spore	400 µl
Sterilna voda	400 µl
Sterilni glicerol	200 µl

Po dodavanju glicerola, smješe su vorteksovane i zamrznute na -80°C.

## 4.4 Uklanjanje ksenobiotika rekombinantno proizvedenom lakazom iz soja *B.amyloliquefaciens* 12B1 eksprimiranoj u *E. coli* BL21

### 4.4.1 Kloniranje Lacc gena u ekspresioni vektor pET21a

Kao templat za dizajn prajmera je korišćena sekvencija CotA iz *B.amyloliquifaciens* DSM7 (GenBank pristupni broj YP\_003919218). Prajmerima su dodata restrikciona mjesta za NdeI i EcoRI. Dizajnirani prajmeri:

Fw GCA CAT ATG ATG GCA CTT GAA AAA TTT GC  
Rev ACT GAA TTC TTA CTG CTT TTC TGT GAC GTC

#### 4.4.1.1 Održavanje sojeva i čuvanje bakterija

Soj *E. coli* Top10 je korišćen u koracima subkloniranja, a *E. coli* BL21 DE3 je korišćen za ekspresiju rekombinantne lakaze.

#### 4.4.1.2 Uslovi gajenja

Medijum korišćen za gajenje *E. coli* je standardni bogati medijum Luria-Bertani (LB). Kulture su gajene na 37°C u incubator-mučkalici pri rotaciji od 150 o/min. U selektivni medijum je dodavan ampicilin (štok rastvor konc. 100 mg/mL) do finalne koncentracije od 100 µg/mL, dok je za čvrste medijume dodavan agar do finalne



koncentracije 15%. Sojevi se čuvaju su u glicerolskim štokovima na  $-70^{\circ}\text{C}$ , kao i na kosom agaru na  $8^{\circ}\text{C}$ .

#### *4.4.1.3 Umnožavanje Lacc gena PCR reakcijom*

Koristeći dva para prajmera navedene u tabeli 9. urađen je PCR kao što je opisano u odjeljku 4.3.3.2. Urađena je optimizacija PCR reakcije mijenjanjem annealing temperature, kako bi se optimizovalo vezivanje prajmera za templat DNA. Isprobane su annealing temperature od  $50$ ,  $55,5$ ,  $60$  i  $65^{\circ}\text{C}$  za Kosc Fw/Kosc Rev par prajmera i annealing temperature od  $53$ ,  $55$  i  $57^{\circ}\text{C}$  za novodizajnirani par prajmera CotA Fw/CotA Rev. Nakon optimizacije korišćena je annealing temperatura od  $55^{\circ}\text{C}$  za par prajmera CotA Fw/CotA Rev.

#### *4.4.1.4 Digestija restrikcionim enzimima*

Digestija je urađena sa parom brzo digestujućih restrikcionih enzima NdeI i EcoRI na  $37^{\circ}\text{C}$ , po uputstvu proizvođača (Fermentas). Specifičnost ove digestije je pojava tzv. “star” aktivnosti kod EcoRI enzima već nakon  $20$  min, pa je potrebno DNA fragment inkubirati sa enzimom NdeI  $40$ min, a zatim u reakcionu smještu dodati EcoRI i inkubirati još  $15-20$  minuta. Inaktivacija enzima se obavlja inkubiranjem na  $80^{\circ}\text{C}$   $5$  minuta. Sastav reakcione smješe:

Sastojak:	V ( $\mu\text{L}$ ):
NdeI	2
EcoRI	2
10xpuf	6
DNA	25
Voda	25

Plazmid pET21a je digestovan na isti način, sem što je vrijeme inkubiranja  $10$  min. Nakon inaktivacije enzima sve reakcione smješe su elektroforetski razdvojene na semipreparativnom  $1,5\%$  agaroznom gelu. Trake koje sadrže fragmente su isječene iz gela sterilnim skalpelom i DNA fragmenti izolovani korišćenjem komercijalnog kita (Qiagen Gel Extraction kit ili Promega Wizard SV Gel and PCR kit).

#### 4.4.1.5 Ligacija korišćenjem T4 DNA ligaze

Ligacija urađena po uputstvu proizvođača (Roche) sa T4 DNA ligazom inkubiranjem na 16 °C preko noći. Sastav ligacione smješe:

Insert	10,5 uL
Linearizovani vektor	6,5 uL
10x T4 Lig pufer	2 uL
T4 DNA Ligaza	1 uL

Ligaciona smješa je direktno korišćena za transformaciju svježe pripremljenih elektrokompetentnih ćelija.

#### 4.4.1.6 Priprema elektrokompetentnih ćelija i transformacija elektroporacijom

Potrebno je sterilisati autoklaviranjem sve rastvore, nastavke za pipete i sudove (kivete za centrifugu).

##### 4.4.1.6.1 Priprema kompetentnih ćelija

- Inokulisati 10 mL LBamp podloge kolonijom sa Petrijeve šolje ili iz glicerolskog štoka. Inkubirati preko noći na 37 C.
- Prebaciti 2 mL inokuluma u 100 mL LBamp podloge u erlenmajeru od 500 mL.
- Inkubirati na 37 C i 150 o/min dok OD<sub>600</sub> ne dostigne 0,6-0,7. Ohladiti kulturu 10 min na ledu. Od ovog trenutka ćelije moraju da budu na hladnom.
- Centrifugirati 10 min na 5000 o/min u sterilnim ohladjenim kivetama u centrifugi sa hlađenjem (4 C).
- Odliti supernatant i aspirirati ostatak medijuma.
- Dodati 50 mL hladnog 10% glicerola i resuspendovati ćelije pipetiranjem.
- Centrifugirati 10 min na 5000 o/min u sterilnim ohladjenim kivetama u centrifugi sa hlađenjem (4 C).

- Odliti supernatant i aspirirati ostatak medijuma.
- Dodati 25 mL hladnog 10% glicerola i resuspendovati ćelije pipetiranjem.
- Centrifugirati 10 min na 5000 o/min u sterilnim ohlađenim kivetama u centrifugi sa hlađenjem (4 C).
- Odliti supernatant i aspirirati ostatak medijuma.
- Resuspendovati ćelije u 1 mL hladnog 10% glicerola i alikvotirati po 50  $\mu$ L.
- Ćelije mogu da se koriste za transformaciju odmah, a mogu id a se zamrznu na -70 C za kasniju upotrebu (ćelije su upotrebljive do 6 mjeseci).

#### 4.4.1.6.2 Transformacija

- 2  $\mu$ L ligacione smješe se pomiješa sa 50  $\mu$ L kompetentnih ćelija i inkubirati na ledu 2 min.
- Prebaciti ćelije u kivetu za elektroporaciju i koristeći program za *E. coli* uraditi transformaciju.
- Dodati 600  $\mu$ L SOC medijuma u kivetu i promiješati pipetiranjem. Prebaciti suspenziju ćelija u sterile epruvetu od 15 mL i inkubirati 1 h na 37 C uz mućkanje.
- Zasijati 50, 100 i 250  $\mu$ L na LBamp agar i inkubirati Petrijeve šolje preko noći na 37 C.

#### 4.4.2 Ispitivanje ekspresije rekombinantne lakaze

Klonovi *E. coli* pET21a-Lac su zasijani u po 3 mL LBamp i inkubirani na 37 C i 150 rpm. Nakon 16 h uzeto je po 2 mL i presijano u erlenamjere od 500 mL sa 100 mL LBamp podloge. Kada je  $OD_{600} \sim 1$ , indukovana je ekspresija dodatkom 250  $\mu$ L 100 mM IPTG (finalna koncentracija 0,25 mM) i 200  $\mu$ L 1M  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (finalna koncentracija 2 mM). Temperatura je snižena na 25°C, a nakon 6 časova brzina mućkanja je smanjena na 75 o/min saglasno referenci Durao *et al.* (2008a) kako bi se postigli mikroaerofilni uslovi i tako se smanjio toksičan efekat bakra.

