

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Barbara S. Jožef

PRIMENA RASTVORNIH I
IMOBILIZOVANIH IZOFORMI
PEROKSIDAZE IZ RENA U UKLANJANJU
OBOJENIH KSENOBIOTIKA IZ OTPADNE
VODE

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Barbara S. Jožef

APPLICATION OF SOLUBLE AND
IMMOBILIZED HORSERADISH
PEROXIDASE ISOFORMS IN
DEGRADATION OF COLORED
XENOBIOTICS FROM WASTE WATER

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018

Mentori: **prof. dr Zoran Vujčić**, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Miroslava Vujčić, viši naučni saradnik
Centar za Hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije: **prof. dr Zoran Vujčić**, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Miroslava Vujčić, viši naučni saradnik
Centar za Hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i
metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

prof. dr Dušan Sladić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Mojim dragim roditeljima

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof dr Zorana Vujčića i dr Miroslave Vujčić.

Zahvaljujem se svom profesoru i mentoru dr Zoranu Vujčiću na pruženoj prilici, nesebičnom znanju i podršci bez čega bi ovaj rad ostao samo „dobra ideja za jedno istraživanje“. Veliko hvala na poverenju, brojim sugestijama i divnim diskusijama koje su mi omogućile da se danas nazovem biohemičarom.

Veliku zahvalnost dugujem dragoj mentorki, dr Miroslavi Vujčić, na svesrdnoj pomoći i nesebično prenesenom znanju u izradi ove doktorske disertacije. Hvala Vam što ste mi svojim nesebičnim deljenjem saveta, znanja i podrškom pružili mogućnost da učim i istražujem u potpuno novom polju istraživanja, zahvaljujući kojima je kvalitet ove doktorske disertacije podignut na značajno viši nivo.

Dr Dušanu Sladiću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta dugujem zahvalnost na brojnim savetima i diskusijama tokom izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se na pomoći i korisnim sugestijama tokom pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se mojim dragim kolegama iz laboratorije 483 na bezgraničnoj pomoći i prijateljstvu tokom svih ovih godina istraživanja. Posebnu zahvalnost dugujem dr Biljani Dojnov, dr Aleksandri Margetić, dr Nataši Božić, dr Marici Grujić, dr Nikoli Lončar, dr Marineli Šokarda-Slavić, Milici Mičić-Vičovac i Sanji Stojanović na druženju, podršci, pomoći i savetima.

Koleginicama dr Milki Jadranin i dr Jeleni Trifković zahvaljujem se na nesebičnoj pomoći oko spektralnih i statističkih analiza.

Svojim sestrama, Aniti i Agnezi, zahvaljujem se na najvećoj podršci i bezgraničnoj ljubavi. Marku, mom suprugu, dugujem zahvalnost za ljubav, strpljenje i istrajnost tokom svih ovih godina istraživanja.

Zahvalnost koja se ne može izraziti rečima dugujem svojim roditeljima, Stevanu i Vesni, za svu ljubavi, podršku i verovanje. Bez vas ne bih uspela.

Barbara

„Primena rastvornih i imobilizovanih izoformi peroksidaze iz rena u uklanjanju obojenih ksenobiotika iz otpadne vode“

IZVOD

Intenzivan industrijski razvoj praćen je sve većom kompleksnošću sastava otpadnih voda. Sintetičke boje su danas u širokoj primeni u velikom broju industrijskih grana. Većina boja poseduje kompleksnu hemijsku strukturu, kao i povećanu hemijsku stabilnost što ih nakon otpuštanja u vodotokove čini ksenobioticima koji najčešće ispoljavaju i svoje rekalcitrantne osobine. Potreba za novim tehnološkim rešenjima radi uklanjanja širokog spektra ovih obojenih ksenobiotika dovela je do opsežnog istraživanja na ovom polju, dok je u poslednjih nekoliko godina istraživanje na polju primene enzima veoma uznapredovalo.

Ova disertacija se bavi izolovanjem kiselih i baznih izoformi peroksidaze iz rena i njihovom primenom u uklanjanju različitih obojenih ksenobiotika, optimizacijom reakcije obezbojavanja, praćenjem i analizom proizvoda zaostalih nakon enzimske degradacije, sintezom imobilizata sa povećanom stabilnošću i efikasnošću u uklanjanju širokog spektra obojenih ksenobiotika. Cilj je bio razvijanje efikasne metode za uklanjanje i detoksifikaciju otpadne vode zaostale nakon procesa bojenja.

Izolovanje i prečišćavanje kiselih, baznih i neutralnih izoformi peroksidaze iz rena urađeno je jonoizmenjivačkom hromatografijom na QAE-Sephadex koloni. Razdvojene izoforme detektovane su zimogramskom detekcijom, nakon izoelektričnog fokusiranja. Optimizovani su uslovi reakcije obezbojavanja primenom rastvornih enzimskih preparata (0,14 U mL⁻¹ enzima i 0,44 mM vodonik-peroksida). Testirano je obezbojavanje 24 boje različitih struktura i karakteristika u zavisnosti od pH i izoforme peroksidaze iz rena. Najveći stepen obezbojavanja postignut je u slučaju 17 boja sa primenom kisele izoforme peroksidaze iz rena: šest pripada klasi azo boja, tri boje triarilmetanskoj i jedna boja tiazinskoj klasi boja dok su preostalih 7 zaštićenih struktura nedostupnih za javnost. U slučaju 12 boja najbolje obezbojavanje postignuto je na pH 5, a u slučaju 10 boja na pH 9. Obezbojavanje je praćeno UV-Vis spektrofotometrijom, a degradacija je potvrđena analizom na HPLC-u. Obezbojavanjem model-boje (oranž II) kiselom izoformom peroksidaze iz rena dobijeni glavnih proizvodi obezbojavanja identifikovani su LC-ESI-ToF-MS tehnikom.

Kisela izoforma peroksidaze iz rena uspešno je imobilizovana na 10 komercijalno dostupnih i laboratorijski sintetisanih nosača primenom različitih imobilizacionih tehnika.

Kisela izoforma peroksidaze iz rena imobilizovana na hitozanu pokazala je najveću specifičnu gvajakolnu aktivnost (2080 U g^{-1}) kao i dekolorizacionu aktivnost uklanjanjem 175 mg L^{-1} model boje. Dobijeni imobilizat pokazao je veću stabilnost prema vodonik-peroksidu u poređenju sa slobodnim enzimom. Imobilizat je pokazao i dobru operativnu stabilnost pa se njegova dekolorizaciona aktivnost nakon 7 ponovljenih ciklusa smanjila za samo 35%.

Procena toksičnosti boja i proizvoda obezbojavanja ispitana je na *Artemia salina*. Obezbojavanje model-boja dovelo je do smanjenja % mortaliteta larvi *A. salina* u odnosu na početni rastvor. Ekogenotoksičnost 8 model-boja testirana je na BEAS-2B ćelijama osnovnim i modifikovanim komet testom. Detektovani stepen oštećenja DNA iznosio je od 5 do 47%. U slučaju model-boje, oranž II detektovana su oksidativna oštećenja pri izlaganju ćelija rastvoru boje ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok izlaganje proizvodima degradacije nakon enzimskog tretmana sa kiselom izoformom peroksidaze iz rena ne dovodi do istog efekta.

Ispitane su interakcije boja i proizvoda degradacije sa DNA iz telećeg timusa i plazmidnom DNA na model boji oranž II i amido crno 10b primenom UV–Vis i fluorescentne spektrometrije i agaroznom elektroforezom. Nije uočeno značajno cepanje plazmidnog molekula DNA nakon izlaganja rastvorima boja pre i nakon enzimskog obezbojavanja.

Ključne reči: peroksidaza iz rena, obezbojavanje, imobilizacija, boje, komet test, ekogenotoksičnost

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj:

“Application of soluble and immobilized horseradish peroxidase isoforms in degradation of colored xenobiotics from waste water”

ABSTRACT

Intense industrial development has been accompanied by higher complexity of effluents. Synthetic dyes have been widely used in great number of industrial sectors. Majority of dyes possesses complex chemical structures, as well as chemical stability, which makes them persistent xenobiotics after their release in water bodies. The need for new technological solutions for removal of these colored xenobiotics has led to major ongoing research on this field with big emphasis on enzyme application.

Subject of this doctoral dissertation is isolation and application of acidic and basic horseradish peroxidase isoforms in decolorization of various colored xenobiotics, optimization of decolorization reactions, monitoring and analysis of decolorization products, synthesis of immobilizates with higher stability and efficiency in removal of wide spectrum of colored xenobiotics in order to develop efficient method for removal and detoxification of wastewater after the coloring process.

Acidic isoforms have been purified from basic and neutral horseradish isoforms using ion exchange chromatography on QAE-Sephadex column. Separated isoforms have been detected by zymograms after the isoelectric focusing. Decolorization reaction has been optimized using soluble enzyme isoforms (0.14 U mL^{-1} and 0.44 mM hydrogen peroxide). Decolorization of 24 dyes of various structures and characteristics have been tested depending of pH and peroxidase isoforms. In case of 17 dyes highest decolorization has been achieved using acidic horseradish peroxidase: six dyes are from azo, three from triarylmethane and one from thiazine category while the rest of dyes have structure which is unavailable to the public. Twelve dyes were decolorized best at pH 5, while 10 dyes were decolorized best at pH 9. Decolorization was monitored by UV-Vis spectrometry, while degradation was confirmed by HPLC. By decolorization of model dye (orange II) using acidic horseradish peroxidase the main decolorization products were identified by LC-ESI-ToF-MS technique.

Acidic isoform has been successfully immobilized on 10 commercially available and laboratory synthesized carriers by various immobilization techniques. Acidic horseradish isoform immobilized on chitosan has shown highest specific activity toward guaiacol (2080 U g⁻¹) as well as decolorization activity by removal of 175 mg L⁻¹ of model dye. The immobilizate obtained showed higher stability towards hydrogen peroxide in comparison with the soluble enzyme. The immobilizate has shown good operative stability since it has retained 65% of its decolorization activity after 7 repeated cycles. The assessment of toxicity of dyes and decolorization products has been tested on *Artemia salina*. Decolorization of model dye has resulted in reduction of mortality of *A. salina* larvae in comparison with initial dye. Ecogenotoxicity of 8 model dyes has been tested on BEAS-2B cells using basic and modified comet assay. DNA damage detected was from 5 to 47%. In case of model dye, orange II, oxidative DNA damage has been detected after the exposure of cells to dye solutions (300 µg mL⁻¹), while degradation products after enzymatic decolorization with acidic horseradish peroxidase showed no DNA damage.

Interactions of dyes and degradation products with DNA from calf thymus and plasmid DNA has been studied using model dye orange II and amido black 10b by UV-Vis and fluorescent spectroscopy and agarose electrophoresis. Significant DNA strand breaks on plasmid DNA has not been detected in either case.

Keywords: horseradish peroxidase, decolorization, immobilization, dye, comet assay, ecogenotoxicity

Area of science: Chemistry

Sub-area of science: Biochemistry

UDC number:

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

DNA	dezoksiribonukleinska kiselina
C.I.	kolor indeks
BOD	biohemijska potrošnja kiseonika
AsP	askorbat-peroksidaza
LiP	lignin-peroksidaza
MnP	mangan-peroksidaza
HRP	peroksidaza iz rena
SBP	peroksidaza iz soje
TuP	repina peroksidaza
CPO	hloroperoksidaza
DyP	dihem dekolizaciona peroksidaza
HRP-C	izoforna C peroksidaze iz rena
HRP-A	kisele (anjonske) izoforne peroksidaze iz rena
HRP-B	bazne (katjonske) izoforne peroksidaze iz rena
AH ₂	redukujući supstrat
PEG	polietilen-glikol
GA	glutaraldehid
ROS	reaktivne kiseonične vrste
PET	polietilen-tereftalat
SB	jednolančani prekidi na DNA
AP	apurinska/apirimidinska mesta na DNA
Nth	endonukleaza III
FPG	formamidopirimidin-DNA-glikozilaza
CT-DNA	DNA iz telećeg timusa
EB	Etidijum-bromid
MM	molekulski markeri
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi
UV	ultraljubičasti region apsorpcionog spektra
Vis	vidljivi region apsorpcionog spektra

MS	masena spektroskopija
ESI	elektrosprej jonizacija
IEX	jonoizmenjivač
AN	acetonitril
HH	peroksidaza iz rena imobilizovana na hitozanu
AGH	peroksidaza iz rena imobilizovana na želatinu i aluminijum-oksidu
AHG	peroksidaza iz rena imobilizovana na aluminijum-oksidu obložena želatinom
A10	peroksidaza iz rena imobilizovana na alginatnim rezancima nakon 10 minutne aktivacije natrijum-perjodatom
A30	peroksidaza iz rena imobilizovana na alginatnim rezancima nakon 30 minutne aktivacije natrijum-perjodatom
A60	peroksidaza iz rena imobilizovana na alginatnim rezancima nakon 60 minutne aktivacije natrijum-perjodatom
A90	peroksidaza iz rena imobilizovana na alginatnim rezancima nakon 90 minutne aktivacije natrijum-perjodatom
AP 0,25%	peroksidaza iz rena enkapsulirana sa PEG8000 u 0,25% alginatu
AP 0,5%	peroksidaza iz rena enkapsulirana sa PEG8000 u 0,5% alginatu
BEAS-2B	humane bronhijalne epitelne ćelije
TI%	procenat DNA u repu komete
ANOVA	analiza varijanse
PBS	puferisani fiziološki rastvor
8-OxoGua	8-okso-7,8-dihidroguanin
APS	amonijum-persulfat
AA	akrilamid
SDS	natrijum-dodecil-sulfat
PUZ	pufer za obradu uzoraka
AN	acetonitril
LB	Luria Bertani medijum
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
TAE	tris-acetatni EDTA pufer

1. Uvod	1
2. Opšti deo	3
2.1 Peroksidaze	3
2.1.1 Klasifikacija peroksidaza	3
2.1.2 Peroksidaza iz rena	5
2.1.2.1 Struktura peroksidaze iz rena	6
2.1.2.2 Katalitički mehanizam HRP	9
2.2 Imobilizacija enzima	11
2.2.1 Imobilizacija peroksidaze iz rena	15
2.3 Boje	16
2.3.1. Struktura boja	17
2.3.2 Klasifikacija boja	18
2.3.2.1 Klasifikacija prema C.I. sistemu	21
2.3.2.1.1 Azo boje	23
2.3.2.1.2 Antrahinonske boje	23
2.3.2.1.3 Ftalocijaninske boje	24
2.4 Boje kao obojeni ksenobiotici	25
2.4.1 Toksičnost obojenih ksenobiotika na molekulskom nivou	27
2.4.1.1 Oksidativno oštećivanje molekula DNA	28
2.4.1.2 Interakcije boja i DNA	31
2.4.1.2.1 Interakcije boja i dvostruke linearne DNA	31
2.4.1.2.2 Interakcije boja i cirkularne DNA	39
2.4.2 Toksičnost na nivou organizama	41
2.4.3 Boje kao zagađivači u otpadnim vodama	42
2.4.4 Tretmani obojenih otpadnih voda	44
2.4.4.1 Enzimski tretman obojenih otpadnih voda	46
2.4.5 Praćenje i analiza enzimskog obezbojavanja	46
3. Naši radovi	49
3.1 Hromatografsko odvajanje izoformi peroksidaze iz rena	49
3.2 Poređenje efikasnosti kiselih i baznih izoformi peroksidaze iz rena u uklanjanju obojenih ksenobiotika	53