#### 4.4.2.1 Određivanje aktivnosti Lacc

Aktivnost lakaze je određivana na 25 °C praćenjem oksidacije ABTS-a na 420 nm ( $\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Reakciona smješa sadrži 2 mM ABTS, 100 mM Na-acetatni pufer pH 3.0.

Lakazna aktivnost prema DMP je određivana u smješi koja sadrži 1 mM DMP u 100 mM fosfatnom puferu pH 7,0. Oksidacija DMP je praćena mjerenjem promjene apsorbanacije 477 nm ( $\epsilon_{477} = 1.48 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Podaci o korišćenim supstratima za određivanje lakazne aktivnosti:

Supstrat	Mr	Talasna dužina (nm)	Finalna konc. (mM)	Odmjeriti (mg) za 10 mL rastvora	Rastvoriti u:	pH
ABTS	514,60	420	0,50	2,60	Puferu	4,0
SGZ	360,36	525	0,05	0,18	DMSO	7,0
DMP	154,16	468	0,50	0,80	Puferu	7,0

#### 4.4.2.2 Ispitivanje uticaja koncentracije $\text{Cu}^{2+}$ jona na ekspresiju lakaze

Postupak je identičan opisanom postupku u odjeljku 4.4.2, sem što je varirana finalna koncentracija  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,2, 1,0, 2,0 i 4,0 mM).

#### 4.4.3 Izolovanje i prečišćavanje rLac iz *E. coli*

##### 4.4.3.1 Homogenizacija

Nakon 22h od indukcije ćelije su skupljene centrifugiranjem na 4000 o/min, 30 minuta na 4°C. Talog ćelija je zatim resuspendovan u zapremini koja odgovara 1/10 od zapremine culture (10 mL za kulturu od 100 mL) 100 mM trisHCl pufera pH 7,5 sa koktelom inhibitora proteaza (Roche Complete mini EDTA-free). Ćelije su lizirane ultrazvučnom sondom sa četiri tretmana od 15 sekundi, pri čemu je ćelijska suspenzija držana na ledu da se spriječi prekomjerno zagrijavanje.

#### **4.4.3.2 Jonoizmjenjivačka hromatografija na koloni Q-Sepharose**

Dobijeni homogenat je izbistren centrifugiranjem, nakon čega je rasoljen dijalizom prema 10 mM fosfatnom puferu pH 7,0. Dijalizovani uzorak je nanešen na kolonu Q-Sepharose XK 16/10, ekvilibrisanu u 10 mM fosfatnom puferu pH 7,0. Nakon ispiranja nevezanih proteina startnim puferom kolona je eluirana gradijentom jonske sile od 0-0,5M NaCl u 5 zapremina kolone. Dobijene frakcije su testirane na aktivnost lakaza. Aktivne frakcije su spojene i koncentrovane liofilizacijom i naknadnim rastvaranjem.

#### **4.4.4 Određivanje biohemijskih parametara korišćenih lakaza**

Biohemijski parametri su određeni analogno postupcima opisanim u odjeljku 4.3.4, s tim da je aktivnost rekombinantne lakaze određivana po proceduri opisanoj u odjeljku 4.4.2.1.

#### **4.4.5 Primjena rekombinantno proizvedene lakaze u obezbojavanju reaktivnih boja**

Postupak je analogan postupku opisanom u odjeljku 4.3.4.6.

### **4.5 Uklanjanje ksenobiotika peroksidazom iz rena (*Armoracia rusticana*)**

#### **4.5.1 Hromatografsko frakcionisanje izoformi peroksidaze**

##### **4.5.1.1 Rasoljavanje preparata peroksidaze na koloni Sephadex G 25**

Kolona Sephadex G 25 (400 mL) je ekvilibrisana 5 mM natrijum fosfatnim puferom pH 7,1 propuštanjem 5 zapremina kolone (2 L). Na koloni je rasoljeno 118 mL preparata peroksidaze, sakupljena je frakcija od 138 mL.

#### 5mM natrijum fosfatni pH 7,1

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,68 g
Dejonizovana voda do	1 L

Podešeno je na pH 7,1.

#### ***4.5.1.2 Jonoizmenjivačka hromatografija preparata peroksidaze na koloni Q-Sepharose FF***

Kolona Q-Sepharose FF XK 16/10 je ekvilibrisana 5 mM natrijum fosfatnim puferom pH 7,1 dok konduktivitet i pH na ulazu i izlazu iz kolone nije bio jednak ( $\chi=594 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ , pH 7,1). Nevezane frakcije (b1 i b2) su eluirane istim puferom. Vezane frakcije (k1 i k2) su elirane 0,5 M NaCl u startnom puferu.

#### 0,5 M NaCl u 5 mM natrijum fosfatnom puferu pH 7,1

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,68 g
NaCl	29,3 g
Dejonizovana voda do	1 L

Podešeno je pH na 7,1.

#### ***4.5.1.3 Izoelektrično fokusiranje frakcija peroksidaze sa kolone Q-Sepharose FF***

Izoelektrično fokusiranje je urađeno kao što je opisano u odjeljku 4.1.1.3.

#### ***4.5.1.4 Zimogramska detekcija peroksidazne aktivnosti gvajakolom nakon izoelektričnog fokusiranja***

Nakon fokusiranja gel je ispran 3 x 10 minuta u dejonizovanoj vodi. Nakon toga je ekvilibrisan u puferu 50 mM natrijum fosfatni pH 7,5. Potom je dodat supstrat za detekciju peroksidaze.

Potrebni rastvori:

1. 50 mM natrijum fosfatni pufer pH 7,5

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,9 g
Dejonizovana voda do	1 L
Podešeno pH 7,5	

2. Rastvor supstrata

Gvajakol	20 µL
4,41 M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µL
50 mM Na-fosfatni pufer pH 7,5	20 mL

Rastvor se pravi neposredno pre upotrebe.

*4.5.1.5 Analiza slika gelova*

Gelovi su skenirani na Canon CanoScan Lide 90 skeneru pri rezoluciji od 300 dpi.

*4.5.1.6 Određivanje aktivnosti HRP gvajakolom*

Potrebni rastvori:

100 mM natrijum fosfatni pufer pH 7,0

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,8 g
Dejonizovana voda	do 1 L
Podešeno pH 7,0	

0,02 M gvajakol

Gvajakol	58,8 µL
Dejonizovana voda	do 24 mL

0,008 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

4,41 M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1 mL
Dejonizovana voda do	60 mL

<u>Uzorak</u>	0,1 mL
---------------	--------

Enzimski uzorak se po potrebi razblaži u puferu u kome je rastvoren i supstrat.

Sve komponente se pomiješaju u kiveti. Za mjerenje na  $A_{436}$  se poništi- to je slepa proba i dalje se meri  $A_{436}$  u vremenu na svakih 15 sekundi. Aktivnost peroksidaze se računa prema formuli:

$$U/ml = \frac{\Delta A_{436} / \text{min} \cdot 4 \cdot V_{rs}}{25.5 \cdot V_e} \times R$$

#### 4.5.2 Poređenje efikasnosti izoformi HRP u uklanjanju tekstilnih boja

Obezbojavanje boja dejstvom HRP je ispitano na dvadeset boja različitih strukturnih motiva. Ispitivana je zavisnost enzimske aktivnosti od pH rastvora boje, pa je stoga polazni koncentrovani rastvor boje (koncentracije 0,5 g/L) razblažen u puferima četiri različita pH i sastava (100 mM acetatni pufer pH 3,0 i pH 5,0, 100 mM natrijum fosfatni pufer pH 7,0 i 100 mM bikarbonatno-karbonatni pufer pH 9,0).