3.3 Analiza obezbojavanja HPLC-om	60
3.3.1 Analiza obezbojavanja RB sa HRP HPLC-om	60
3.3.2 Analiza obezbojavanja RB5 sa HRP HPLC-om	62
3.3.3 Analiza obezbojavanja AB sa HRP HPLC-om	64
3.3.4 Analiza obezbojavanja OR2 sa HRP HPLC-om	66
3.4 Analiza obezbojavanja OR2 sa HRP LC—ESI-ToF-MS-om	67
3.5 Imobilizacija HRP-A	71
3.5.1 Specifična peroksidazna i dekolizaciona aktivnost HRP-A imobilizata	71
3.5.2 Optimizacija količine vodonik-peroksida pri reakciji obezbojavanja Hitozan-HRP imobilizatom	75
3.5.3 Ispitivanje stabilnosti Hitozan-HRP imobilizata prema višku vodonik-peroksida	77
3.5.4 Ispitivanje stepena obezbojavanja HH imobilizatom u zavisnosti od koncentracije i tipa boje	78
3.5.5 Ispitivanje efikasnosti HH, AGH i AHG imobilizata u ponovljenim ciklusima uklanjanja obojenog ksenobiotika	79
3.6 Akutna toksičnost prema <i>Artemia salina</i>	81
3.7 Ispitivanje genotoksičnosti boja i proizvoda degradacije boja komet testom	82
3.7.1 Ispitivanje genotoksičnosti obojenih ksenobiotika osnovnim komet testom	83
3.7.2 Procena oksidativnog oštećenje DNA modifikovanim komet testom	85
3.8 Ispitivanje interakcija obojenih ksenobiotika sa DNA	87
3.8.1 Ispitivanje interakcija OR2 i AB sa CT-DNA UV–Vis spektrometrijom	87
3.8.2 Spektrometrijska titracija OR2 i AB sa CT-DNA	89
3.8.3 Ispitivanje interakcija boja sa CT-DNA fluorescentnom spektrofotometrijom	91
3.8.3.1 Ispitivanje interakcija OR2 sa CT-DNA fluorescentnom spektrometrijom	92
3.8.3.2 Ispitivanje interakcija AB sa CT-DNA fluorescentnom spektrometrijom	94
3.9 Ispitivanje interakcija plazmidne DNA sa bojama i proizvodima degradacije sa HRP-A	96
3.9.1 Ispitivanje interakcija pUC19 sa OR2 pre i nakon obezbojavanja	97
3.9.2 Ispitivanje interakcija pUC19 sa AB pre i nakon obezbojavanja	98
3.10 Zaključci	99
4. Eksperimentalni deo	101
4.1 Spisak korišćene opreme	101

4.2 Spisak korišćenih kitova	102
4.3 Materijal	102
4.4 Izolovanje i prečišćavanje peroksidaze iz rena	102
4.4.1 Rasoljavanje preparata peroksidaze iz rena dijalizom	103
4.4.2 Jonoizmenjivačka hromatografija preparata peroksidaze na koloni QAE-Sephadex	103
4.4.3 Izoelektrično fokusiranje frakcija peroksidaze sa kolone QAE-Sephadex	104
4.4.3.1 Zimogramska detekcija peroksidazne aktivnosti gvajakolom nakon izoelektričnog fokusiranja	105
4.4.4 SDS-PAG elektroforeza	106
4.4.4.1. Detekcija proteina na gelu, bojenje CBB-om	108
4.4.5 Analiza gelova	109
4.5 Određivanje aktivnosti HRP gvajakolom	109
4.6 Određivanje koncentracije proteina Bradford-ovom metodom	110
4.7 Poređenje efikasnosti kisele i bazne izoforme HRP u obezbojavanju	112
4.8 Analiza obezbojavanja HPLC-om	113
4.9 Identifikacija proizvoda obezbojavanja OR2 LC—ESI-ToF-MS	113
4.10 Imobilizacija HRP-A na različitim nosačima	114
4.10.1 Zarobljavanje HRP-A u kalcijum-alginatnoj kapsuli	114
4.10.2 Imobilizacija na hitozanskim kuglicama	115
4.10.3 Imobilizacija na alginatnim rezancima	115
4.10.4 Imobilizacija na alumijum-oksidu	115
4.10.5 Određivanje specifične aktivnosti imobilizovane peroksidaze gvajakolom kao supstratom	116
4.10.6 Specifična degradaciona aktivnost (obezbojavanje)	116
4.10.7 Ispitivanje uticaja vodonik-peroksida na stepen obezbojavanja RB	117
4.10.8 Ispitivanje stabilnosti HH imobilizata u prisustvu vodonik-peroksida	117
4.10.9 Ispitivanje uticaja hemijske strukture boje i količine boje na stepen obezbojavanja HH imobilizatom	117
4.10.10 Određivanje operativne stabilnosti HRP-A imobilizata	118
4.11 Procena toksičnosti prema <i>Artemia salina</i>	119
4.12 Ispitivanje genotoksičnosti boja pre i posle obezbojavanja HRP komet testom	120
4.12.1 Produkcija formamidopirimidin DNA glikozilaze (FPG) fermentacijom <i>E.coli</i>	120

4.12.1.1 Dobijanje pojedinačnih kolonija	120
4.12.1.2 Priprema inokuluma i fermentacija	120
4.12.1.3 Izolovanje FPG-a iz bakterijskog peleta <i>E. Coli</i>	121
4.12.1.4 Određivanje aktivnosti FPG	122
4.12.2 Gajenje ćelijske kulture	122
4.12.2.1 Sejanje i uzgajanje ćelija	123
4.12.2.2 Sakupljanje i priprema ćelija za testiranje	123
4.12.2.3 Određivanje vijabilnosti i broja ćelija	123
4.12.3 Obezbojavanje AB i OR2	124
4.12.4 Tretman ćelija bojama i proizvodima obezbojavanja i komet test	124
4.12.5 Enzimski tretman uzoraka sa FPG-om	125
4.12.6 Bojenje i analiza kometa	126
4.12.7 Statistička analiza rezultata komet testa	126
4.13. Interakcije boja i proizvoda obezbojavanja sa CT-DNA metodom UV–Vis spektrotrometrije	127
4.14 Interakcije boja i proizvoda obezbojavanja sa CT-DNA metodom fluorescentne spektrometrije	127
4.15 Ispitivanje interakcija boja i proizvoda obezbojavanja sa plazmidnom DNA	128
4.15.1 Gajenje i izolovanje plazmida pUC19 iz <i>XL1 blue soja E. Coli</i>	128
4.15.1.1 Priprema hemijski kompetentnih ćelija pomoću CaCl_2^{138}	128
4.15.1.2 Hemijska transformacija kompetentnih <i>E. Coli XL1 blue</i> ćelija sa plazmidom pUC19	129
4.15.1.3 Izolovanje plazmida pUC19	130
4.15.2 Agarozna gel elektroforeza plazmidne DNA	131
4.15.3 Priprema uzoraka nakon prethodne termalne denaturacije i renaturacije plazmidne DNA	132
5.Literatura	133

1. Uvod

Peroksidaze su klasa enzima koji katalizuju oksidacije supstrata u prisustvu vodonik-peroksida. Peroksidaze imaju i biljke i mikroorganizmi i životinje. Peroksidaza iz rena (HRP, E.C. 1.11.1.7) je izolovana iz korena rena (*Azorella rusticana*). Pripada klasi III sekretornih biljnih peroksidaza i javlja se u vidu familije izoenzima¹. Najproučavanija forma je HRP-C. Ova izoforma pripada klasi bazno-neutralnih izoformi HRP i najvećeg je komercijalnog značaja. Mali komercijalni značaj drugih izoformi HRP doveo je do njihovog zanemarivanja u proučavanju i odbacivanja u procesu proizvodnje. Međutim, kako redukcija peroksida na račun elektron-donorskog aromatičnog supstrata čini ovu grupu enzima veoma korisnom u brojnim biotehnološkim procesima, pojavila se potreba i za istraživanjem ovih izoformi peroksidaza. Osim primene u dijagnostičkim preparatima, organskim sintezama, analizama i sl. primećeno je da HRP može da katalizuje reakcije uklanjanja fenolnih jedinjenja iz otpadne vode². Ovo je otvorilo novo poglavlje u istraživanju i primeni ovog enzima. Industrija koja se poslednjih decenija nametnula kao jedna od najvećih je industrija boja. Trenutno, sintetičke boje su osnova nekoliko industrija poput tekstilne, farmaceutske, prehrambene, kozmetičke i dr., zahvaljujući svojim svojstvima kao što su šarenolikost, lakoća u manipulisanju i niske cene. Godišnja proizvodnja boje procenjena je na oko 900 000 tona, gde čak 70% pripada grupi azo boja. Prema novijim procenama, značajni udeo industrijskog otpada (17-20%) pripada obojenim efluentima³.

S obzirom na to da većina boja poseduje makar jednu aromatičnu grupu u svojoj strukturi, ovo ih čini idealnim supstratom za HRP. Istraživanje drugih izoenzima HRP dovelo bi do stvaranja svojevrsne zbirke iz koje bi bilo moguće odabrati izoenzim koji bi zadovoljio tražene zahteve. Iako manje zastupljene, kisele izoforme HRP usled svojih drugačijih biohemijskih i katalitičkih osobina predstavljaju sponu koja bi mogla da premosti nedostatke drugih, više zastupljenih i primenjivanih izoformi. Njihova mala zastupljenost u renu može se prevazići primenom imobilizovanih biokatalizatora koji bi omogućili povećanu stabilnost enzima, veću efikasnost i produženo vreme upotrebe kroz veći broj operativnih ciklusa.

Usled sintetičke prirode i kompleksne aromatične strukture, boje i njihovi otpadni efluenti predstavljaju izazov za tretiranje. Ogromni naponi su uloženi u razvijanje remedijacionih tehnika za otpadne boje kao i njihove metabolite⁴. Obojeni efluenti nakon otpuštanja iz fabrike prolaze nekoliko fizičko-hemijskih tretmana, poput koagulacije, ozonizacije, flokulacije i sl., praćenih biološkim metodama. Međutim, veliki nedostaci ovih tehnika jesu: (1) formiranje izuzetno koncentrovanog obojenog mulja čije odlaganje predstavlja izazov i zahteva prostor; (2) prisustvo rekalcitrantnih boja čija razgradnja uglavnom nije moguća prirodnim biološkim procesima i/ili zahteva izuzetno dugo vreme.

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je da se ispita efikasnost rastvornih i imobilizovanih izoformi peroksidaze iz rena za uklanjanje obojenih ksenobiotika iz otpadne vode sa posebnim osvrtom na genotoksični efekat polaznih ksenobiotika i njihovih proizvoda nakon enzimske degradacije. U tom smislu definisano je nekoliko sledećih ciljeva:

1. Izolovanje i prečišćavanje kiselih, neutralnih i baznih izoformi peroksidaze iz rena;
2. Ispitivanje efikasnosti ovih izoformi u obezbojavanju boja različitih struktura;
3. Praćenje i analiza degradacionih proizvoda nakon tretmana sa peroksidazom iz rena;
4. Dobijanje biokatalizatora na bazi peroksidaze iz rena sa povećanom stabilnošću i efikasnošću u uklanjanju širokog spektra obojenih ksenobiotika u poređenju sa rastvornim enzimom;
5. Razvoj efikasne *in vitro* metode za ocenu genotoksičnosti pre i nakon obezbojavanja peroksidazom iz rena, kao i određivanje oksidativnih oštećenja u molekulu dezoksiribonukleinske kiseline (DNA);
6. Ispitivanje interakcija obojenih ksenobiotika i njihovih proizvoda obezbojavanja sa sisarskom i plazmidnom DNA u cilju razumevanja njihovog delovanja.

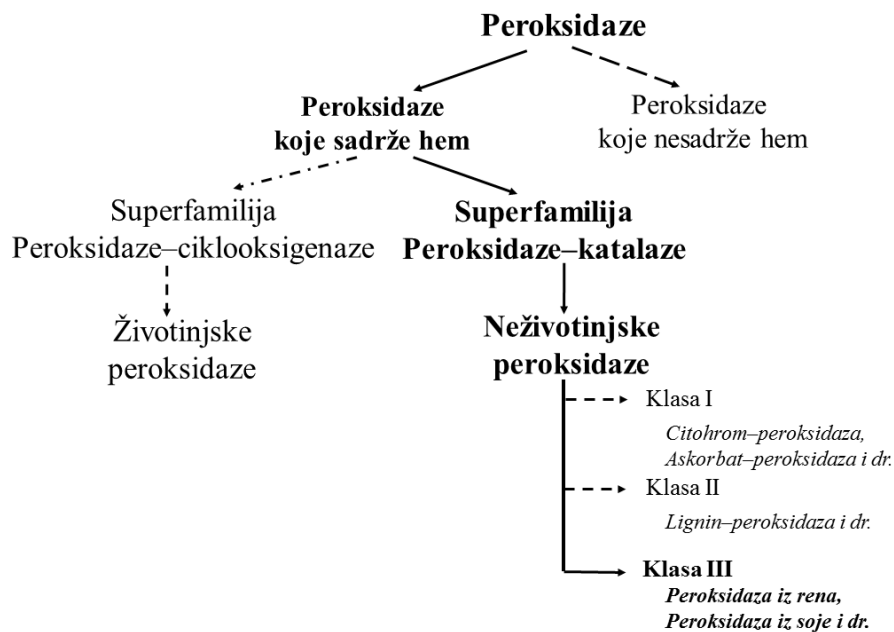
2. Opšti deo

2.1 Peroksidaze

Peroksidaze su veoma rasprostranjena klasa enzima koja katalizuje oksidoredukcione reakcije uz prisustvo kosupstrata vodonik-peroksida (H_2O_2). Peroksidaze spadaju u prvootkrivene enzime. Oksidaciju određenih organskih jedinjenja (poput gvajakola) u prisustvu H_2O_2 opisao je davne 1855. god. Schönbein, a 1898. god. Linossier je prvi put upotrebio naziv “peroksidaza”⁵. Jedan od prvih definisanja enzimskih jedinica za nehidrolitičke enzime jeste “purpurogalinski broj” (PZ broj) uveden 1917. god.⁶.

2.1.1 Klasifikacija peroksidaza

Dostupno je nekoliko različitih klasifikacija peroksidaza⁶, ali ono što je isto za sve peroksidaze jeste podela na superfamilije⁷ (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz klasifikacije peroksidaza.

Peroksidaze mogu da se dele na proteine koji sadrže hem i proteine koji ne sadrže hem. Peroksidaze koje sadrže hem se dalje dele na **superfamilije** čija klasifikacija zavisi od toga da li su one životinjskog ili neživotinjskog porekla. Treću, posebnu grupu, čine katalaze⁸. Današnju bazu kodirajućih sekvencija dosada poznatih peroksidaza (PeroxiBase) sačinjava 13 podgrupa, koje se dalje granaju u 60 klasa. U ovoj bazi trenutno se nalazi 13640 dostupnih sekvencija⁹.

Superfamilija neživotinjskih peroksidaza obuhvata peroksidaze kako prokariotskog tako i eukariotskog porekla. Biljne peroksidaze su monomerni proteini sa nekovalentno vezanim hemom. U zavisnosti od strukturnih sličnosti, katalitičkih osobina i pretpostavljenog zajedničkog porekla mogu se podeliti u tri klase⁸.

Klasa I obuhvata peroksidaze koje se mogu naći u organelama prokariotskog porekla (npr. hloroplastna i citosolna askorbat-peroksidaza (AsP)). Karakteristika ove klase peroksidaza je odsustvo vezanih ugljenih hidrata, disulfidnih mostova, jona kalcijuma i signalnih peptida potrebnih za sekreciju.

Klasa II su sekretorne peroksidaze gljiva poput lignin-peroksidaze (LiP), mangan-peroksidaze (MnP) i sl. Za razliku od peroksidaza klase I, peroksidaze ove klase poseduju signalnu peptidnu sekvenciju odgovornu za njihovu sekreciju putem endoplazmatičnog retikuluma. Sadržaj ugljenih hidrata je do 5%, poseduju 2 jona kalcijuma i 4 disulfidna mosta.

Klasu III sačinjavaju sekretorne peroksidaze koje poseduju N-terminalni signalni peptid za izlučivanje, dva konzervativna jona kalcijuma, 4 konzervativna disulfidna mosta (na različitim lokacijama u odnosu na peroksidaze klase II), kao i dodatni helikoidni region. Sadržaj ugljenih hidrata je različit i varira do 25%. Neki od klasičnih primera ove grupe peroksidaza su: peroksidaza iz rena (HRP), peroksidaza iz soje (SBP), repina peroksidaza (TuP) i dr.

Neki autori predlažu i četvrtu grupu peroksidaza. Ova grupa sadržavala bi peroksidaze koje su neuobičajene i ne mogu se svrstati u gore pomenute grupe poput: hloroperoksidaza (CPO) i dihem dekolizacije peroksidaze (DyP)¹⁰.

2.1.2 Peroksidaza iz rena

Peroksidaza iz rena (EC 1.11.1.7) pripada klasi III biljnih peroksidaza. Izoluje se iz korena višegodišnje biljke rena (*Armoracia rusticana*, slika 2).



Slika 2. Biljka ren, *Armoracia rusticana*.

Peroksidaza iz rena poseduje dugu i bogatu istoriju, s obzirom na to da se o njenom dejstvu pisalo još sa početka 19. veka⁷. Monomerni je glikoprotein, sadrži hem grupu i 2 atoma kalcijuma koji su neophodni za aktivnost⁴. U prisustvu vodonik-peroksida, ili nekog drugog peroksida, HRP oksiduje široki spektar jedinjenja (fenoli, fenolne kiseline, indoli, amini, sulfonati i dr.). HRP je jedan od najproučavanijih enzima.

Hromatografski je odvojeno i izolovano 5 različitih izoformi HRP 1958. god. Tada su te glavne izolovane izoforme označene slovima engleske abecede ukazujući na njihovu elektroforetsku pokretljivost. Ovo je potvrđeno 1966. godine, kada je na koloni DEAE-celuloze izdvojeno 5 izoformi peroksidaza. Kisele izoforme se mogu frakcionisati na tri izoforme, označene A1, A2 i A3¹¹. Morita i saradnici su izolovali 5 neutralnih izoformi (B1, B2, B3, C1 i C2) kao i šest baznih izoformi (E1, E2, E3, E4, E5 i E6)¹². Bazne izoforme HRP-E sa pI vrednosti oko 12 su teško dostupne, pa su i najmanje izučavane izoforme¹³. Generalna podela HRP izoformi na kisele, neutralne i bazne ukazuje na njihove elektroforetske pokretljivosti na osnovu pI vrednosti, iako postoje razlike i u sekvenciji, kao i sadržaju ugljenih hidrata.

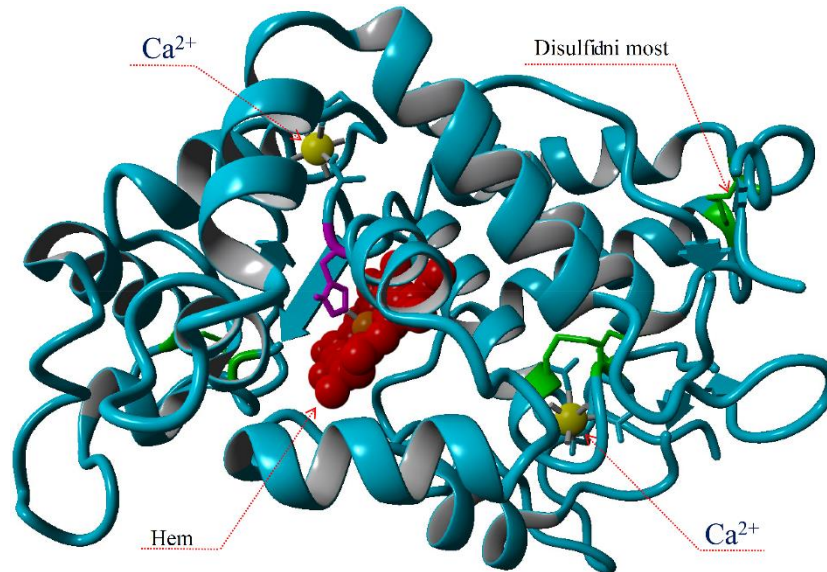
Iako su se već 30-tih godina prošlog veka istraživali različiti pH optimumi i supstratne specifičnosti pomenutih izoformi, većina do danas publikovanih radova

odnosila se na izoformu HRP-C^{14,15}. Pretpostavlja se da je uzrok ovome velika zastupljenost ove izoforme u korenu rena u odnosu na druge izoforme. Međutim, ponekad komercijalno dostupni preparati HRP mogu sadržavati i do 42 izoelektroforetski različite izoforme HRP¹⁶. Veliki komercijalni značaj HRP-C potisnuo je ispitivanje i opravdanost izolovanja drugih izoformi u dosadašnjoj literaturi. Iako se komercijalno dostupni preparat HRP, HRP-C, vodi kao alkalna (bazna) peroksidaza, sa oznakom „C“ ona ukazuje na neutralnu izoformu. Ova izoforma poseduje pI vrednosti oko 8,8, što može dovesti do konfuzije na koji način je ona klasifikovana kao neutralna peroksidazna izoforma sa pI vrednosti u baznom regionu. Međutim, treba povesti računa o uslovima elektroforetskog fokusiranja i opsegu pI vrednosti primenjenom tokom razdvajanja i klasifikacije HRP izoformi. Uobičajeni opseg pI vrednosti od 3–10 primenjen tokom izoelektričnog fokusiranja nije dovoljan za razdvajanje veoma baznih izoformi sa pI vrednostima preko 11, u odnosu na tzv. neutralne izoforme. Rezultat toga je “pripajanje” baznih neutralnim izoformama HRP prilikom izoelektričnog fokusiranja.

2.1.2.1 Struktura peroksidaze iz rena

Aktivno mesto HRP-a visoko je konzervirano iako se aminokiselinske sekvencije ovih izoenzima preklapaju sa manje od 60% identičnosti. Fenilalaninski ostatak (F179) zadužen za redukovanje supstrata prilikom vezivanja za HRP-C je zamenjen valinom u HRP-A izoformi¹.

HRP-C je monomerni glikolizovani polipeptid koji se sastoji od 308 aminokiselina⁷. Molekulske je mase 43000 Da i njegova kristalna struktura potpuno je rešena, a model strukture prikazan je na slici 3.



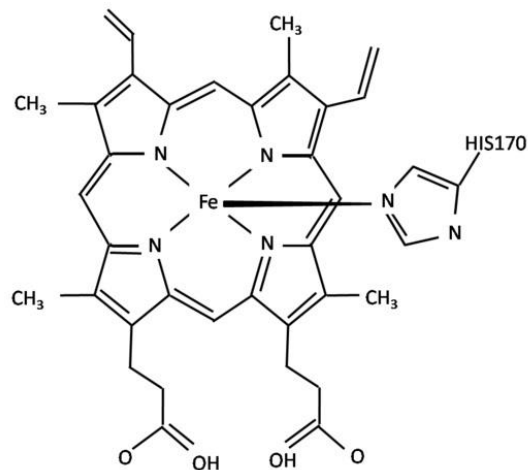
Slika 3. Struktura HRP-C izoforme. Preuzeto i modifikovano sa Protein Data Bank 1ATJ.

Molekul enzima se sastoji od 10 heliksa i dva tačno definisana domena: N-terminalni domen I (heliks A-D) i C-terminalni domen II (heliks F-J). Ova dva domena (distalni i proksimalni) povezana su helixom koji je označen kao heliks E. Hem se vezuje u džepu koji je lociran između ova dva domena¹⁷. Takođe, postoje 4 disulfidna mosta locirana između Cys 41–121, Cys 74–49, Cys 127–331 i Cys 207–239¹⁸.

HRP-C ima 21,8% ugljenih hidrata, gde HRP-C1 frakcija sadrži 9 Asn-X-Ser/Thr-X motiva kao potencijalna mesta N-glikozilovanja (X označava bilo koju amino kiselinu osim prolina)⁷. Sadržaj ugljenih hidrata se razlikuje kod baznih izoformi i iznosi do 4,2%¹⁹.

Dva jon-vezujuća mesta za Ca^{2+} su locirana na proksimalnoj i distalnoj poziciji u odnosu na hem¹⁸. Gubitak ovih jona rezultuje smanjenjem enzimske aktivnosti i termalne stabilnosti⁷.

Nativni enzim sadrži hem kao prostetičnu grupu, poznatu pod nazivom i feriprotoporfirin IX, čija struktura je prikazana na slici 4.



Slika 4. Struktura hema kod HRP.

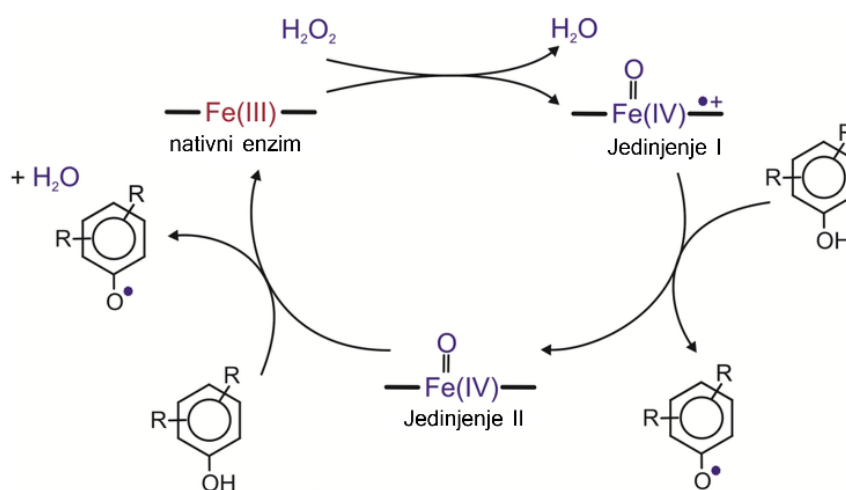
Hem grupa poseduje planarnu strukturu sa atomom gvožđa koji je čvrsto obuhvaćen u sredini porfirinskog prstena⁷. Porfirinski prsten ima četiri pirola. Gvožđe ima 2 mesta vezivanja, jedno ispod i jedno iznad ravni hema. Hema je povezan sa proksimalnim histidinskim ostatkom (His170), koji je lociran ispod hem grupe. Drugi histidinski ostatak, koji se nalazi iznad hem grupe, lociran je sa distalne strane hema i u svom osnovnom stanju je upražnjen. Ovo slobodno mesto poslužiće za vezivanje vodonik-peroksida tokom oksido-redukcijske reakcije. Tokom aktivacije, atom kiseonika će se vezati na ovo upražnjeno mesto²⁰. Šesto koordinaciono mesto gvožđa smatra se aktivnim mestom HRP. Tokom enzimske reakcije vezivanje vodonik-peroksida za atom gvožđa dovodi do formiranja oktaedarske konfiguracije oko atoma gvožđa⁶.

2.1.2.2 Katalitički mehanizam HRP

Reakcija između peroksidaze (HRP), vodonik-peroksida (H_2O_2) i redukujućeg supstrata (AH_2) može se sumarno predstaviti sledećom šemom:



Prvobitno enzim biva oksidovan vodonik-peroksidom, a zatim redukovano do svoje native forme u dva uzastopna koraka koji uključuju intermedijere: jedinjenje I (HRP I) i jedinjenje II (HRP II). Detaljan katalitički ciklus HRP prikazan je na slici 5.

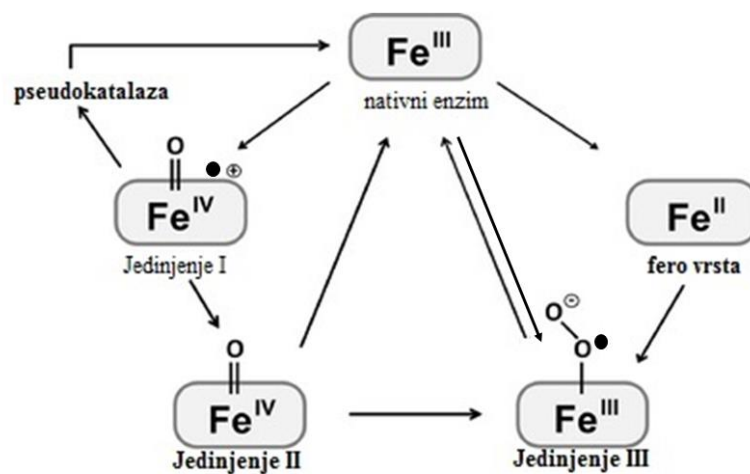


Slika 5. Katalitički ciklus peroksidaze²¹.

U prvom koraku H_2O_2 brzo reaguje sa gvožđem Fe(III) u dvoelektronskom procesu i nastaje prvi intermedijer, jedinjenje I. Tokom ove reakcije otpušta se molekul vode sa istovremenom dvoelektronskom oksidacijom gvožđa hema do jedinjenja I. Jedinjenje I je intermedijer visokog oksidacionog stanja sačinjen od oksiferil gvožđa Fe(IV) i porfirinskih katjonskih radikala ($\text{Por}^+\text{FeIV}=\text{O}$) i u mogućnosti je da oksiduje široki spektar molekula supstrata (AH_2). Drugi korak su dva jedno elektronska transfera: prva jednoelektronska redukcija porfirinskog radikal-katjona zahteva prisustvo

redukujućeg supstrata (AH_2) te dovodi do stvaranja jedinjenja II, $Fe(IV)$ oksoferil gvožđa ($Fe(IV)=O$), potom druga jednoelektronska redukcija vraća jedinjenje II do početnog stanja gvožđa u enzimu odnosno u $Fe(III)$ oblik. Tokom ovih jednoelektronskih transfera formira se molekul vode koji biva otpušten iz hema^{7,20,21}.

Opisana su još dva oksidaciona stanja HRP: fero vrsta i Jedinjenje III. Struktura ovih 5 jedinjenja opisana je od strane Berglunda i saradnika 2002. god²². Shema njihovih nastanaka prikazana je na slici 6.



Slika 6. Prikaz intermedijera HRP tokom peroksidnog ciklusa¹⁰.

Jedinjenje III sa vezanim superoksidnim anjonom, može nastati od jedinjenja II ili direktno iz nativnog stanja. U prisustvu viška vodonik-peroksida jedinjenje I može ili da reaguje nazad do nativnog stanja putem pseudokatalazne aktivnosti ili da reaguje do jedinjenja II. Smatra se da je enzimaska produkcija molekuskog kiseonika putem pseudokatalazne aktivnosti glavni protektivni mehanizam prema inaktiviranju enzima vodonik-peroksidom. U slučaju drugih peroksida mogući su drugi načini inaktiviranja enzima ali oni nisu od interesa za ovu doktorsku disertaciju^{10,10,22}.

Iako je mehanizam delovanja svih peroksidaza sličan, ipak postoje neke razlike u katalitičkoj i supstratnoj specifičnosti kiselih i baznih HRP izoenzima. Kisele izoforme peroksidaze iz rena generalno iskazuju sporiju reaktivnost u odnosu na bazne izoforme prilikom reakcije sa vodonik-peroksidom. Reakcija enzima u feri stanju sa H_2O_2 u cilju

formiranja jedinjenja I pokazuje kinetiku drugog reda sa konstantom $k_I > 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ u slučaju HRP-C, dok je ista reakcija kod HRP-A deset puta sporija²³. Ova reakcija takođe zavisi i od pH okolnog rastvora u slučaju obe izoforme. Pokazano je da HRP-A biva aktivnija pri nižim pH vrednostima rastvora nego na neutralnom pH, dok je za HRP-C izoformu situacija obrnuta^{1,23}.

2.2 Imobilizacija enzima

Enzimi su biokatalizatori široke primene u brojnim industrijskim procesima. Međutim, njihova direktna primena u tretiranju velikih količina otpadnih voda je neisplativa usled nekoliko razloga. Enzimi su često prisutni u maloj količini, pa je cena njihovog izolovanja i prečišćavanja velika. Imobilizacijom enzima na nerastvorni nosač omogućava se prevazilaženje ovih problema u upotrebi²⁴. Mogućnost lakog udaljavanja i višestrukog korišćenja enzima takođe omogućava smanjenje troškova²⁵. Imobilizacija enzima često ima za posledicu stabilizaciju enzima čime se omogućava njihova primena u ekstremnim uslovima sredine^{26,27}. Razvijen je veliki broj metoda imobilizacije i dostupno je puno različitih nosača²⁸. Optimizacija metode zavisi od enzima koji se imobilizuje, troškova koji su potrebni za imobilizaciju i namene imobilizata²¹. Imobilizacijom se olakšava udaljavanje biokatalizatora iz sistema i omogućava se njegovo višestruko korišćenje^{24,29}.