U zavisnosti od apsorpcionog maximum ( $A_{max}$ ) na određenoj talasnoj dužini, svaka boja je razblažena toliko puta da je bilo moguće pratiti smanjenja apsorbancije (A) u linearnom opsegu spektrofotometrijski tj. svedena je na vrednost od približno 1,0 na maksimumu svoje talasne dužine. Obezbojavanje je rađeno u epruvetama, a reakciona smješa je sadržavala 1mL boje odgovarajućeg razblaženja, 0,16 U/mL HRP (BP ili KP) i  $H_2O_2$  u finalnoj koncentraciji od 0,44 mM. Epruvete su tokom reakcije držane u mraku, kako bi se izbjegao efekat fotohemijske degradacije boje. Nakon 2 časa je mjerena  $A_{max}$  svake reakcione smješe, a nakon 24 časa VIS spektar od 380 do 800 nm. Procenat obezbojenja je izračunat na osnovu sledeće formule:

$$\% \text{ obezbojenja} = (A_o - A_i) / A_o \cdot 100$$

gdje  $A_i$  predstavlja apsorbanciju nakon tretiranja HRP,  $A_o$  apsorbanciju slijepe probe (boja).

#### 4.6 Primjena CPO u obezbojavanju reaktivnih boja i halogenfenola

Soj *A.niger* MGG029 koji nosi vektor pCPO3.I-AmdS je dobijen ljubaznošću prof. Punt sa katedre za primjenjenu mikrobiologiju i gensku tehnologiju, TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Holandija.



#### 4.6.1 Produkcija CPO fermentacijom *A.nigera*

##### 4.6.1.1 Izolovanje hemina

U ovom eksperimentu hemin se koristi da bi se povećao nivo ekspresije hloroperoksidaze. Endogena sinteza hema je metabolički zahtjevan proces i sastoji se od mnogo koraka. Standardni način izolovanja hemina polazi od životinjskih eritrocita koji se dobijaju centrifugiranjem krvi u koju je dodat Na-citrat i glukoza da bi se spriječila kaogulacija. Hemoglobin se tretiranjem vrelim rastvorom sirćetne kiseline i NaCl raspada u globin (denaturiše se i taloži) i hemin (crvena supstanca). U korišćenom postupku hemin se ekstrahuje rastvorom stroncijum-hlorida u sirćetnoj kiselini i acetonu. Zagrevanje olakšava precipitaciju proteina i povećava čistoću hemina.

##### Postupak

Na jedan dio 2% stroncijum-hlorida heksahidrata u glacijalnoj sirćetnoj kiselini dodato je tri djela acetona. U jednu zapreminu eritrocita dodato je tri zapremine destilovane vode uz energično miješanje. Liziranje eritrocita zbog osmotskog šoka je ubrzano dodatkom par kapi toluola. U odmjerenu zapreminu acetonsko-sirćetne smješe dodat je u kapima rastvor liziranih eritrocita. Nakon dodatka celokupne količine lizata, smješa je zagrejana do ključanja. Uočava se precipitiranje globulina. Da bi se olakšala ekstrakcija nakon zagrijavanja dodata je jednaka zapremina acetona u smesu. Precipitirani globulini odvojeni su cijedenjem kroz nabrani filter papir. Filtrat je uparen na vakuum-uparivaču. Suvi ostatak je rastvoren u e 50%-noj sirćetnoj kiselini, a zatim ekstrahovan hloroformom u lijevku za odvajanje. Hloroformski rastvor je uparen do suva na vakuum-uparivaču, a dobijeni suvi ostatak je liofilizovan da bi se uklonili tragovi vode. Preparat hemija je čuvan u frižideru do korišćenja.

##### 4.6.1.2 Priprema inokuluma

1 mL spora *A.niger* MGG029 koji nosi vektor pCPO3.I-AmdS konc.  $1,6 \times 10^6$  je korišćeno za inokulaciju 30 mL YPD medijuma u erlenmajeru od 500 mL. Ostavljeno preko noći u rotacionoj mućkalici-inkubatoru na 200 rpm i 28°C.

#### Sastav YPD medijuma:

Rastvor 1.

Ekstrakt kvasca            10g

Pepton                      20g

*Rastvoriti u 900 mL dejonizovane vode i autoklavirati.*

Rastvor 2.

Glukoza                    20g

*Rastvoriti u 80 mL vode i autoklavirati.*

Pomiješati rastvore 1 i 2.

#### **4.6.1.3 Priprema podloge**

Podloga za produkciju CPO je minimalna podloga za *Aspergillus* sa 5% maltodekstrinom i obogaćena sa 0,5% kazein-hidrolizatom i 500 mg/L heminom (dodaje se rastvoren u razblaženom amonijaku) (Conesa *et al.*, 2001).

Aspergillus minimalna podloga (Baratt *et al.*, 1965).

Sastojak            za 1 L

NaNO<sub>3</sub>            6.0 g

KCl                0.52 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O   0.52 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>        1.52 g

*podesiti pH na 6.5 sa NaOH*

Glukoza                                    10.0 g

Hutner-ovi elementi u tragovima    2 mL

#### Hutner-ovi elementi u tragovima

H <sub>2</sub> O	100 ml
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.2 gm
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.1 gm
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.5 gm
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5 gm
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.16 gm
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.16 gm
(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.11 gm
Na <sub>2</sub> EDTA	5.0 gm

Priprema elemenata u tragovima: Zagrijati rastvor do ključanja, ohladiti do 60°C i podesiti pH rastvorom KOH na 6,5-6,8. Rastvor mijenja boju u tamno ljubičastu stajanjem. Ukoliko se prilikom titrovanja pH pretitruje preko 7,0 odbaciti rastvor i napraviti novi.

#### **4.6.1.4 Fermentacija**

Čitav inokulum (30 mL) je prebačen u pripremljenu podlogu u erlenmajer od 2 L. Nakon 24h dodato je 1 mL zasićenog rastvora K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> radi održavanja pH vrijednosti podloge.

Nakon 48h fermentacija je prekinuta; biomasa je odvojena centrifugiranjem na 3200 rpm na 4°C 30 min. Dobijeni supernatant je dodatno izbistren cijedenjem na filter papiru, nakon čega je dodat PMSF da se spriječi dejstvo proteaza. Rastvor se čuva u frižideru do daljih koraka u prečišćavanju.

#### **4.6.1.5 Izolovanje rekombinantne hloroperoksidaze iz fermentacione tečnosti *A.niger***

Fermentaciona tečnost (415 ml) je ponovo centrifugirana na Sorval centrifugi na 10000 o/min 20 min, procedena kroz naborani filter papir i ultrafiltrirana do 15 ml. Aktivnost CPO je iznosila 24 U/ml.

Retenant je frakcionisan jonoizmenjivačkom hromatografijom. Korišćena je kolona sa 50 mL DEAE celuloze (Whatman) ekvilibrisana u 20 mM fosfatnom puferu. Uzorak je prije nanošenja na kolonu rasoljen da bi se uklonili prisutni pigmenti. Prvo su eluirani nevezani proteini početnim puferom, a potom je elucija urađena sa 200 mM fosfatnim puferom. Skupljane su frakcije od po 10 ml. Aktivnost frakcije sa najvećom koncentracijom CPO aktivnosti je iznosila 8 U/ml. Aktivnost katalaze na pH 2,75 je u ovim frakcijama bila jako mala.

#### **4.6.1.6 Određivanje aktivnosti CPO**

U fermentacionoj tečnosti je određena enzimska aktivnost za CPO na sledeći način: reakciona smješa sadrži u finalnim koncentracijama 20 mM KCl, 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mM K-fosfatni pufer, pH 2,75 i 0,16 mM monohlordimedon. Za kontinualne eseje koji su rađeni u zapreminama od 0,5 ml reakcione smješe su pravljene dodavanjem 50 µl 1,6 mM monohlordimedona, 100 µl 100 mM KCl, 262,2 µl pufera 0,25 M, 62,5 µl 16 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 25 µl testiranog uzorka.

#### **4.6.1.7 Ispitivanje mogućnosti primjene CPO za uklanjanje fenola i boja**

Korišćena je najaktivnija frakcija dobijena nakon IEX hromatografijem kojoj je određena peroksidazna aktivnost testom sa gvajakolom (postupak opisan u odjeljku koji se odnosi na određivanje aktivnosti peroksidaze).

Testirane su sledeće boje: PDB, RB52, RG15 i AB, čija je finalna koncentracija iznosila 50 mg/L. Korišćen je 0,1 M acetatni pufer, pH 5. Ispitana je efikasnost obezbojavanja sa vodonik-peroksidom i *terc*-butil peroksidom (tBuOOH).