Metode imobilizacije mogu se, na osnovu načina vezivanja enzima, podeliti u tri kategorije²⁶: (1) vezivanje za matriks (nosač), (2) zarobljavanje (enkapsulacija) i (3) umrežavanje. Neke od glavnih prednosti i mana prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Prednosti i mane uobičajenih metoda imobilizacije enzima.

Metod imobilizacije	Prednosti	Mane
Enkapsulacija/zarobljavanje	<ul style="list-style-type: none"> ● bez hemijske modifikacije enzima ● enzim zadržava katalitičku aktivnost tokom polimerizacije polimera 	<ul style="list-style-type: none"> ● "curenje" enzima iz hidrokapsule ● ograničena difuzija supstrata
Unakrsno umrežavanje enzima	<ul style="list-style-type: none"> ● nosači nisu potrebni ● stabilizacija enzima ● minimalno „curenje” enzima 	<ul style="list-style-type: none"> ● moguće velike modifikacije enzima ● komplikovana eksperimentalna procedura ● ograničena difuzija supstrata
Adsorpcija	<ul style="list-style-type: none"> ● bez hemijske modifikacije enzima ● brza i ekonomična metoda 	<ul style="list-style-type: none"> ● "curenje" enzima ● niska specifičnost reakcije
Kovalentno vezivanje	<ul style="list-style-type: none"> ● stabilizacija enzima ● smanjeno "curenje" enzima 	<ul style="list-style-type: none"> ● moguće sterne modifikacije enzima ● smanjenje enzimске aktivnosti usled inaktivacije ● neophodna hemijska modifikacije nosača ● ireverzibilno vezivanje koje onemogućava recikliranje nosača

Vezivanje na nosač može biti fizičke prirode (hidrofobne sile, Van der Waals-ove intreakcije), jonsko ili kovalentno. Fizičko vezivanje uglavnom nema dovoljnu jačinu da zadrži enzim na nosaču koliko je potrebno za primenu u industrijskim uslovima³⁰. Jonsko, a pogotovo kovalentno, vezivanje podrazumeva jače vezivanje enzima na nosač i nudi prednost u pogledu sprečavanja „curenja“ imobilizovanog enzima. U poslednjih nekoliko godina značajna pažnja posvećena je kovalentnoj imobilizaciji enzima na porozne i neporozne nosače poput stakla, aluminijuma i hitozana²⁹. Kovalentno vezivanje je najčešće korišćena metoda. Međutim, funkcionalna grupa prisutna na enzimu preko koje se može ostvariti kovalentno povezivanje sa nosačima ne bi trebalo da bude esencijalna za enzimsku aktivnost. Funkcionalne grupe na enzimu koje se mogu upotrebiti za kovalentno vezivanje su amino, karboksilna, fenolni prsten, imidazol i indol. Grupe na nosaču koje omogućavaju kovalentno povezivanje su: amino i sl. grupe polisaharida i silika-gela, aldehidne i acetalne grupe polimera, amidne grupe polipeptida i dr. Nosači

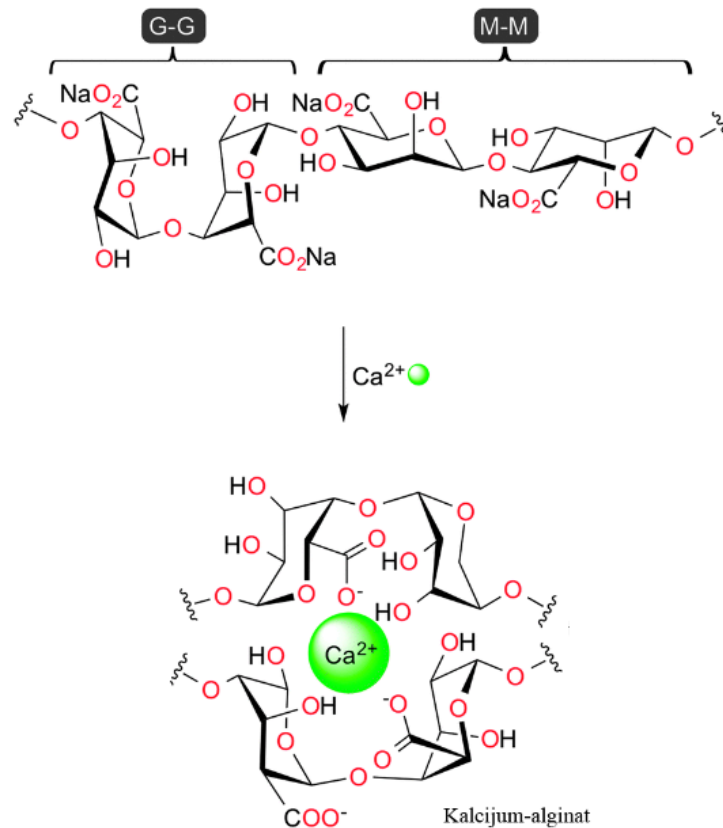
moгу biti direktno primenjeni za kovalentno povezivanje ili mogu biti prethodno modifikovani. Nosači mogu biti sintetičke smole, biopolimeri ili neorganski polimeri²⁸. Negativni aspekti kovalentne imobilizacije su to što enzimi bivaju hemijski modifikovani pa je moguća denaturacija tokom imobilizacije. Takođe, nakon inaktivacije imobilizata i enzim i nosač bivaju neupotrebljivi³¹.

Enkapsulacija enzima podrazumeva obuhvatanje enzima u mrežu polimera. Polimeri koji se najčešće upotrebljavaju su organski ili silicijum-dioksidni sol-gel, a u novije vreme mikrokapsule. Imobilizacija enzima metodom zarobljavanja podrazumeva sintezu polimerne mreže u prisustvu enzima. Prednost ove metode je manji gubitak enzimske aktivnosti tokom imobilizacije, ali su moguća tzv. curenja enzima iz kapsula. Jedan od velikih izazova je ograničena difuzija supstrata dublje u kapsulu imobilizata²⁸.

Unakrsno umrežavanje enzima dovodi do agregiranja ili stvaranja kristala pomoću bifunkcionalnih reagenasa u cilju sinteze makropartikula bez nosača. Formiranje kovalentnih veza između molekula enzima omogućeno je upotrebom multifunkcionalnog reagensa, što rezultuje formiranjem trodimenzionalnih unakrsno povezanih agregata. Najčešće primenjen reagens za umrežavanje je glutaraldehid. Prednosti ove metode su vrlo mala desorpcija enzima iz imobilizata i mogućnost kombinovanja sa drugim metodama. Međutim, u nekim slučajevima moguće su značajne, nepogodne, promene u aktivnom mestu enzima³².

Korišćenje lako dostupnih i prirodnih polimera poput celuloze, agaroze, hitozana i dr. kao nosača za imobilizaciju enzima nudi veliku prednost u odnosu na sintetičke polimere a to je biorazgradivost u najvećem broju slučajeva. Između ostalog tehnika polimerizacije je jednostavna, brza i jeftina.

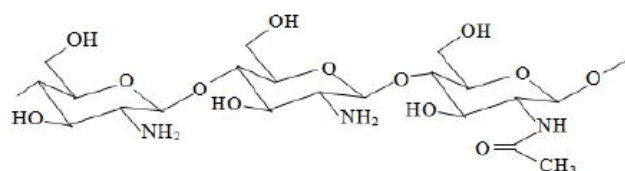
Jedan od vrlo često korišćenih polimera za imobilizaciju enzima je alginat. Alginat je glavni strukturni polisaharid morskih mrkih algi (Phaeophyceae). Alginat je linearni kopolimer sa homopolimernim blokovima β -D-manopiranozil-uronata (M) i α -L-gulopiranozil-uronata (G) međusobno povezanih $\beta(1\rightarrow4)$ vezama u različitim sekvencijama ili blokovima. Monomer može biti homopolimerni blok konsektivnih G-ostataka (G-blokova), konsektivnih M-ostataka (M-blokova) ili naizmeničnih M- i G- blokova. Komercijalno je dostupan u vidu natrijumove soli. Za geliranje alginata potrebni su joni dvovalentnih katjona, najčešće Ca^{2+} (slika 7).



Slika 7. Struktura ponavljajućih jedinica polisaharidnog lanca alginata, $\beta(1\rightarrow4)$ anjona D-manuronske kiseline (M-M) i $\alpha(1\rightarrow4)$ veza anjona L-guluronske kiseline (G-G). Geliranje alginata u prisustvu jona kalcijuma.

Jedan od načina dobijanja alginatnih imobilizata jeste zarobljavanje enzima u alginatnoj kapsuli³³. Kako su alginatni imobilizati vrlo elastični prirodni polisaharidi poput karagenana i sintetički polimeri poput polietilen-glikola (PEG) upotrebljavani su kao agensi za očvršćavanje biokatalizatora³⁴. Pored poboljšavanja mehaničkih osobina biokatalizatora, PEG poseduje i stabilizujući efekat na enzime prilikom zarobljavanja^{26,35}.

Hitozan je $\beta(1\rightarrow4)$ 2-amino-2-deoksi- β -D-glukan odnosno deacetilovana forma hitina (slika 8).



Slika 8. Struktura hitozana.

Hitin je glavni strukturni polisaharid prisutan kod nižih biljaka i invertebrata. Široka primena hitozana posledica je njegove velike dostupnosti i svestranosti. Preparati hitozana različite čistoće imaju primenu kako u industriji tako i u medicini i farmaciji³⁶. Usled postojanja velikog broja amino i hidroksi funkcionalnih grupa hitozan se pokazao kao dobar adsorbujući materijal³⁰. Pored ovih osobina hitozan se odlikuje biokompatibilnošću i biodegradabilnošću što ga čini odličnim materijalom za biodegradaciju obojenih ksenobiotika³⁷.

Neorganski nosači poseduju veliku hemijsku, fizičku i biološku rezistenciju. Za imobilizaciju enzima najčešće se upotrebljavaju silika-gel, aluminijum-oksidi, staklo i dr³⁸. Velika prednost ovih nosača jeste potpuna rezistencija na mikrobiološke kontaminacije s obzirom na to da neorganski materijal ne predstavlja supstrat bilo kojoj vrsti bakterija ili gljiva. Dve glavne odlike neorganskih nosača su rigidnost i poroznost. Iako je moguće postići određeni nivo kontrolisane poroznosti, organski nosači su veoma osetljivi na promenu pritiska i/ili pH. Za razliku od njih, neorganski nosači su veoma rigidni odnosno ne pokazuju promenu obliku pora niti dijametara pora tokom upotrebe što garantuje konstantnu zapreminu i oblik imobilizata. Komercijalno su dostupni neorganski nosači različitih promera pora, od kojih se najviše primenjuju mezoporozni nosači (veličina pore 2–50 nm) u imobilizaciji enzima jer imaju velike specifične površine te omogućavaju veći proteinski sadržaj³⁹. Jedan od takvih nosača je aluminijum-oksidi poznat i kao alumina. Dostupan je u nekoliko različitih formi, lako je dostupan i veoma inertan⁴⁰.

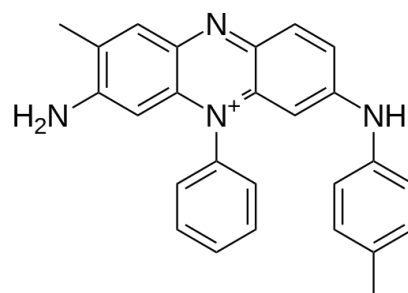
2.2.1 Imobilizacija peroksidaze iz rena

Peroksidaza iz rena je prvobitno privukla veliku pažnju usled mogućnosti umrežavanja fenola i anilina, čime se pojavila mogućnost remedijacije otpadnih industrijskih voda. Većina, do sada objavljenih radova, fokusirana je na imobilizaciju HPR u cilju precipitacije fenola iz otpadnih voda^{29,41–43}. Međutim, slični sistemi imobilizacije ne mogu da zadovolje potrebe tretiranja velike količine obojenih industrijskih efluenata⁴⁴. Veliki broj metoda primenjen je za imobilizaciju peroksidaza iz različitih izvora, međutim većina sintetizovanih biokatalizatora bazira se na upotrebi komercijalno dostupnog enzima i/ili primeni brojnih komercijalnih i/ili skupih nosača²¹.

U cilju ispitivanja potencijalne primene HRP u obezbojavanju do sada je ona imobilizovana metodom zarobljavanja u alginatnom i akriladmidnom gelu^{45,46}, kopolimerizacijom sa β -ciklodekstranom i hitozanom⁴⁷, imobilizacijom na aktivirana PET vlakna⁴⁸, kovalentnom imobilizacijom na polisulfonske nosače⁴⁹. Čest problem korišćenja imobilizata u obezbojavanju otpadne industrijske vode je adsorpcija boje za površinu imobilizata čime se smanjuje ili potpuno inhibira njegova aktivnost⁵⁰. Takođe, u većini do sada publikovanih radova naglasak je stavljen na poređenje efikasnosti imobilizovanog i rastvornog enzima. Međutim, poređenje biokatalizatora dobijenih različitim metodama imobilizacije enzima bilo bi od većeg značaja, jer bi omogućilo bolju selekciju odgovarajuće tehnike imobilizacije enzima sa ciljnom namenom u rešavanju problema obojenih otpadnih voda.

2.3 Boje

Boje su obojene supstance organskog ili neorganskog porekla. Odlikuju se sposobnošću apsorpcije elektromagnetnog zračenja u vidljivom delu elektromagnetnog spektra. Pojam boje najpre označava njihov afinitet prema supstratu na koji se primenjuju uz postojanost prema svetlu i pranju. Primena boje poznata je od davnina, kada su ljudi pokušavali da izdvoje obojenu supstancije iz cveća, insekata, voća, povrća i sl. Movein je prva sintetička boja, nastala slučajnim pronalaskom W. Perkina 1856. god⁵¹. Molekularna struktura ove boje vrlo je kompleksna i sastoji se iz nekoliko izomera (slika 9).



Slika 9. Movein: izomer movein A.

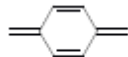
Pronalazak moveina otvorio je put ka sintezi i primeni sintetičkih boja koje su pokazivale superiornije osobine u odnosu na postojeće pigmente i prirodne boje⁵¹. Sa

većom paletom boja i svetlijim nijansama, koje su mogle biti primenjene na različitim tipovima vlakana i materijala, stvorena je današnja industrija bojenja⁵².

2.3.1. Struktura boja

Kovalentno nezasićeni deo molekula boje koji je odgovoran za apsorpciju elektromagnetnog zračenja u UV ili vidljivom delu elektromagnetnog spektra naziva se *hromofora*. Međutim, obojenost je rezultat apsorbovanja isključivo u oblasti vidljivog dela elektromagnetnog spektra (380–700 nm). Tipični primeri grupa hromofora prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Primeri hromofora⁵³.

Formula	Naziv
—NO ₂	Nitrogrupa
—C=O	Karbonilna
—NR ₃	Alkilamino derivat
—C=C—	Alkenska grupa
—C=N—	Iminska grupa
—N=N—	Azo grupa
	Hinoidni prsten

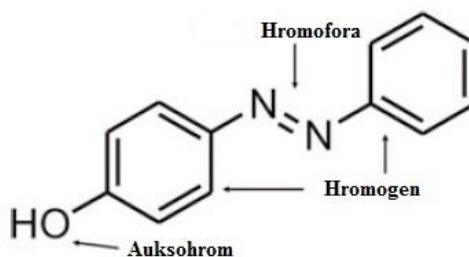
Pored hromofore, većina molekula boje poseduje i *auksohromu*. Auksohromne grupe ne utiču na obojenost ili nijansu molekula boje, ali utiču na apsorpciju i pojačavaju intenzitet boje. Ovaj efekat je posebno izražen prilikom konjugacije nekoliko hromofora i auksohromnih grupa. Primeri auksohromnih grupa prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Primeri auksohroma⁵³.

Formula	Naziv
—NH ₂	Amino grupa
—NHR	Monoalkilamino grupa
—NR ₂	Dialkilamino grupa

—OH	Hidroksilna grupa
—SH	Tiolna grupa

Komponente odgovorne za obojenost molekula boje prikazane su na primeru boje saset žuta 7 (slika 10)⁵⁴.



Slika 10. Saset žuta 7.

Na osnovu slike 10 možemo zaključiti da boje, za razliku od nebojenih organskih jedinjenja, poseduju obojenost usled nekoliko razloga:

- Apsorbuju svetlost u vidljivom delu spektra (380–700 nm);
- Poseduju makar jednu hromoforu koja mora biti deo konjugovanog sistema (naizmenično postojanje dvostrukih i jednostrukih veza);
- Rezonancija elektrona, jedna od stabilisućih sila u organskim jedinjenjima.

Ukoliko bilo koja od navedenih karakteristika u molekularnoj strukturi nedostaje, karakteristična obojenost se gubi⁵⁵.

2.3.2 Klasifikacija boja

Prvobitna podela obojenih supstanci odnosila se na podelu prema rastvorljivosti u medijumu u kojem se primenjuju na boje i pigmente. Pigmenti su fine čestice neorganske supstancije koje mogu, ali i ne moraju biti obojene. Karakteristične su po svojoj nerastvorljivosti, kako u vodenom, tako i u organskom medijumu⁵⁶. Takođe, mehanizam „obojenosti“ proizvoda nakon primene pigmenata je različit u odnosu na boje: vezivanje pigmenata fizičkom adsorpcijom na vlakna ili polimernu supstancu. Za

razliku od njih, boje se odlikuju rastvorljivošću u vodenim i/ili organskim rastvaračima i poseduju afinitet za vezivanje za određene supstrate uz dugotrajniju postojanost⁵⁵.

Druga podela boja bazirala se na poreklu boje, odnosno da li je boja izolovana iz prirodnih izvora ili je dobijena sintetičkim putem⁵⁷. Usled sve češće i obimnije upotrebe boja kako u industriji, tako i u naučnim istraživanjima nastala je potreba za različitom klasifikacijom boja. Pored podele boja na osnovu porekla, boje se još mogu podeliti na osnovu još nekih osobina, a to su: na osnovu njihove rastvorljivosti, načinu aplikacije, hemijske strukture, prirode ekscitacije elektrona (apsorpcija/ fluorescencija i dr.), načinu bojenja prema tipu vlakana i dr.

Detaljnija podela nekih od ovih grupa prikazana je dole.

Prema metodi bojenja boje se dele na:

- Rastvorne boje (anjonske ili katjonske)
- Disperzne boje (nejonske, vrlo malo rastvorljive u vodi)
- Pigmenti (nerastvorni)

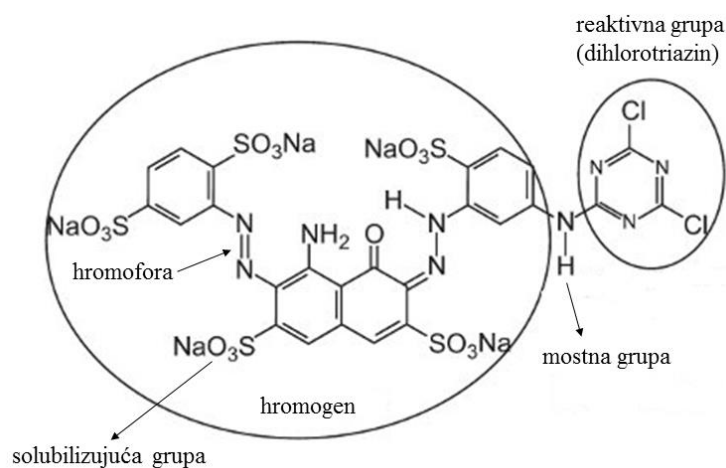
Podela na osnovu hemijskog sastava boje:

- Azo boje i pigmenti (mon azo, diazo itd.)
- Antrahinonske
- Benzodifuranonske
- Policiklične aromatične karbonilne
- Indigoidne
- Polimetinske i srodne
- Stiril
- Di- i tri-aril metanske i srodne
- Ftalocijaninske
- Hinoftalonske
- Sumporne
- Nitro i nitrozo
- Ostale (stilbenske i formazanske boje)

Međutim i dalje najpopularniji način klasifikacije boja predložen je od strane američke komisije za međunarodnu trgovinu⁵⁶. Ovaj sistem obuhvata podelu boja na:

- Direktne
- Vat
- Sumporne
- Organske pigmente
- Reaktivne boje
- Disperzne boje
- Kisele boje
- Azotne
- Bazne

Od posebnog su značaja **reaktivne boje** koje su dobile naziv prema svojoj karakterističnoj reaktivnosti ka supstratu na koji se primenjuju⁵⁶. Godišnja proizvodnja ovih boja 2011. god. prevazišla je 350000 t³. Njihova glavna odlika je postojana i jarka boja usled stvaranja kovalentne veze molekula boje sa polimerom supstrata na koji se primenjuje (uglavnom celulozna i proteinska vlakna)⁵⁸. Ova reakcija odigrava se pod alkalnim uslovima, uglavnom sa dodatkom soli i potrebnih fiksatora⁵⁶. Međutim, često se dešava hidroliza boje u rastvoru pre nego reakcija vezivanja za vlakna, što dodatno utiče na pojačano bojenje vode zaostale nakon industrijskog procesa⁵⁸. Struktura tipičnog molekula reaktivne boje prikazana je na slici 11.



Slika 11. Hemijska struktura tipične reaktivne boje, C.I. reaktivno plava 109.

Pored već pomenutih delova molekula boje odgovornih za obojenost (hromofora, auksohroma odnosno hromogen) reaktivne boje odlikuju se strukturom H-M-R gde H označava hromogen, M mosnu grupu a R reaktivnu grupu. Preko mosne grupe (imino, etilen, metilen, etarske i sulfidna) hromofora je povezana za reaktivnu grupu u molekulu boje. Međutim, u nekim tipovima reaktivnih boja mosne grupe nisu prisutne (npr. C.I. reaktivno plava 19). Reaktivne boje odlikuju se i prisustvom solubilizujuće grupe koja omogućava bolju rastvorljivost boje u vodi. Kao solubilizujuće grupe najčešće se koristi sulfonska kiselina ili sulfonamidna grupa (-SO₂NH₂). Najvažnije reaktivne grupe su hlorovani triazini i vinilsulfonska grupa.

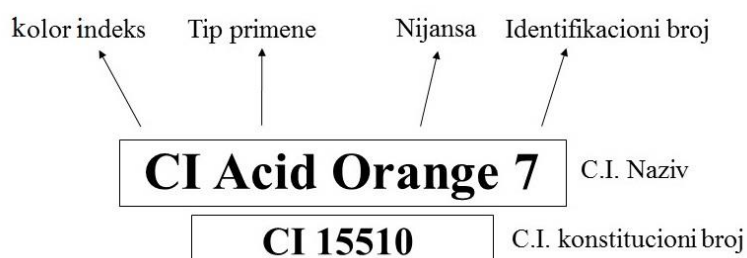
2.3.2.1 Klasifikacija prema C.I. sistemu

Generalni sistem klasifikacije boja i pigmentata uvelo je društvo „*Society of dyers and colourists*“⁵⁹. Ovaj sistem poznat je kao kolor indeks (C.I., eng. *Colour Index*). Ovaj sistem ima za cilj uvođenje objedinjene međunarodne klasifikacije boja i pigmentata na osnovu 2 parametra:

- **C.I. naziv:** koji prikazuje način primene boje, njene nijanse i serijskog broja;
- **C.I. konstitucioni broj:** ukoliko je hemijski sastav boje publikovan, njemu biva dodeljen ovaj broj u cilju klasifikacije boja na osnovu hemijske strukture.

Prva knjiga „*Color Index*“ objavljena je 1925. god. i sadržavala je nekoliko tomova, dok je poslednje, treće, izdanje objavljeno 1971. god. Danas *Color Index International* sadrži bazu od preko 27000 individualnih boja raspoređenih u 13000 C.I. generičkih imena i dostupna je isključivo online⁵⁹.

Ilustrativni primer klasifikacije boje na osnovu CI sistema pokazan je na slici 12.



Slika 12. Kolor indeks za oranž II.

Dakle, svaka boja definisana je petocifrenim, jedinstvenim, C.I. konstitucionim brojem na osnovu koga je klasifikovana u C.I. sistemu. Takođe, ovaj broj dobija se na osnovu hemijske strukture date boje, stoga je moguće pretpostaviti kom tipu strukture pripada data boja (tabela 4)

Tabela 4. Opseg CI konstitucionog broja prema strukturalnoj pripadnosti.

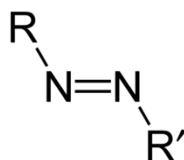
Struktura	Ospeg
Nitrozo	10000-10299
Nitro	10300-10999
Monoazo	11000-19999
Diazo	20000-39999
Stilben	40000-40799
Diarilmetan	41000-41999
Triarilmetan	42000-44999
Ksanten	45000-45999
Akridin	46000-46999
Hinolin	47000-47999
Metinin	48000-48999
Tiazol	49000-49399
Indamin	49400-49699
Indofenol	49700-49999
Azin	50000-50999
Oksazin	51000-51999
Tiazin	52000-52999
Aminoketon	56000-56999
Antrahinon	58000-72999
Indigoidne	73000-73999
Ftalocijanin	74000-74999
Prirodne boje	75000-76999
Neorganski pigmenti	77000-77999

Na osnovu slike 12 i tabele 4 može se zaključiti da je boja oranž II monoazo tipa.

Boje od najvećeg značaja za tekstilnu industriju mogu se podeliti u tri visoke klase u zavisnosti od hromofore koju poseduju: (a) azo, (b) antrahinonske i (c) ftalocijaninske boje⁵⁶. Ove grupe zastupljene su i do 75% u tekstilnim bojama⁵⁷. Odlikuju se hemijskom reakcijom između molekula boje i vlakna, što rezultuje formiranjem nerastvornog molekula boje na vlaknu³.

2.3.2.1.1 Azo boje

Azo boje su najzastupljenija klasa boja. Jedan od razloga velike zastupljenosti jeste dobijanje intenzivno obojenih i svetlih materijala u odnosu na druge boje³. Ova klasa boja odlikuje se prisustvom azo grupe u molekulu boje (Slika 13).



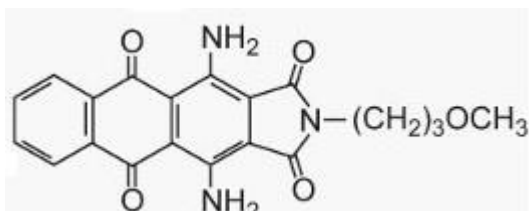
Slika 13. Opšta struktura azo boje sa prikazanom azo vezom.

Azo boje mogu sadržavati jednu ili nekoliko azo grupa (mono-, di-, tri-). Boje koje sadržavaju više od 3 azo grupe svrstavaju se u poliazo boje. Azo grupa povezana je sa dve grupe, od kojih je makar jedna aromatična. U slučaju monoazo boja, **R** grupa uglavnom sadrži elektron-akceptorski supstituent, dok **R'** sadrži elektron donorski supstituent (hidroksilna ili amino grupa)⁵⁸. Odlikuju se reaktivnom grupom koja formira kovalentne veze sa OH—, NH₂— i HS— grupama na vlaknima supstrata (pamuka, svile ili najlona)⁵⁶. Azo boje su takođe veoma rastvorljive u vodenom medijumu, a nakon upotrebe zaostaju i do 50 % u otpadnoj vodi^{3,58}.

2.3.2.1.2 Antrahinonske boje

Pored azo klase boja, antrahinonske boje su takođe u značajnoj primeni. Sačinjavaju oko 15% tržišta tekstilnih boja. Antrahinonske boje zasnivaju se hinonskoj strukturi, odnosno antrahinonu. Dodatkom jake elektron donorske grupe (poput amino i

hidroksilne grupe) u jednom od 4 položaja α C-atoma (1,4,5 i 8) antrahinona dobija se boja od komercijalnog značaja⁵⁶. Zahvaljujući velikom broju kombinacija donorskih grupa i supstitucionih shema moguće je dobiti boje različitih nijansi⁵⁴. Primer tipične antrahinonske boje prikazan je na slici 14⁵⁶.

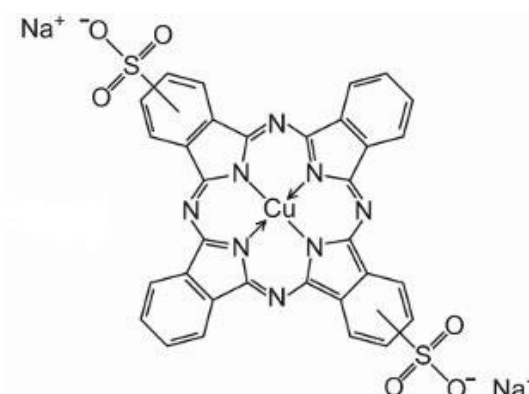


Slika 14. C.I. disperzno plavo 60.

Antrahinonske boje nisu potpuno rastvorne u vodi, stoga zahtevaju prisustvo redukcionog sredstva (uglavnom natrijum-hidrosulfit). Međutim, usled svojih loših fiksacionih osobina i visoke cene, boje ove klase su sve manje u upotrebi⁵⁷.

2.3.2.1.3 Ftalocijaninske boje

Ftalocijaninske boje sastoje se iz četiri molekula izoindola. Ovi molekuli međusobno su povezani preko atoma azota u ftalocijanin. Ftalocijaninske boje zahtevaju koordinaciju sa metalnim jonom u cilju dobijanja obojenosti. Primer ftalocijaninske boje dat je na slici 15.



Slika 15. C.I. Direkt plavo 86.

Od najvećeg značaja su bakar-ftalocijaninske boje koje zauzimaju do 2% tržišta tekstilnih boja jer daju briljantno plave i zelene nijanse.