#### Reakciona smješa sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

Boja (rastvorena već u puferu)	900 µl
CPO	100 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,3%)	10 µl

#### Reakciona smješa sa tBuOOH:

Boja	900 µl
CPO	100 µl
tBuOOH (80%)	5 µl

Uzorcima su snimljeni spektri nakon 2h inkubiranja na sobnoj temperaturi.

Za potrebe testiranja efikasnosti CPO za uklanjanje fenola (*p*-CP, *p*-BP i 2,4,6 trihlorfenol), korišćene su finalne koncentracije fenola od 50 mg/L. Osnovni rastvori fenola su razblaživani u puferu. Testirana je reakcija na pH 3, 5 i 6 (0,1 M acetatni pufer i 0,1M fosfatni pufer).

#### Reakciona smješa:

CPO	25 µl
Fenoli	975 µl
tBuOOH (20xR)	5 µl

Uzorcima su snimljeni spektri nakon 2h inkubiranja na sobnoj temperaturi.

### **4.7 Eksperimenti sa lakazom iz *Trametes versicolor* ATCC 42530**

Soj *T.versicolor* ATCC42530 je dobijen ljubaznošću Dr Gloria Caminal Saperas sa katedre za hemijsko inženjstvo, Universitat Autònoma de Barcelona, Barselona, Španija.

#### **4.7.1 Održavanje soja i priprema inokuluma**

Soj je održavan na Petri šoljama sa sladnim agarom presijavanjem jednom mjesečno i gajenjem na 25°C. Sa ploče stare 7 dana isječeni komadi agara 1x1 cm su korišćeni za inokulaciju tečnog medijuma.

#### **4.7.2 Priprema peleta**

Rastvoru sladnog ekstrakta (20g/L) podesi se pH na 4,5 i odmjeri se 250 mL ovog rastvora u erlenmajer od 1L. Nakon autoklaviranja inokuliše se sa 4 komada 1x1cm prerasle ploče sladnog agara. Nakon sedam dana dobijena masa micelijuma se prebaci u sterilni rastvor 0,85% NaCl i homogenizuje rotor/stator homogenizatorom. Za

produkciju peleta koristi se 1 mL dobijene suspenzije kojim se inokuliše 250 mL 2% sladnog ekstrakta. Za rast peleta potrebno je 5-7 dana. Tokom ovog perioda lakaza se aktivno sintetiše i luči u medijum. Nakon odvajanja biomase filtriranjem fermentaciona tečnost se koncentruje deset puta liofilizacijom i koristi u eksperimentima obezbojavanja.

### **Statistika**

Svi eksperimentalni rezultati dobijeni u ovoj disertaciji predstavljaju srednje vrijednosti ponovljenih eksperimentalnih rezultata (duplikati ili triplikati, zavisno od eksperimenta). Standardna devijacija (SD), statistička značajnost (određivana t-testom,  $p < 0,05$ ), kao i grafički rezultati urađeni su u softverskom paketu Origin 8.0.

## 5. Literatura

Adebajo MO, Frost RL, Kloprogge JT, Carmody O, Kokot S, Porous materials for oil spill cleanup: a review of synthesis and absorbing properties. *J Porous Materials* **10** (2003) 159–170.

Alexandre G, Zhulin IB, Laccases are widespread in bacteria. *Trend Biotechnol* **18** (2000) 41–42.

Alpat SK, Ozbayrak O, Alpat S, Akcay H, The adsorption kinetics and removal of cationic dye, Toluidine Blue O, from aqueous solution with Turkish zeolite. *J Hazard Mater* **151** (2008) 213–220.

Akhtar S, Khan AA, Husain Q, Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. *Chemosphere* **60** (2005) 291-301.

Akhtar S, Khan AA, Husain Q, Partially purified bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. *Biores Tech* **96** (2005) 1804–1811.

Aktas N, Kibarer G, Tanyolac A, Effects of reaction conditions on laccase catalyzed  $\alpha$ -naphthol polymerization. *J Chem Tech Biotech* **75** (2000) 840-846.

Aktas N, Sahiner N, Kantoglu O, Salih B, Tanyolac A, Biosynthesis and characterization of laccase catalyzed poly(catechol). *J Polym Environ* **11** (2003) 123-128.

Alemzadeh I, Nejati S, Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase, *J Hazard Mater* **166** (2009) 1082 – 1086.

Alexander F, McKay G, Kinetics of removal of basic dye from effluent using silica. *Chem Eng* **319** (1977) 243–246.

Arica MY, Immobilization of polyphenol oxidase on carboxymethylcellulose hydrogel beads: preparation and characterization. *Polym Int* **49** (2000) 775 – 781.

Armenante PMD, Kafkewitz D, Lewandowski GA, Jou CJ, Anaerobic-aerobic treatment of halogenated phenolic compounds. *Water Res* **33** (1999) 681-692.

Arnao MB, Acosta M, del Rio JA, Varon R, Garcia-Canovas F, A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1041** (1990) 43-47.

Ashraf H, Husain Q, Studies on bitter gourd peroxidase catalyzed removal of p-bromophenol from wastewater. *Desalination* **262** (2010) 267 – 272.

Axen R, Drevin H, Carlsson J, Preparation of modified agarose gels containing thiol groups, *Acta Chem Scan B* **29** (1975) 471 – 474.

Ayala M, Batista CV, Vazquez-Duhalt R, Heme destruction, the main molecular event during the peroxide-mediated inactivation of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *J Biol Inorg Chem* **16** (2011) 63-8.

Bandala ER, Pelaez MA, Garcia-Lopez AJ, Salgado MJ, Moeller G, Photocatalytic decolourisation of synthetic and real textile wastewater containing benzidine-based azo dyes. *Chem Eng Proces* **47** (2008) 169–176.

Baneyx F, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech* **10** (1999) 411–421.

Baneyx F, Mujacic M, Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **22** (2004) 1399-1408.



Bansal RC, Goyal M, Activated Carbon Adsorption. Taylor & Francis Group, Boca Raton (2005).

Barratt RW, Johnson GB, Ogata WN, Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52** (1965) 233-46.

Baynton KJ, Bewtra JK, Biswas N, Taylor KE, Inactivation of horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochim Biophys Acta* **1206** (1994) 272-278.

Bhunia A, Durani S, Wangikar P, Horseradish Peroxidase Catalyzed Degradation of Industrially important dyes. *Biotech bioeng* **72** (2001) 562-567.

Bickerstaff G, Immobilization of enzymes and cells, Humana Press (1997).

Bisschops I, Spanjers H, Literature review on textile wastewater characterization. *Environ Tech* **24** (2003) 1399-1411.

Blanke SR, Hager LP, Identification of the fifth axial heme ligand of chloroperoxidase. *J Biol Chem* **263** (1988) 18739-18743.

Bollag JM, Leonowicz A, Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl Environ Microbiol* **48** (1984) 849-854.

Bornscheuer UT, Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts. *Angewandte Chemie Int Ed* **42** (2003), 3336-3337.

Burton SG, Biocatalysis with polyphenoloxidase: a review. *Catal Today* **22** (1994) 459-487.

Busca G, Berardinelli S, Resini C, Arrighi L, Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *J Hazard Mater* **160** (2008) 265-288.

Cao L, van Langen L, Sheldon RA, Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Cur Opin Biotech* **14** (2003), 387–394.

Carbon Enterprises Inc. (CEI) Filtration, Internet stranica, URL: <http://www.ceifiltration.com/filtration.asp?p=greensand>.

Chattopadhyay K, Mazumdar S, Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. *Biochemistry* **39** (2000) 263-270.

Chedeville O, Debacq M, Ferrante Almanza M, Porte C, Use of an ejector for phenol containing water treatment by ozonation. *Sep Purif Technol* **57** (2007) 201–208.

Cheng MM, Ma WH, Li J, Huang YP, Zhao JC, Visible-light-assisted degradation of dye pollutants over Fe(III)-loaded resin in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at neutral pH values. *Environ Sci Tech* **38** (2004) 1569–1575.

Cheng HR, Jiang N, Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotech Lett* **28** (2006) 55-59.

Cheremisinoff NP, Handbook of Water and Wastewater Treatment Technologies. Butterworth-Heinemann, Boston (2002).

Cho E, Seo J, Lee DW, Pan JG, Decolorization of indigo carmine by laccase displayed on *Bacillus subtilis* spores. *Enz Microb Tech* **49** (2011) 100–104.

Christie R, Colour Chemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (2001).

Chroma L, Macek T, Demnerova K, Mackova M, Decolorization of RBBR by plant cells and correlation with the transformation of PCBs. *Chemosphere* **49** (2002) 739-748.

Clark PA, Solomon EI, Magnetic circular-dichroism spectroscopic definition of the intermediate produced in the reduction of dioxygen to water by native laccase. *J Am Chem Soc* **114** (1992) 1108–1112.

Claus H, Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* **179** (2003) 145-150.

Claus H, Filip Z, The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiol Res* **152** (1997) 209-216.

Cole JL, Tan GO, Yang EK, Hodgson KO, Solomon EI, Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an X-ray absorption Edge Study. *J Am Chem Soc* **112** (1990) 2243–9.

Conesa A, de Velde F, Rantwijk F, Sheldon RA, den Hondel C, Punt PJ, Expression of the *C. fumago* chloroperoxidase in *A.niger* and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* **276** (2001) 17635-17640.

Contreras S, Rodriguez M, Al Momania F, Sansa C, Esplugasa S, Contribution of the ozonation pre-treatment to the biodegradation of aqueous solutions of 2,4-dichlorophenol. *Water Res* **37** (2003) 3164-3171.

Cooper VA, Nicell JA, Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Res* **30** (1996) 954-964.

Cordi L, Minussi RC, Freire V, Duran N, Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *Afric J Biotech* **6** (2007) 1255-1259.

de Souza, SMAGU, Forgiarini E, de Souza AAU, Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *J Hazard Mater* **147** (2007) 1073–1078.

Do DD, Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics. Imperial College Press, London (1998).

Dogan D, Turkdemir H, Electrochemical oxidation of textile dye indigo. *J Chem Tech Biotech* **80** (2005) 916–923.

Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Brown SH, Östergaard P, Schneider P, Crystal structure of the Type 2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat Struct Biol* **5** (1998) 310–6.

Dunford HB, Stillman JS, On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coord Chem Rev* **19** (1976) 187-251.

Dunford HB, Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: Everse, J., Everse, K.E. and Grisham, M.B. (eds.), *Peroxidases in Chemistry and Biology* Vol. II. (pp. 1-24). CRC Press, Boca Raton, Florida (1991).

Duran N, Esposito E, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, *Appl Catal B Environ* **28** (2000) 83 – 99.

Duran N, Rosa MA, D'Annibal A, Gianfreda L, Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enz Microb Technol* **31** (2002) 907 – 931.

Durao P, Chen Z, Fernandes AT, Hilderbrandt P, Murgida DH, Todorovic S, Pereira MM, Melo EP, Martins LO, Copper incorporation into recombinant CotA laccase from

*Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes. *J Biol Inorg Chem* **12** (2008a) 183-193.

Durao P, Bento I, Fernandes AT, Melo EP, Lindley PF, Martins LO: Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *J Biol Inorg Chem* **11** (2006) 514-526.

Durao P, Chen Z, Silva CS, Soares CM, Pereira MM, Todorovic S, Hildebrandt P, Bento I, Lindley PF, Martins LO: Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants. *Biochem J* **412** (2008b) 339-346.

Elliott KA, Oxidations catalysed by horseradish- and milk-peroxidases. *Biochem J* **26** (1932) 1281-1290.

Endo K, Hayashi Y, Hibi T, Hosono K, Beppu T, Ueda K, Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J Biochem* **133** (2003) 671-677.

Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA, Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J Biol Chem* **278** (2003) 19416-19425.

Environmental Protection Agency, EPA, internet stranica URL:  
<http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF//2000LNAI.PDF>

Espin JC, Wichers HJ, Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J Agric Food Chem* **47** (1999) 3518 – 3525.

Fang Z, Li T, Wang Q, Zhang X, Peng H, Fang W, Hong Y, Ge H, Xiao Y, A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. *Appl Microbiol Biotech* **89** (2011) 1103–1110.

Festa G, Autore F, Fraternali F, Giardina P, Sannia G, Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses. *Proteins* **72** (2008) 25-34.

Fibre2Fashion, internet stranica, URL: <http://www.fibre2fashion.com/industry-article/textile-industry-articles/textile-effluent-treatment/textile-effluent-treatment1.asp>

Forootanfar H, Faramarzi MA, Shahverdi AR, Yazdi MT, Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*, *Biores Tech* **102** (2011) 1808–1814.

Fry SC, Polymer-bound phenols as natural substrates of peroxidases. In: Greppin H, Penel C, Gaspar Th (eds.), *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (pp. 169-182). University of Geneva, Switzerland (1986).

Fujiyama K, Takemura H, Shibayama S, Kobayashi K, Choi JK, Shinmyo A, Takano M, Yamada Y, Okada H, Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes. *Eur J Biochem* **173** (1988) 681–687.

Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct Biol* **4** (1997) 1032-1038.

Gianfreda L, Xu F, Bollag JM, Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J* **3** (1999) 1–25.

Goi A., M. Trapido, T. Tukhanen, A study of toxicity, biodegradability, and some by-products of ozonised nitrophenols. *Adv Environ Res* **8** (2004) 303-311.

Godfrey T, West S, Industrial Enzymology, 2nd ed., Macmillan Press, United Kingdom (1996) 30–36.

Gordon PF, Gregory P, Organic Chemistry in Colour. Springer, Berlin (1983).

Grecchio C, Ruggiero P, Pizzigallo M, Polyphenoloxidases immobilized in organic gels: Properties and applications in the detoxification of aromatic compounds. *Biotech Bioeng* **48** (1995), 585-591.

Gupta VK, Suhas Application of low-cost adsorbents for dye removal – A review. *J Environ Manag* **90** (2009), 2313-2342.

Hager LP, Morris DR, Brown FS, Eberwein H., Chloroperoxidase 2. Utilization of Halogen Anions. *J Biol Chem* **241** (1966) 1769-1777.

Hakulinen R, Woods S, Ferguson J, Benjamin M, The Role of Facultative Anaerobic Micro-Organisms in Anaerobic Biodegradation of Chlorophenols. *Water Sci Tech* **17** (1985) 289-301.

Hartmeier W, Immobilized biocatalysts, An introduction, 1988, Springer-Verlag.

Held C, Kandelbauer A, Schroeder M, Cavaco-Paulo A, Guebitz GM, Biotransformation of phenolics with laccase containing bacterial spores, *Environ Chem Lett* **3** (2005) 74–77.

Henriksen A, Smith AT, Gajhede M, The structure of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *J Biol Chem* **274** (1999) 35005- 35011.

Hessel C, Allegre C, Maisseu M. Charbit F, Moulin P, Guidelines and legislation for dye house effluents. *J Environ Manag* **83** (2007) 171-180.

Hiner ANP, Hernandez-Ruiz J, Arnao MB, Garcia-Canovas F, Acosta M, A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotech Bioeng* **50** (1996) 655-662.

Hublik C, Schinner F, Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enz Microb Tech* **27** (2000), 330-336.

Hullo MF, Moszer I, Danchin A, Martin-Verstraete I: CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J Bacteriol* **183** (2001) 5426-5430.

Hunger K, Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications. Wiley-VCH, Weinheim; Cambridge (2003).

Josephy DP, Eling T, Mason RP, The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. *J Biol Chem* **7** (1982) 3669-3675.

Johannes C, Majcherczyk A, Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J Biotech* **78** (2000) 193-199.

Jordan W, van Barneveld H, Gerlich O, Kleine-Boymann M, Ullrich J, Phenol, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag (2002).

Kace JS, Linford HB, Reduced cost flocculation of a textile dyeing wastewater. *J Water Pol Ctrl Fed* **47** (1975) 1971-1980.

Karam J, Nicell JA. Potential applications of enzymes in waste treatment. *J Chem Tech Biotech* **69** (1997) 141-53.