2.4 Boje kao obojeni ksenobiotici

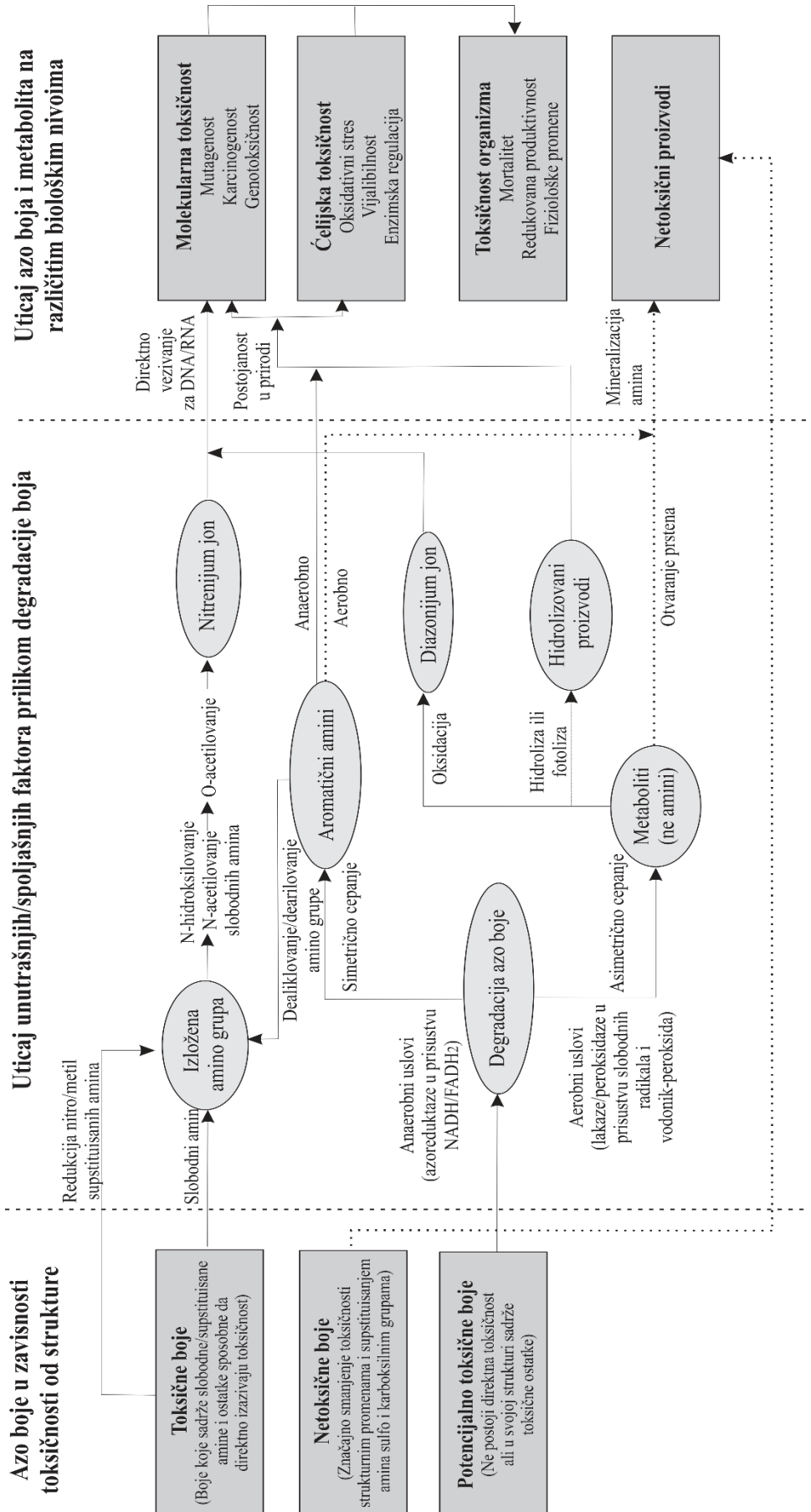
Svaka strana supstancija prisutna u biološkom sistemu klasifikuje se kao *ksenobiotik*. Ovo uključuje i supstancije koje se mogu naći u organizmu ali nisu njegov proizvod i koje su potencijalno štetne za njega. Takođe, prirodna i veštački sintetisana jedinjenja koja usled svojih antropogenih osobina bivaju prisutna u velikoj koncentraciji u životnoj sredini, mogu se klasifikovati kao ksenobiotici. Stoga, sintetičke boje prisutne u vodenim tokovima koje usled svojih osobina bivaju perzistentne, smatraju se *obojenim ksenobiotikom*. S obzirom na to da se svaki kontaminant sa izrazito negativnim uticajem na menjanje fizičkih, hemijskih i bioloških osobina životne sredine smatra *ekološkim zagađivačem* ovo otvara novo poglavlje u definisanju i pristupu u rešavanju problema obojenih otpadnih voda⁶⁰.

Boje koje se primenjuju u tekstilnoj industriji moraju posedovati nekoliko bitnih osobina poput visoke hemijske stabilnosti i fotostabilnosti, kao i otpornost na uobičajene metode primenjene tokom bojenja tkanina i sl. Većina obojenih ksenobiotika pristunih u otpadnim vodama pripadaju klasi azo boja. Njihova visoka rastvorljivost u vodi, što pogoduje procesu bojenja je jedan od limitirajućih faktora prilikom njihovog uklanjanja iz otpadne vode zaostale nakon bojenja. Obojeni ksenobiotici prisutni su u velikim količinama u vodama nakon industrijskog procesa sa prosečnom koncentracijom od 10 mg L⁻¹. U najgorem slučaju koncentracija boje pri mestu ispuštanja može biti od 300 do 1550 mg L⁻¹⁵⁷.

Zagađenje izazvano otpuštanjem obojene otpadne vode ima za posledicu nekoliko faktora. Obojene otpadne vode snažno utiču na fotosintetički kapacitet ekosistema smanjujući prodiranje svetlosti. Ovo utiče na rast biljaka i drugih živih organizama u ekosistemu. Pored toga, boje i njihovi proizvodi degradacije mogu imati genotoksični i mutageni efekat i na taj način snažno uticati na genetski materijal i reproduktivni sistem vertebrata i invertebrata⁶¹.

Ekotoksičnost azo boje ili njegovog metabolita nije rezultat samo njihove hemijske strukture, nego i različitih ekoloških faktora (biotičkih i abiotičkih) pod kojim ove supstance interaguju u prirodnim uslovima⁶². Shematski dijagram koji ukazuje na kompleksnost interakcija boja (njihovih hemijskih struktura) i životne sredine prikazan je na slici 16.

Slika 16. Sudbina azo boja i njihovih metabolita nastalih pri različitim putevima razgradnje u životnoj sredini. Punim linijama prikazani su putevi koji vode do toksičnih metabolita, dok isprekidane linije predstavljaju puteve razgradnje koji vode do netoksičnih metabolita. Preuzeto i modifikovano ⁶².



Brojne studije pokazale su efikasnost enzimskih sistema u tretiranju i uklanjanju obojenih ksenobiotika^{4,63-65}. Većina ovih studija zasniva se na tretmanu rastvora azo boja, pronalaženju optimalnih uslova maksimalnog obezbojavanja, degradacije i sl. Procena efikasnosti sistema bazirana je na hemijskoj analizi dobivenih proizvoda nakon enzimskog tretmana. Iako je sama po sebi ova analiza zahtevan zadatak usled prisustva, uglavnom, velikog broja proizvoda degradacije i/ili transformacije, ona svakako nije dovoljan parametar za procenu efikasnosti datog tretmana u detoksifikaciji otpadne vode. Stoga, problem obojene otpadne vode ne može se „napasti“ samo iz ugla uklanjanja boje i/ili ksenobiotika oksidativnim enzimima. Biološki uticaj boje i njihovih metabolita, kao i degradacionih proizvoda, mora se uzeti u obzir.

Ekotoksikološka analiza je u prednosti naspram hemijske, jer uzima u obzir sledeće parametre⁶²:

- procenu na različitim nivoima bioloških organizacija (molekulska, ćelijska i sl.);
- procenu na vrstama različitog stepena organizacije;
- procenu zasnovanu na realnom sistemu (analiza celokupne reakcione smeše nakon tretmana, a ne praćenje isključivo jedne, ciljne komponente, npr. stepen umanjenja boje pre ili posle tretmana);
- identifikacija i karakterizacija boje kao i proizvoda nakon degradacije.

2.4.1 Toksičnost obojenih ksenobiotika na molekulskom nivou

Azo boje odlikuju se efektivnom rezistencijom na biodegradaciju pri aerobnim uslovima. Njihova rekalcitrantnost pripisuje se prisustvu sulfonatnih grupa i azo veza. Iako je azo grupa u molekulu boje podložna reduktivnom cepanju, što za posledicu ima eliminaciju boje, ona je svakako jedan od glavnih izvora aromatičnih amina u otpadnim vodama te se može smatrati obojenim ksenobiotikom⁶⁶. Takođe, tokom asimetričnog cepanja dvostruke azo veze može doći do formiranja krajnjeg proizvoda drugačijih osobina⁶⁷. Pomalo nepredvidiva sudbina boja u životnoj sredini potcrtana je i činjenicom da može doći i do generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). ROS mogu nastati usled prisustva molekula boje u životnoj sredini, tokom reduktivne biotransformacije azo veze u molekulu boje, kao i proizvodima nastalim nakon oksidacije obojenih

ksenobiotika⁶⁸. Pojava endogenih ROS može imati za posledicu genotoksičnost putem progresivnog oštećivanja molekula DNA⁶⁹. Nekoliko studija pokazalo je da aromatični i amini poreklom od molekula boje mogu biti potencijalni mutageni i/ili karcinogeni^{62,68,70}. Međutim, testiranje eko- i geno- toksikoloških efekata komercijalnih tekstilnih boja tek treba da budu sprovedena i sistematizovana u cilju predviđanja potencijalnih opasnosti po vodene organizme, ali i ljude⁷¹.

Uobičajene strategije testiranja genotoksičnosti sastoje se od detekcije mutacija (gena, hromozoma i genskih mutacija) kao i tzv. indikatorskih efekata povezanih sa mutacijama (npr. DNA lezije ili popravke) gde pozitivan ishod sugeriše karcinogenu opasnost. S obzirom na to da toksikanti mogu iskazati različite načine delovanja u zavisnosti od načina izlaganja, kao i organizma, u ljudima, procena genotoksičnih/mutagenih potencijala bi trebalo da se zasniva na što bližem modelu sisara⁷². Procena toksičnosti na molekulskom nivou najpre podrazumeva procenu uticaja obojenog ksenobiotika na DNA putem indukovanja oksidativnih oštećenja posredovana ROS-om⁷³.

2.4.1.1 Oksidativno oštećenje molekula DNA

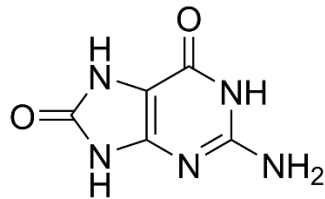
Oštećenje molekula DNA predstavlja potencijalno važan način uticanja na moduliranje neželjenih procesa u organizmu. Postoje tri različita mehanizma nastajanja prekida na molekula DNA: hidroliza DNA, fotohemijsko cepanje, oksidativno cepanje⁷⁴.

Oksidativno cepanje se dešava kako na nivou ugljenohidratne komponente, tako i na nivou baza u molekulu DNA. Posledice oksidativnog oštećenja moguće je detektovati na sve četiri baze ali i na dezoksiribozi.

Oksidativna degradacija šećera rezultira homolitičkim ili heterolitičkim raskidanjem C–H veze i formiranjem karboradikala ili karbokatjona. Formiranje ovih reaktivnih intermedijera rezultuje fragmentacijom polimera različitim mehanizmima koji zavise od pozicije početnog H koji je apstrahovan (C4'-H ili C1'-H), oksidativnog agensa koji je učestvovao u reakciji i koncentracije molekulskog kiseonika prisutnog u rastvoru. Pored selektivnosti prema jednoj C–H vezi u odnosu na drugu, različiti agensi koji dovode do prekida lanca DNA mogu pokazivati i visok stepen selektivnosti prema određenoj sekvenciji, što zavisi od toga kako su se nekovalentno asosovali sa nukleinskim kiselinama

pre prekida lanca⁷⁵.

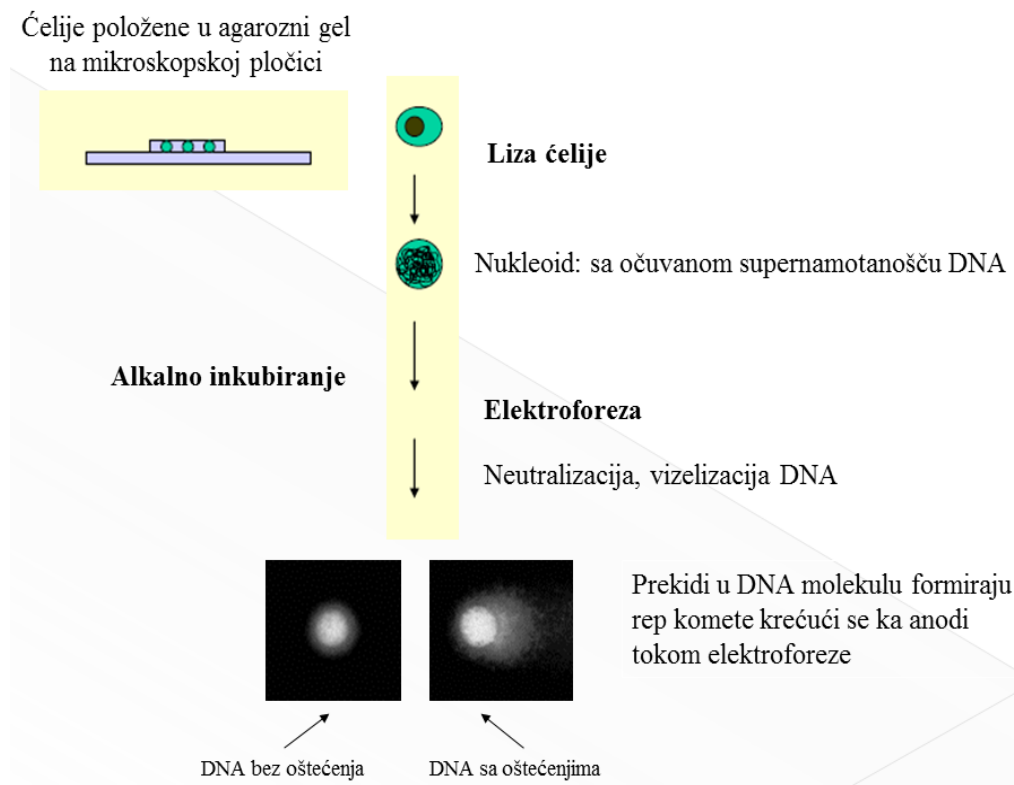
Oksidativno cepanje molekula DNA na nivou nukleinskih baza prevashodno se dešava na poziciji guanina usled njegovog nižeg oksidacionog potencijala u odnosu na druge baze^{74,76}. Sveprisutno obeležje pretrpljenog oksidativnog stresa u ćeliji je prisustvo 8-okso-guanina (slika 17).



Slika 17. Struktura 8-okso-guanina.

8-Oksoguanin se u ćeliji može formirati izlaganjem nukleinske baze jednoelektronskim oksidansima poput: $O_2^{\bullet-}$ - superoksid anjon radikal, H_2O_2 - vodonik peroksid, i $\bullet OH$ - hidroksil radikala.

Koncentracija 8-oksoguanina u ćeliji predstavlja merilo oksidativnog stresa. Merenje oksidativno oštećenih molekula DNA predstavlja izazov za uobičajene metode detekcije poput HPLC-ESI/MS-MS usled njihove male zastupljenosti⁷⁶. Stoga je prevashodna metoda za „skrining“ supstancija kao uzročnika oksidativnog oštećivanja DNA komet test. Komet test je osetljiva i svestrana metoda za detekciju prekida lanaca i alkalno-labilnih mesta na molekulu DNA na nivou pojedinačne eukariotske ćelije⁷⁷. Shematski prikaz komet testa prikazan je na slici 18.



Slika 18. Osnovni koraci u komet testu.

Ova metoda zasniva se na formiranju tankog sloja na mikroskopskoj pločici od suspenzije ćelija i agaroze. Prethodni korak jeste izlaganje ćelija subtoksičnim koncentracijama ispitivane supstance *in vivo* ili *in vitro* u cilju održavanja visokog nivoa vijabilnosti ćelija. Nakon stavljanja ćelija u gel i lize pomoću detergenta i visoke jonske sile, sve ćelijske i nuklearne membrane kao i solubilni sadržaj ćelije biva otpušten iz gela. Nukleozomalna organizacija DNA biva poremećena ekstrakcijom histona, dok negativna supernamotanost DNA preživljava dokle god je DNA netaknuta. Nakon elektroforetskog razdvajanja, ova gusto napakovana DNA zadržava svoj loptasti oblik, koji nakon vizuelizacije pod mikroskopom podseća na krug. Ukoliko je supernamotanost relaksirana usled prekida na lancu DNA, tada je moguće kretanje ove oslobođene petlje ka anodi pod dejstvom električnog polja. Što je veći broj prekida prisutan, relaksiranje DNA petlji je veće, odnosno kretanje DNA ka anodi prilikom elektroforeze je izraženije. Pregledom pod mikroskopom ovaj efekat vidljiv je kao razmaz kruga koji izgledom podseća na kometu. Procenat DNA u repu komete (izražen kao procentualni odnos između intenziteta totalne fluorescencije prisutne u repu komete i intenziteta ukupne komete tj. glave i repa

komete) odražava broj oslobođenih DNA petlji odnosno frekvenciju prekida u molekulu DNA⁷⁷.