Kay E, Shannon LM, Lew JY, Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. II Catalytic properties. *J Biol Chem* **242** (1967) 2470-2473.



Khan AA, Akhtar S, Husain Q, Direct immobilization of polyphenol oxidase on Celite 545 from ammonium sulphate fractionated proteins of potato (*Solanum tuberosum*). *J Mol Cat B Enz* **40** (2006) 58–63.

Khan AA, Husain Q, Decolorization and removal of textile and non-textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent by using potato (*Solanum tuberosum*) soluble and immobilized polyphenol oxidase. *Biores Tech* **98** (2007) 1012-1019.

Klabunde T, Eicken T, Sacchettini JC, Krebs B, Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol* **5** (1998) 1084–1090.

Klibanov AM, Alberti BN, Morris ED, Felshin LM, Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. *J Appl Biochem* **2** (1980) 414-421.

Klibanov AM, Morris ED, Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enz Microb Technol* **3** (1981) 119-122.

Klibanov AM, Tu TM, Scott KP, Peroxidase-Catalyzed Removal of Phenols from Coal-Conversion Waste Waters. *Science* **221** (1983) 259-261.

Kok FN, Arica MY, Gencer O, Abak K, Hasirci V, Controlled Release of aldicarb from carboxymethylcellulose microspheres in vitro and field applications. *Pesticide Sci* **55** (1999) 1194 - 1202.

Koschorreck K, Richter SM, Ene AB, Roduner E, Schmid RD, Urlacher VB, Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* **79** (2008) 217-224.

Koschorreck K, Schmid RD, Urlacher VB, Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis, *BMC Biotech* (2009) doi:10.1186/1472-6750-9-12.

Kurniawati S, Nicell JA, Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Enz Microb Tech* **41** (2007) 353–361.

Kuwana R, Kasahara Y, Fujibayashi M, Takamatsu H, Ogasawara N, Watabe K, Proteomics characterization of novel spore proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148** (2002) 3971–3982.

Kwon DY, Kim WY, Purification of the glycosylated polyphenol oxidase from potato tuber. *J Biochem Mol Biol* **29** (1996) 163-168.

Lacasse K, Baumann W, Textile Chemicals. Environmental Data and Facts, Springer. (2006).

Lane DJ, 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow MM (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematic. Wiley, Chichester (1991) 115–175.

La Rotta CE, Bon EP, 4-chlorophenol degradation by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*: formation of insoluble products. *Appl Biochem Biotechnol* **98** (2002) 191-203.

Laszlo K, Podkoscielny P, Dabrowski A, Heterogeneity of polymer-based active carbons in the adsorption of aqueous solutions of phenol and 2,3,4- trichlorophenol, *Langmuir* **19** (2003) 5287–5294.

Li Rosi O, Casarci M, Mattioli D, De Florio L, Best available technique for water reuse in textile SMEs (BATTLE LIFE Project). *Desalination* **206** (2007), 614-619.

Li X, Wei ZY, Zhang M, Peng XH, Yu GZ, Teng MK, Gong WM, Crystal structures of *E.coli* laccase CueO at different copper concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* **354** (2007) 21-26.

Liu JZ, Wang TL, Ji LN, Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase. *J Mol Catal B Enz* **42** (2006) 81-86.

Levy I, Ward G, Hadar Y, Shoseyov O, Dosoretz CG, Oxidation of 4-bromophenol by the recombinant fused protein cellulose-binding domain-horseradish peroxidase immobilized on cellulose. *Biotech. Bioeng* **82** (2003) 223 - 231.

Lewis NG, Davin LB, Sarkanen S, The nature and function of lignins. In: Barton, D., Nakanishi, K. and Meth-Cohn, O. (eds.), *Comprehensive Natural Products Chemistry* Vol. **3**. (pp 617). Elsevier Science, New York (1999).

Lideed DR, CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005, <<http://www.hbcnetbase.com>>, CRC Press, BocaRaton, FL, 2005.

Lončar N, Božić N, Anđelković I, Milovanović A, Dojnov B, Vujčić M, Roglić G, Vujčić Z, Removal of aqueous phenol and phenol derivatives by immobilized potato polyphenol oxidase. *J Serb Chem Soc* **76** (2011) 513-522.

Lončar N, Janović B, Vujčić M, Vujčić Z, Decolorization of textile dyes and effluents using potato (*Solanum tuberosum*) phenoloxidase. *Int Biodeter Biodeg* **72** (2012) 42-45.

Lončar N, Vujčić Z, Tentacle carrier for immobilization of potato phenol oxidase and its application for halogenophenols removal from aqueous solutions. *J Hazard Mater* **196** (2011) 73-78.

Longoria A, Tinoco R, Vázquez-Duhalt R, Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds. *Chemosphere* **72** (2008) 485–490.

Lopez-Serrano D, Sanchez-Amat A, Solano F, Cloning and Molecular Characterization of a SDS-Activated Tyrosinase from *Marinomonas mediterranea*. *Pigment Cell Res* **15** (2002) 104 – 111.

Lu L, Zhao M, Wang TN, Zhao LY, Du MH, Li TL, Li DB, Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04. *Biores tech* **115** (2012) 35-40.

Madigan, M.T., Martinko J.M., Brock Biology Of Microorganisms, 11<sup>th</sup> Ed, Pearson, Prentice Hall (2006).

Majeau JA, Brar SK, Tyagi RD, Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Biores Tech* **101** (2010), 2331-2350.

Mantell CL, In: Adsorption, second ed. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York (1951).

Marcucci M, Nosenzo G, Capannelli G, Ciabatti I, Corrieri D, Ciardelli G, Treatment and reuse of textile effluents based on new ultrafiltration and other membrane technologies. *Desalination* **138** (2001) 75–82.

Marin-Zamora ME, Rojas-Melgarejo F, Garcia-Canovas F, Garcia-Ruiz PA, Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on D-sorbitol cinnamic ester. *J Biotech* **126** (2006) 295 - 303.

Marklund S, Ohlsson PI, Opara A, Paul KG, The substrate profiles of the acidic and slightly basic horseradish peroxidase. *Biochim Biophys Acta* **350** (1974) 304-313.

Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques, AO, Molecular and Biochemical Characterization of a Highly Stable Bacterial Laccase That Occurs as a Structural Component of the *Bacillus subtilis* Endospore Coat. *J Biol Chem* **277** (2002) 18849–18859.

Matto M, Husain Q, Decolorization of direct dyes by immobilized turnip peroxidase in batch and continuous processes. *Ecotoxicol Env Saf* **72** (2009) 965-971.

Mateo C, Fernandez-Lorente G, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules* **1** (2000) 739–745.

Mayer AM, Staples RC, Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem* **60** (2002) 551-565.

McGuirl MA, Dooley DM. Copper-containing oxidases. *Curr Opin Chem Biol* **3** (1999) 138–144.

McKay G, Porter JF, Prasad GR, The removal of dye colours from aqueous solutions by adsorption on low-cost materials. *Water Air Soil Pol* **114** (1999) 423–438.

Meng LZ, Du CQ, Chen YY, He YB, Preparation, Characterization, and Behavior of Cellulose–Titanium(IV) Oxide Modified with Organosilicone. *J Appl Polymer Sci* **84** (2002) 61-66.

Merck Index, 14<sup>th</sup> Ed., Merck & Co. Inc., NJ, USA, 2006.

Mishra G, Tripathy M, A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Colourage* **40** (1993) 35–38.

Miyazaki K, A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* **9** (2005) 415-425.

Moore BM, Flurkey WH, Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. *J Biol Chem* **265** (1990) 4982 – 4988.

Mustafa R, Muniglia L, Rovel B, Girardin M, Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Res Int* **38** (2005) 995-1000.

Namboodri CG, Perkins WS, Walsh WK, Decolorizing dyes with chlorine and ozone: Part I. *Am Dyestuff Rep* **83** (1994), 17–22.

Nasser NM, el Geundi M, Comparative cost of color removal from textile effluents using natural adsorbents. *J Chem Tech Biotech* **50** (1991) 257-264.

Nelson JM, Griffin EG, Adsorption of invertase. *J Am Chem Soc* **38** (1916) 1109–1115.

Neyens E, Baeyens J, A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J Hazard Mater* **98** (2003) 33–50.

Nicell JA, Bewtra JK, Biswas N, St. Pierre C, Taylor KE, Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from aqueous solutions. *Can J Civ Eng* **20** (1993) 725-735.

Nilsson R, Nordlinder R, Wass U, Asthma, rhinitis and dermatitis in workers exposed to reactive dyes. *Brit J Ind Med* **50** (1993) 65-70.

Ogawa S, Shiro Y, Morishima I, Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure. *Biochem Biophys Res Commun* **90** (1979) 674-678.

O'Neill C, Hawkes FR, Hawkes DL, Lourenco ND, Pinheiro HM, Delée W, Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge contents and simulation: a review. *J Chem Tech Biotech* **74** (1999) 1009-1018.

Onder S, Celebi M, Altikatoglu M, Hatipoglu A, Kuzu H, Decolorization of Naphtol Blue Black using the Horseradish Peroxidase. *Appl Biochem Biotechnol* **163** (2011) 433-443.

Pak D, Chang W, Decolorizing dye wastewater with low temperature catalytic oxidation. *Water Sci Tech* **40** (1999) 115-121.

Palmer AE, Randall DW, Xu F, Solomon EI, Spectroscopic studies and electronic structure description of the high potential Type 1 copper site in fungal laccase: insight into the effect of the axial ligand. *J Am Chem Soc* **121** (1999) 7138–7149.

Palmieri G, Giardina P, Desiderio B, Marzullo L, Giamberini M, Sannia G, A new immobilization procedure using copper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase. *Enz Microb Technol* **16** (1994) 151 – 158.

PeroxiBase, Internet stranica, URL: <http://peroxidase.isb-sib.ch>

Pesic M, Lopez C, Alvaro G, Chloroperoxidase catalyzed oxidation of Cbz-ethanolamine to Cbz-glycinal. *Biochem Eng J* **67** (2012) 218-224.

Piacquadio P, De Stefano G, Sammartino M, Sciancalepore V, Phenols removal from apple juice by laccase immobilized on Cu<sup>2+</sup>-chelate regenerable carrier. *Biotechnol Techniq* **11** (1997) 515 – 517.

Pines O, Inouye M, Expression and secretion of proteins in *E. coli*, *Mol Biotechnol* **12** (1999) 25–34.

Pramparo L, Stuber F, Font J, Fortuny A, Fabregat A, Bengoa C, Immobilisation of horseradish peroxidase on Eupergit C for the enzymatic elimination of phenol, *J Hazard Mater* **177** (2010) 990 - 1000.

Premier Water, Internet stranica, URL: <http://www.premierwatermn.com/birm-iron-filter-whole-house-water-filter/>

Prigione V, Tigini V, Pezzella C, Anastasi A, Sannia G, Varese GC, Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. *Water Res* **42** (2008) 2911–2920.

Puertas JM, Betton JM, Engineering an efficient secretion of leech carboxypeptidase inhibitor in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* **8** (2009) 57-62.

Rai HS, Bhattacharyya MS, Singh J, Bansal TK, Vats P, Banerjee UC, Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Crit Rev Environ Sci Tech* **35** (2005) 219–238.

Reiss R, Ihssen J, Thöny-Meyer L, *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotech* (2011) doi:10.1186/1472-6750-11-9.

Richard-Forget F, Goupy P, Nicolas J, New approaches for separating and purifying apple polyphenol oxidase isoenzymes: hydrophobic, metal chelate and affinity chromatography. *J Chrom A* **667** (1994) 141 - 153.

Riu J, Schonsee I, Barcelo D, Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/ mass spectrometry. *J Mass Spec* **33** (1998) 653-663.

Roberts SA, Weichsel A, Grass G, Thakali K, Hazzard JT, Tollin G, Rensing C, Montfort WR, Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Nat Ac Sci USA* **99** (2002) 2766-2771.

Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P, Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Biores Tech* **77** (2001) 247–255.

Rodgers CJ, Blanford CF, Giddens SR, Skamnioti P, Armstrong FA, Gurr SJ, Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends Biotech* **28** (2010) 63–72.

Rogalski J, Jozwik E, Hataka A, Leonowicz A, Immobilization of laccase from *Phlebia*



radiata on controlled porosity glass. *J Mol Cat A Chem* **95** (1995) 99-108.

Roriz MS, Osma JF, Teixeira JA, Rodríguez Couto S, Application of response surface methodological approach to optimise Reactive Black 5 decolouration by crude laccase from *Trametes pubescens*. *J Hazard Mater* **169** (2009) 691-696.

Ruijsenaars HJ, Hartmans S, A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* **65** (2004) 177-182.

Safe Water Technologies, Inc, internet stranica, 2012, URL: [http://www.swtwater.com/catalog/1305\\_mtm.htm](http://www.swtwater.com/catalog/1305_mtm.htm)

Sambrook J, Russell DW, Molecular cloning – a laboratory manual. CSHL Press (2001).

Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1247** (1995) 1–11.

Sandman K, Kroos L, Cutting S, Youngman P, Losick R, Identification of the promoter for a spore coat protein gene in *Bacillus subtilis* and studies on the regulation of its induction at a late stage of sporulation. *J Mol Biol* **200** (1988) 461-473.

Savin II, Butnaru R, Wastewater characteristics in textile finishing mills. *Environ Eng Manag J* **7** (2008) 859-864.

Schaeffer P, Millet J, Aubert JP, Catabolic repression of bacterial sporulation, *Proc Natl Acad Sci USA* **54** (1965) 704–711.

Schmidt RJ, Industrial catalytic processes-phenol production. *Appl Catal A Gen* **280** (2005) 89–103.

Selinheimo E, NiEidhin D, Steffensen C, Nielse J, Lomascolo A, Halaouli S, Record E, O'Beirne D, Buchert J, Kruus K, Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *J Biotechnol* **130** (2007) 471-480.

Shannon LM, Kay E, Lew JY, Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. *J Biol Chem* **241** (1966) 2167-2172.

Silva MR, Sa LRV, Russo C, Scio E, Ferreira-Leitao VS, The use of HRP in decolorization of reactive dyes and toxicological evaluation of their products. *Enz Res* (2010) doi:10.4061/2010/703824.

Slokar YM, Le Marechal AM, Methods of decoloration of textile wastewaters. *Dyes Pig* **37** (1998) 335–356.

Smith MA, Gillespie PC, Ionization of deae-cellulose: dependence of pK on ionic strength. *J Chrom A* **469** (1989) 111 - 120.

Soares OSGP, Orfao JJM, Portela D, Vieira A, Pereira MFR, Ozonation of textile effluents and dye solutions under continuous operation: Influence of operating parameters. *J Hazard Mater* **137** (2006) 1664–1673.

Solomon EI, Sundaran UM, Machonkin TE, Multicopper oxidase and oxygenases. *Chem Rev* **96** (1996) 2563–605.

Sun W, Kadima TA, Pickard MA, Dunford HB, Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. *Biochem Cell Biol* **72** (1994) 321-331.

Sun QY, Hong YZ, Xiao YZ, Fang W, Fang J, Decolorization of textile reactive dyes by the crude laccase produced from solid-state fermentation of agro-byproducts. *World J Microb Biotech* **25** (2009) 1153–1160.

Sundaran UM, Zhang HH, Hedman B, Hodgson KO, Solomon EI. Spectroscopic investigation of peroxide binding to the trinuclear copper cluster site in laccase: correlation with the peroxy-level intermediate and relevance to catalysis. *J Am Chem Soc* **119** (1997) 12525–12540.

Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y, A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci Biotechnol Biochem* **67** (2003) 2167-2175.

Tatsumi K, Wada S, Ichikawa H, Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnol Bioeng* **51** (1996) 126-130.

Telke AA, Joshi SM, Jadhov SU, Tamboli DP, Govindwar SP, Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas sp.* SU-EBT. *Biodegradation* **21** (2010) 283-296.