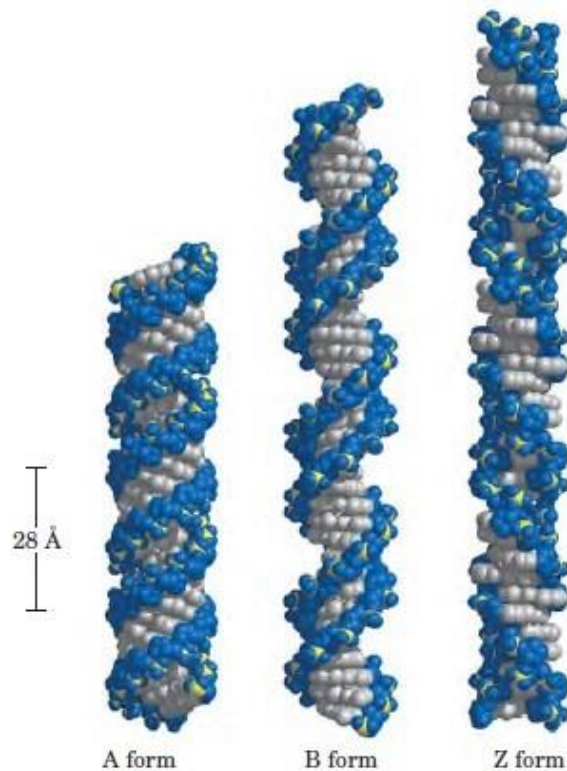
Ukoliko se uzme u obzir činjenica da većina agenasa koji oštećuju DNA to čini putem formiranja DNA adukata ili alternacijom baza, inkorporacijom DNA reparacionih enzima moguće je prevazići ograničenje komet testa kao metode koja detektuje isključivo DNA prekide i alkalno-labilna mesta. Upotrebom enzima koji učestvuju u reparaciji DNA molekula, a omogućuje detekciju specifičnih lezija na molekulu DNA nastalih kao posledica pretrpljenog napada ROS-om može se prevazići ograničenje osnovnog komet testa⁷⁸. Formamidopirimidin-DNA-glikozilaza (FPG) je enzim koji deluje dvostruko: kao N-glikozilaza i AP-lijaza. N-Glikozilazna aktivnost oslobađa oštećene purine iz molekula DNA stvarajući apurinska mesta (AP mesta) na DNA. AP-lijazna aktivnost FPG-a seče obe strane lanca (3' i 5') na AP mestu što rezultuje gubitkom date nukleinske baze. Upoređivanjem stepena DNA oštećenja detektovanog na DNA bez i nakon koraka inkubiranja sa bakterijskim FPG-om moguće je zaključiti da li i u kojoj meri su prisutna oksidativna oštećenja (prvenstveno 8-oksoguanin) na molekulu DNA.

2.4.1.2 Interakcije boja i DNA

Boje ne uzrokuju toksičnost isključivo putem oksidativnog cepanja molekula DNA nego i drugim mehanizmima. Usled svoje aromatične strukture boje poseduju tendenciju interagovanja sa molekulom DNA mehanizmom različitim od ROS-a⁷⁹.

2.4.1.2.1 Interakcije boja i dvostruke linearne DNA

Molekul DNA je dvostruki heliks sačinjen iz dva antiparalelna polinukleotidna lanca međusobno povezana slabim, nekovalentnim vezama formiranim između baza od kojih se sastoji. DNA se odlikuje fleksibilnošću i mogućnošću postojanja u nekoliko prostornih oblika (slika 19).



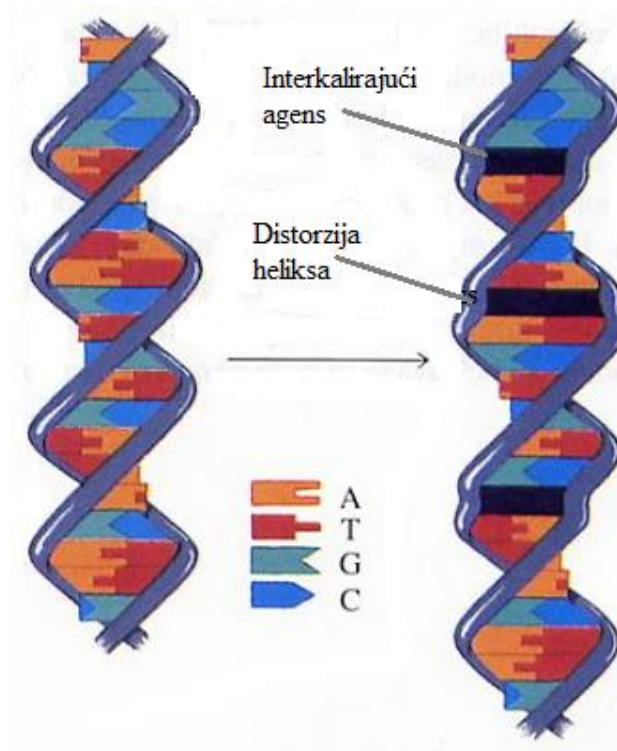
Slika 19. Polimorfizam DNA molekula. A, B i Z konformacije DNA molekula.

Među ovim formama, pod fiziološkim uslovima, najzastupljenija i najstabilnija je forma B. Forma B sadrži 10,5 baznih parova po zavoju heliksa i desnog je navoja. Stabilizujuća sila koja pomaže održavanju dupleksa DNA su π — π interakcije između aromatičnih ravni unutar DNA⁸⁰.

Interakcija malih molekula (uključujući i obojene ksenobiotike) i DNA može biti kovalentnog ili nekovalentnog tipa. Prilikom kovalentnog tipa interakcija dolazi do stvaranja kovalentne veze vezivanjem reaktivnog dela drugog molekula sa N atomom unutar baze DNA (uglavnom guanina)⁸¹. S druge strane, interakcije jedinjenja sa molekulom DNA nekovalentnog tipa su u vidu stvaranja ravnotežnog nekovalentnog kompleksa sa DNA.

Nekovalentno vezivanje jedinjenja za dvostruki lanac DNA može dovesti do distorzije njene strukture na sledećih nekoliko načina: interkalacijom u dvostruki heliks molekula DNA, vezivanjem u brazdu na molekulu DNA i elektrostatičkim vezivanjem za fosfodiastarsku kičmu molekula DNA.

Ukoliko boja poseduje planarnu aromatičnu strukturu moguće je njeno umetanje u dvostruki heliks molekula DNA. Ovaj tip interakcije poznatiji je kao interkalacija (slika 20).



Slika 20. Promene šećerno-fosfatne kičme molekula DNA nakon interkalacije.

Interkalacija predstavlja interakciju između katjonskih, planarnih i policikličnih aromatičnih sistema i nadslojenih baznih parova u hidrofobnoj unutrašnjosti DNA lanca. Ligand koji se interkalira u DNA prvobitno svojim pozitivno naelektrisanim delom putem difuzije se asosuje sa spoljašnjom stranom heliksa DNA, najverovatnije izmenjujući jone Na^+ ili Mg^{2+} prisutne u „kondenzacionom oblaku“. Potom dolazi do umetanja planarnog dela molekula između hidrofobne sredine dva bazna para⁸². Interkalacija dovodi do značajnih promena u strukturi DNA. Umetanje molekula boje između baznih parova zahteva odvajanje baznih parova (jer su bazni parovi sparni vodoničnim vezama) što prouzrokuje distorziju DNA molekula, kao i odmotavanje dvostrukog heliksa. Odmotavanje i izduživanje molekula DNA povećava razmak između fosfata i smanjuje se naelektrisanje duž ose heliksa. Najpoznatiji interkalator je etidijum-bromid.

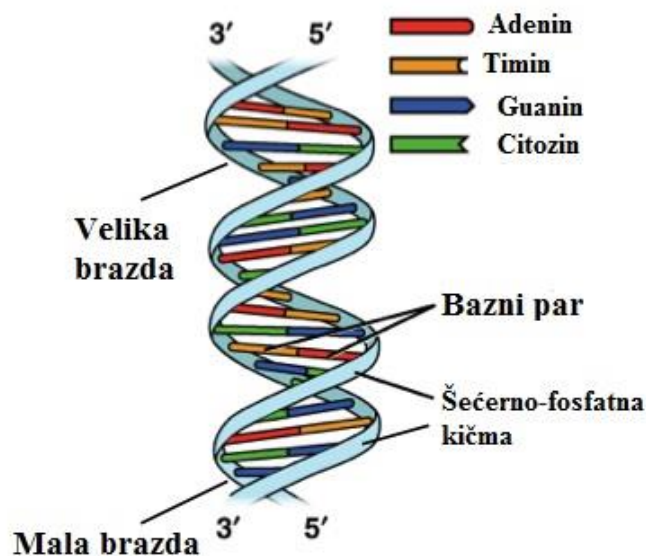
Molekuli boje mogu se interkalirati svojom dužom osom paralelno ili pod pravim uglom u odnosu na mesto vezivanja (slika 21)⁸³.



Slika 21. Šematski prikaz interkalacije molekula boje (crni blokovi) u baze DNA (sivi blokovi): a) paralelno, b) pod pravim uglom.

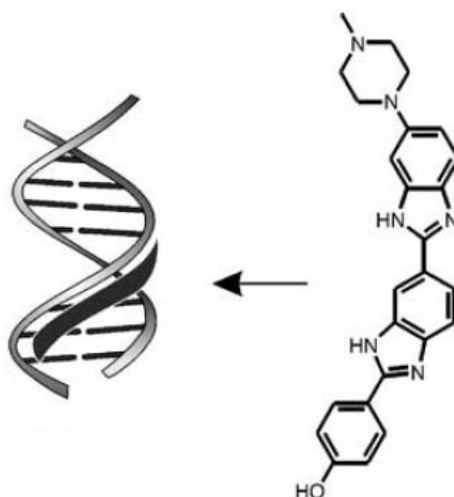
Primeri jedinjenja koji se interkaliraju paralelno su derivati akridina i metilenskog plavog, dok se jedinjenja koja su derivati antraciklina interkaliraju umetanjem pod pravim uglom.

Usled različite geometrije Watson–Crick-ovog sparivanja azotnih baza molekula DNA lanci kičme molekula DNA bliže su na jednoj strani heliksa nego na drugoj. Velika brazda javlja se na tamo gde su lanci udaljeniji, dok se mala brazda javlja na mestu gde su ovi bliži (slika 22)⁷⁴.



Slika 22. Velika i mala brazda molekula DNA.

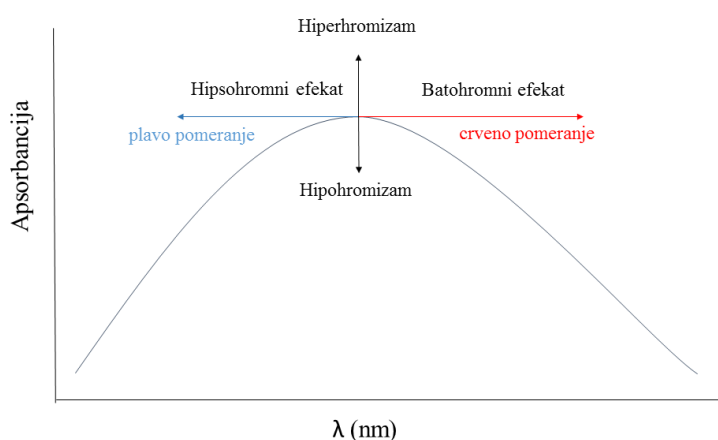
Velika brazda je šira i dublja nego mala brazda. Vezivni džep brazde DNA karakteriše se „dnom“ koje oformljavaju okolne baze unutar brazde i „zidom“ koji se formira od dezoksiribozno-fosfatne kičme DNA. Postojanje velike i male brazde omogućuje vezivanje jedinjenja mehanizmom drugačijim od interkalacije. Molekuli koji se vezuju u brazdu DNA uglavnom preferiraju A-T bogati region molekula DNA. Oni poseduju barem dva aromatična ili heteroaromatična prstena čije veze dozvoljavaju fleksibilnost u zauzimanju odgovarajućeg položaja za „naleganje“ u brazdu. Pored toga, potrebno je da funkcionalne grupe formiraju vodonične veze sa nukleinskim bazama na dnu brazde DNA. Hoechst 33582 je tipičan predstavnik molekula koji se vezuje u maloj brazdi DNA (slika 23)⁸³.



Slika 23. Vezivanje organske boje Hoechst 33582 u brazdu DNA.

Praćenje promena fizičkih karakteristika DNA nakon interagovanja sa drugim molekulom moguće je usled toga što je priroda tih promena dovoljna da se odrede kvantitativni i kvalitativni parametri koji bi potvrdili interakciju. Interakcije malih molekula i polinukleotida DNA prvenstveno mogu da uzrokuju promene u njihovim spektrometrijskim osobinama. UV–vidljiva spektrometrija je korisna metoda za ispitivanje načina vezivanja obojenih ksenobiotika i DNA jer su DNA baze, kao i obojeni ksenobiotici odličnih spektralnih karakteristika. Za određivanje tipa interakcija jedinjenja sa DNA pomoću apsorpcione spektrometrije uglavnom se primenjuje DNA iz telećeg timusa (CT-DNA). Vezivanje za CT-DNA može da bude na različitim mestima na molekulu i formiranjem različitih tipova veza. Nastale promene mogu se analizirati praćenjem

promena apsorpcionog maksimuma posmatranog molekula (slika 24).



Slika 24. Karakteristične promene A_{\max} u UV–Vis apsorpcionom spektru.

Hiperhromizam i *hipohromizam* su spektralne promene u intenzitetu A_{\max} na istoj talasnoj dužini. Ove promene javljaju se kao posledica promena u dvostrukom heliksu DNA nakon interakcije sa nekim jedinjenjem⁸⁴. Kontrakcija CT-DNA u smeru ose heliksa često je praćena promenama u konformaciji molekula DNA i odlikava se smanjenjem intenziteta apsorpcije rastvora nakon interakcije odnosno *hipohromizmom*^{82,85}. *Hiperhromizam* (povećanje intenziteta apsorpcije) rezultat je denaturacija dvostrukog heliksa odnosno izlaganjem baza DNA okolnom rastvoru čime se povećava apsorptivnost rastvora. Procenat hiper- odnosno hipohromizma DNA pre i nakon interakcije sa molekulom od interesa može se odrediti na osnovu jednačine⁸⁶:

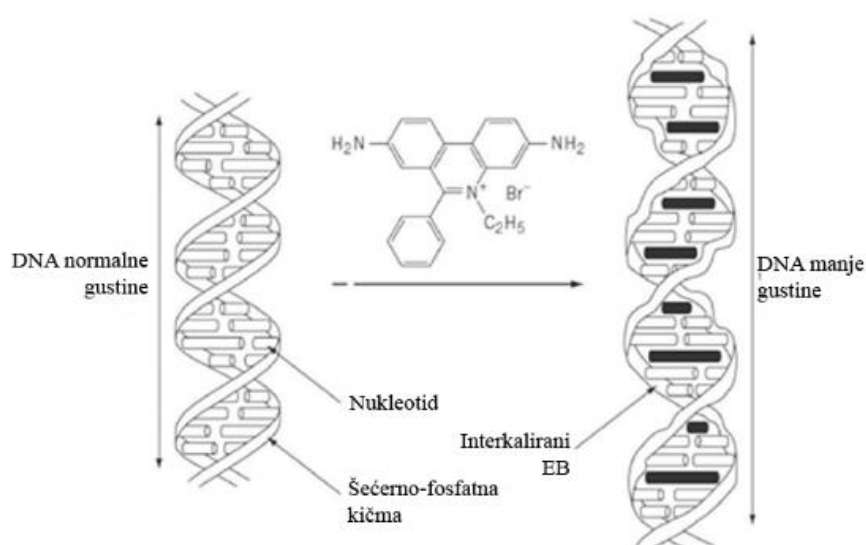
$$\frac{(\varepsilon_{DNA+\varepsilon_D})-\varepsilon_B}{\varepsilon_{DNA+\varepsilon_D}} \times 100 \quad (1)$$

gde ε_{DNA} predstavlja ekstinkcioni koeficijent CT-DNA, ε_D predstavlja ekstinkcioni koeficijent slobodne boje i ε_B predstavlja ekstinkcioni koeficijent kompleksa boje i DNA. Pored ovih efekata moguća su i pomeranja A_{\max} plavom delu spektra (*hipsohromni efekat*), kao i *batohromni efekat* odnosno pomeranje ka crvenom delu spektra. Ovi efekti rezultat su stabilizacije ili destabilizacije sekundarne strukture molekula DNA. Pojava tzv. *izozbestičke tačke* u apsorpcionom spektru označava promenu jednog apsorbujućeg entiteta u drugi sa istim molarnim koeficijentom apsorpcije na posmatranoj talasnoj

dužini. Ovaj fenomen je koncentraciono zavisian i održaće se dokle god je koncentracija dve supstance u rastvoru ista⁸⁷. Pojava *izobestičke tačke* tokom titracije ispitivanog molekula sa rastućim koncentracijama DNA ukazuje na to da druga molekulska vrsta postoji u slobodnoj ili vezanoj formi sa DNA^{88,89}.