Telke AA, Ghodake GS, Kalyani DC, Dhanve RS, Govindwar SP, Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus sp.* ADR, *Biores Tech* **102** (2011) 1752–1756.

Terzyk AP, The impact of carbon surface chemical composition on the adsorption of phenol determined at the real oxic and anoxic conditions. *Appl Surf Sci* **253** (2007) 5752–5755.

Thurston CF, The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140** (1994) 19–26.

Thygesen PW, Dry IB, Robinson SP, Polyphenol Oxidase in Potato (A Multigene Family That Exhibits Differential Expression Patterns). *Plant Phys* **109** (1995) 525-531.

Tien M, Kirk TK, Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* **221** (1983) 661–663.

Tong Z, Qingxiang Y, Hui H, Qin L, Yi Z, Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. *Chemosphere* **34** (1997) 893 - 903.

Torres E, Ayala M, Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Springer (1995).

Torres E, Bustos-Jaimes I, Borgne, SL, Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl Catal B Environ* **46** (2003) 1–15.

Unyayar A, Mazmanci MA, Atacag H, Erkurt EA, Coral G, A Drimaren Blue X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia trogii*: one step isolation and identification. *Enz Microb Tech* **36** (2005) 10–16.

Valenzuela J, Bumann U, Cespedes R, Padilla L, Gonzalez B, Degradation of Chlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4) in Bleached Kraft Mill Effluent. *Appl Environ Microbiol* **63** (1997) 227-232.

van de Velde F, Lourenco ND, Pinheiro HM, Bakker M, Carrageenan: a foodgrade and biocompatible support for immobilisation techniques. *Adv Synth Catal* **344** (2002) 815-835.

Vandevivere PC, Bianchi R, Verstraete W, Treatment and Reuse of Wastewater from the Textile Wet-Processing Industry: Review of Emerging Technologies. *J Chem Tech Biotech* **72** (1998) 239-302.

Verma P, Baldrian P, Nerud F, Decolorization of structurally different synthetic dyes using cobalt( II )/ascorbic acid/hydrogen peroxide system. *Chemosphere* **50** (2003) 957-979.

Venkataraman K, The Chemistry of Synthetic Dyes. Academic Press Inc., New York (1965).

Vujčić Z, Lončar N, Dojnov B, Milovanović A, Vujčić M, Božić N, Characterization of leucylaminopeptidase from *Solanum tuberosum* tuber. *Food Chem* **121** (2010) 418–423.

Vujčić Z, Eksperimentalna biohemija, Praktikum, Beograd, 2002.

Wada S, Ichikawa H, Tatsumi K, Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *Biotech Bioeng* **42** (1993) 854 – 858.

Wada S, Ichikawa H, Tatsumi K, Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. *Biotech Bioeng* **45** (1995) 304–309.

Wang S, A Comparative study of Fenton and Fenton-like reaction kinetics in decolourisation of wastewater. *Dyes Pig* **76** (2008) 714–720.

Wang CL, Lei Lu MZ, Wei XD, Li TL, Characterization of spore laccase from *Bacillus subtilis* WD23 and its use in dye decolorization, *Afr J Biotech* **10** (2011) 2186-2192.

Wagner M., J. A. Nicell, Treatment of a foul condensate from Kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res* **35** (2001) 485-495.

Woodward J, Immobilized cells and enzymes, a practical approach, IRL press, Oxford Washington DC (1985).

Xu F, Damhus T, Danielsen S, Ostergaard LH, Catalytic applications of laccase. In *Modern Biooxidation* Edited by: Schmid RD, Urlacher VB. Weinheim: Wiley-VCH; (2007) 43-75.

Xu F, Kulys JJ, Duke K, Li KC, Krikstopaitis K, Deussen HJW, et al. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of *N*-hydroxy compounds. *Appl Environ Microbiol* **66** (2000) 2052–2056.

Yamada K, Akiba Y, Shibuya T, Kashiwada A, Matsuda K, Hirata M, Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads. *Biotechnol Prog* **21** (2005) 823 – 829.

Yaropolov AI, Skorobogatko OV, Vartanov SS, Varfolomey SD, Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl Biochem Biotechnol* **49** (1994) 257–80.

Yi X, Mroczko M, Manoj KM, Wang X, Hager LP, Replacement of the proximal heme thiolate ligand in chloroperoxidase with a histidine residue. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** (1999) 12412-12417.

Zhang J, Fenga M, Jianga Y, Hua M, Li S, Zhai Q, Efficient decolorization /degradation of aqueous azo dyes using buffered H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation catalyzed by a dosage below ppm level of chloroperoxidase. *Chem Eng J* **191** (2012) 236– 242.

Zhou Y, Liang Z, Wang Y, Decolorization and COD removal of secondary yeast wastewater effluents by coagulation using aluminum sulfate. *Desalination* **225** (2008) 301–311.

Zumarraga M, Camarero S, Shleev S, Martinez-Arias A, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M, Altering the laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra. *Proteins* **71** (2008) 250-260.

Sejáková Z, Dercová K, Tóthová L, Biodegradation and ecotoxicity of soil contaminated by pentachlorophenol applying bioaugmentation and addition of sorbents. *World J Microb Biotech* **25** (2009) 243-252.

## **Biografija autora**

Nikola Lončar je rođen 16. novembra 1986. godine u Podgorici, Republika Crna Gora. Upisao je Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, 2005. godine, a diplomirao 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,50 po ubrzanom programu studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Studijski program doktor biohemijskih nauka na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je u oktobru 2009. godine.

Od 01.10.2009. godine zaposlen je na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, kao istraživač-pripravnik, a od 01.04.2010. zaposlen je u zvanju istraživač saradnik u Inovacionom centru Hemijskog fakulteta.

Trenutno je angažovan na projektima koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod brojevima 172048 i 172055.

Oblasti naučnog interesovanja su ispitivanja oksidativnih enzima (fenol-oksidade, peroksidaze i lakaze) u smislu izolovanja i karakterizacije, kao i upotrebe u uklanjanju fenola i boja iz vodenih rastvora.

Dobitnik je (a) EMBO short term fellowship za tromesečni boravak u Institutu za Genetiku, Keln, Nemačka, 2010.god.; (b) FEBS grant za "Practical Course: Bioinformatics for the Bench Biologist", Dubrovnik, Hrvatska, 2012.god.; (c) ICGEB grant za Teorijski i praktični kurs "Bioinformatics: Computer Methods in Molecular and Systems Biology", Trst, Italija, 2012.god.; (d) ima dva studijska boravka na Katedri za hemijsko inženjerstvo Autonomnog Univerziteta Barselone (Barselona, Španija) u cilju realizacije projekta bilateralne saradnje, 2011.god. i 2012.god.

Objavio je 8 naučnih radova u međunarodnim časopisima, od toga 4 iz kategorije M21, 1 iz kategorije M22 i 3 iz kategorije M23. Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije i Srpskog mikrobiološkog društva.

**PRILOZI**



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани: Никола Лончар

број уписа: ДБ 6/2009

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

#### Уклањање фенола и боја из отпадне воде природним и рекомбинантним оксидативним ензимима

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

Потпис докторанда

У Београду, 23. октобра 2012.

Никола Лончар

Прилог 2.

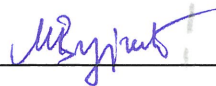
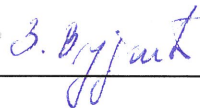
## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Никола Лончар  
Број уписа: ДБ 6/2009  
Студијски програм: доктор биохемијских наука  
Наслов рада:

**Уклањање фенола и боја из отпадне воде природним и рекомбинантним  
оксидативним ензимима**

Ментори: в.проф. др Зоран Вујчић и научни сарадник др Мирослава Вујчић

Потписани



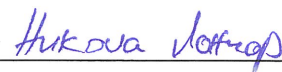
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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, 23. октобра 2012.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

### Уклањање фенола и боја из отпадне воде природним и рекомбинантним оксидативним ензимима

која је моје ауторско дело.

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

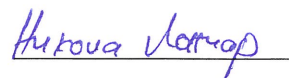
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 23. октобра 2012.



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.