Praćenje interakcija DNA i obojenih ksenobiotika moguća je i fluorescentnom spektrometrijom. Ukoliko interakcije ispitivanog jedinjenja nije moguće pratiti direktno kroz promenu spektroskopskih osobina, moguće je afinitet ispitivanog jedinjenja prema DNA ispitati posrednom kompeticijom sa jedinjenjem poznatog načina vezivanja. Etidijum-bromid (EB) je katjonska boja aromatične strukture sa heterocikličnim jezgrom. Pozitivno naelektrisanje omogućava joj elektrostatičko vezivanje i hidrofobne interakcije sa fosfatnom kičmom DNA molekula koje prethodi interkalaciji.

Interkalacijom EB u DNA drastično se povećava fluorescentnost i poluživot nastalog kompleksa [EB—CT-DNA] (slika 25).



Slika 25. Interkalacija etidijum-bromida (EB) u DNA heliks.

Mogućnost praćenja istiskivanja molekula EB iz kompleksa EB—CT-DNA sa ispitivanim jedinjenjem (izraženo kroz gašenje fluorescencije datog kompleksa) može da pruži uvid u afinitet jedinjenja prema interkaliranju u DNA⁹⁰. Ukoliko dodati molekul interaguje sa DNA na sličan način kao i EB, doći će do smanjenja intenziteta fluorescencije kompleksa EB—CT-DNA usled kompeticije drugog molekula (kvenčera) sa EB za vezivno mesto na DNA. Opseg fluorescentnog gašenja EB vezanog za CT-DNA

može biti merilo vezivanja drugog molekula i CT-DNA. Kvantitativna procena srazmere „gašenja“ fluorescencije moguća je primenom modifikovane Stern-Volmerova jednačine⁹¹:

$$\frac{I_0}{I} = K_{sv} \times r, \quad (2)$$

gde I_0 predstavljaju fluorescentni intenzitet u odsustvu kvenčera, dok I predstavlja fluorescentni intenzitet u prisustvu kvenčera, K_{sv} je Stern-Volmerova konstanta kvenčovanja (gašenja), r je odnos koncentracija kvenčera prema CT-DNA. K_{sv} se može odrediti iz nagiba prave dobijene iz krive I_0/I prema r .

Određivanje tipa prirode gašenja fluorescencije (statično ili dinamično) moguće je primenom jednačine⁹¹:

$$k_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad (3)$$

gde je k_q prividna bimolekularna konstanta brzine kvenčovanja. τ_0 je poluživot fluorescencije kompleksa u odsustvu kvenčera i on iznosi 10^{-8} s^{-1} ⁹².

Ukoliko je proces gašenja fluorescencije statičan rezultati su analizirani pomoću podataka sa dvostrukog recipročnog grafika i jednačine (4)⁹³:

$$\frac{1}{I_0 - I} = \frac{1}{I_0 - K_d} \times \frac{1}{I_0 \times [Q]} \quad (4)$$

gde je $[Q]$ koncentracija kvenčera (boje/proizvoda degradacije), K_d predstavlja konstantu disocijacije za reakciju kvenčera i fluorofore. K_d se definiše kao odnos nagiba i odsečka na y-osi grafika $1/(I_0 - I)$ prema $1/[Q]$. Naposljetku, konstanta vezivanja određena je na osnovu jednačine (5):

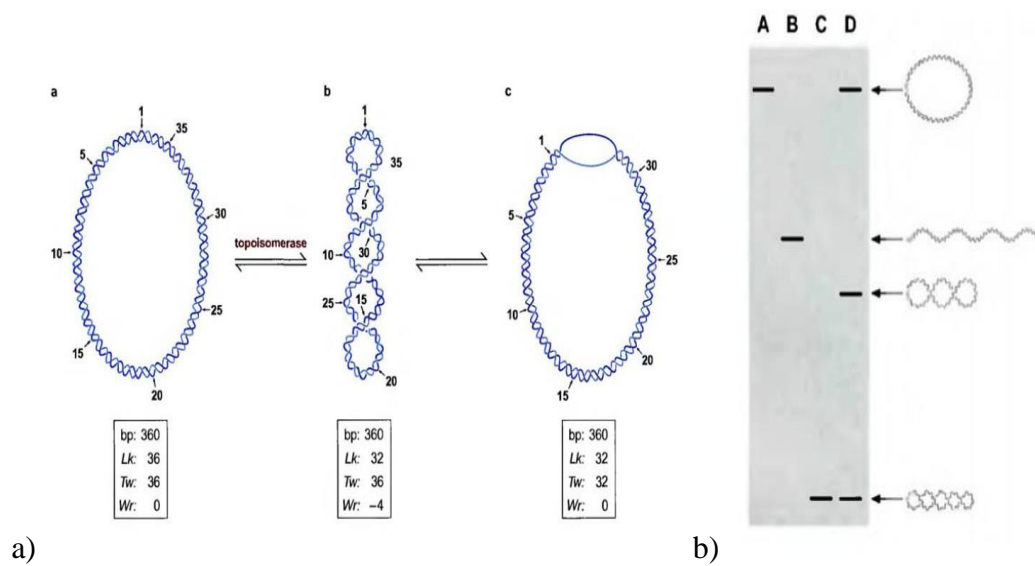
$$K_B = \frac{1}{K_d} \quad (5)$$

2.4.1.2.2 Interakcije boja i cirkularne DNA

Superuvijanje je proces uvijanja DNA u terciarnu strukturu. Pored pakovanja veoma dugačkog lanca DNA u kompaktni prostor unutar hromozoma u ćeliji, superuvijanje mora da obezbedi dostupnost bioloških podataka zapisanih u molekulu DNA⁹⁴. Dokaz da je ovo posledica naprezanja strukture DNA, jeste da mnogi cirkularni molekuli DNA ostaju u superuvijenoj formi čak i nakon izolovanja i prečišćavanja od proteina⁹⁵. Za razliku od linearne DNA prisutne kod većina eukariota, tipični bakterijski hromozomi su cirkularni.

U cirkularnom molekulu DNA nema prekida u šećerno-fosfatnoj kičmi dva lanca, tako da je broj puta koliko jedan lanac može da se obmota oko drugog definitivan i nepromenljiv. Takvi kovalentno zatvoreni cirkularni molekuli DNA su topološki ograničeni. Broj puta koliko bi jedan lanac trebalo da prođe kroz drugi u cilju odvajanja dva lanca naziva se linking broj (*eng.* „linking number“ – Lk). Linking broj je broj koji označava sumu dve geometrijske komponente – uvijanje (*eng.* „twist“) i broj zavoja po heliksu jednog lanca o drugi – previjanje (*eng.* „writhe“). Telefonski kabl je analogni primer za superuvijanje cirkularnog molekula DNA. DNA je namotana u formi dvostrukog heliksa, a dodatno se ovaj heliks umotava oko sopstvene ose stvarajući superuvijanje. Slika 26a prikazuje prelazak iz relaksirane (a) u negativno supernamotanu formu DNA (b). Lanac u supernamotanoj formi može biti superuvijen (*eng.* „supertwist“) (b) ili lokalno prekinuti bazni par (c).

Superuvijanje DNA je posledica strukturnih ograničenja. Kada nema savijanja DNA oko sopstvene ose kaže se da je DNA u relaksiranom stanju. Zahvaljujući topologiji moguće je proučavanje superuvijanja DNA. Topologija je posebna grana matematike koja se bavi proučavanjem objekata koji ne gube svoj oblik prilikom stalnog deformisanja. Ove deformacije kod DNA molekula su posledice termalnog kretanja ili interakcija sa proteinima i drugim molekulima. Topološke karakteristike cirkularnog molekula mogu biti narušene jedino u slučaju indukovanja prekida i ponovnog povezivanja jednog ili oba lanca DNA⁸⁰.



Slika 26. a) Topološke konformacije kovalentno zatvorene cirkularne DNA (cccDNA); b) Elektroforetsko odvajanje DNA topoizomera. Traka A predstavlja relaksiranu ili cirkularnu DNA (forma II), traka B je linerarna DNA (forma III), traka C je visoko uvijena supernamotana cccDNA (forma I), traka D su razdvojeni topoizomeri.

Praćenje topoloških karakteristika cirkularnog molekula DNA moguće je primenom izolovanih cirkularnih molekula DNA i agarozne elektroforeze. Tipičan primer cirkularnog molekula DNA su bakterijski plazmidi. Jedan takav plazmid je vektor pUC19 koji ima široku primenu u molekularno-biološkim eksperimentima. pUC19 je cirkularni dvostruki molekul DNA koji se odlikuje visokom supernamotanošću. Zahvaljujući ovoj karakteristici moguće je primeniti ovaj plazmid u cilju ispitivanja efekata jedinjenja na topologiju cirkularnog molekula DNA agaroznom elektroforezom (slika 26b).

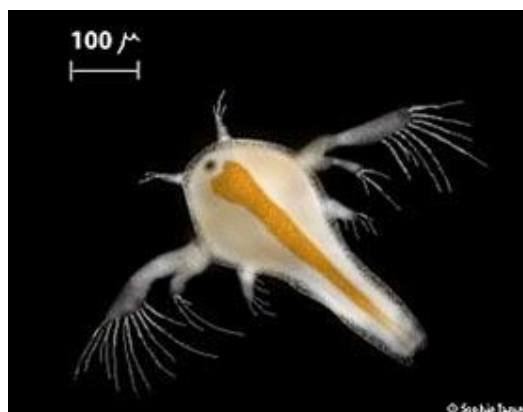
Topoizomeri su dve forme cirkularne DNA koje se razlikuju u topološkim osobinama i mogu se razdvojiti agaroznom elektroforezom ukoliko je razlika u njihovim topološkim osobinama (poput Lk broja) veća od 1. Što je veći broj previjanja, forma cccDNA je kompaktnija i lakše migrira kroz gel. Potpuno relaksirana cccDNA migrira sporije nego supernamotani topoizomer iste cirkularne DNA.

2.4.2 Toksičnost na nivou organizama

Nakon procene toksičnosti ispitivanih supstanci na molekulskom nivou potrebno je prisupiti proceni i na nivou organizama. Testovi za procenu toksikološkog uticaja na model organizam odavno su poznati u studijama toksičnosti boja⁶². Kao model organizam mogu biti primenjeni mikrobi (npr. *Escherichia coli*, *Azobacter*, *Bacillus subtilis* i dr.), životinje (*Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Danio reiro* i dr.) i biljke (*Allium cepa*, *Phaseolus* i dr.)⁶². Procena toksičnosti podrazumeva praćenje specifičnih parametara poput procenta mortaliteta, dužine korena biljke i sl. pre i nakon izlaganja supstanciji od interesa.

S obzirom na to da se većina efluenata, nakon otpuštanja iz tekstilnog pogona, odlikuje visokom koncentracijom soli, potrebno je ispitati toksičnost prema organizmima koji poseduju toleranciju prema visokom salinitetu, a dovoljno su osetljivi na druge promene u svojoj okolini. Mali morski organizmi veoma su osetljivi na promene u okruženju te predstavljaju idealan model sistem za preliminarnu procenu toksičnosti obojenih ksenobiotika i njihovog tretmana uklanjanja.

Jedan takav model sistem organizam je *Artemia salina* (eng. „brine shrimp“, slika 28) koji predstavlja jedan od najvrednijih test organizama u ekotoksikologiji i rutinski se koristi u istraživanjima preko 30 godina⁹⁶.



Slika 27. Larva *Artemia salina*.

Ova metoda je veoma rasprostranjena jer ne zahteva sterilne uslove, jedinke se vrlo lako gaje, jeftine su i lako dostupne. Procena toksičnosti supstancije prema *A. salina* zasniva se na određivanju procenta uginulih jedinki u odnosu na kontrolu nakon 24 ili 48 h izlaganja. Između ostalog, rezultati dobijeni nakon inkubiranja jedinki sa supstancijama od interesa mogu ukazati na akutnu toksičnost u vodenim ekosistemima, što predstavlja jedan od važnih preduslova u optimizaciji tretmana industrijski obojenih otpadnih voda.

2.4.3 Boje kao zagađivači u otpadnim vodama

Velike količine kvalitetne vode potrebne su prilikom procesa bojenja materijala. U zavisnosti od nijanse, tehnike i hemikalija koje se primenjuju potrebna količina može da dostigne i do 240 L po kg obojenog materijala^{3,97}. Procenjuje se da jedna fabrika tekstila omanjih razmera dnevno proizvede 8000 kg obojenog proizvoda, a u proseku potroši 1,6 miliona L vode⁶¹. Sadržaj otpadnih voda može da varira u svom sastavu i da sadrži preko 70 hemikalija upotrebljenih prilikom bojenja. Međutim, ono što je zajedničko za sve otpadne vode jeste prisustvo boja⁹⁸.

Boje u otpadnim vodama predstavljaju problem iz nekoliko razloga^{64,98}:

- iako vidljivost boja u vodenim tokovima zavisi od njenih strukturnih osobina, ekstinkcionog koeficijenta i mutnoće vode, one su suštinski vrlo vidljive. Boje prisutne i u veoma malim količinama u otpadnim vodama su vidljive (< 1 ppm)⁹⁸;
- pored estetskih problema, najveći problem je ekološka zabrinutost usled adsorpcije boje kao i refleksije sunčevih zraka što uzrokuje loše prodiranje do dubljih slojeva vode. Direktna posledica jeste ometanje rasta važnih bakterija kao i fotosinteze;
- jedan od najvećih problema je nedostatak njihove biorazgradivosti. Stoga, boje predstavljaju ekološki i ekotoksikološki rizik po okolinu^{57,61,72}.

U zavisnosti od procesa bojenja, kao i tipova vlakana količina nefiksirane boje koja može da se nađe u efluentu je različita (tabela 5).

Tabela 5. Zastupljenost nefiksirane boje nakon upotrebe ³.

Tip vlakna	Tip boje	Nefiksirana boja* (%)
Vuna i najlon	Kisele/reaktivne boje	7–20
	Metalizirane	2–7
	Azoik	5–10
	Reaktivne boje	20–50
Pamuk i viskoza	Direktne boje	5–20
	Pigmenti	1
	Vat boje	5–20
	Sumporne	30–40
Poliester	Disperzne	8–20
Akrilna	Modifikovane bazne	2–3

*Procenat nefiksirane boje izražen je u vidu % od polazne boje.

Tekstilna industrija često koristi boje čiji sastav je zaštićen što dodatno otežava predviđanje strategije njihovog uklanjanja iz obojenih otpadnih voda. Zahvaljujući brojnim regulativama otpadne vode moraju biti tretirane pre otpuštanja u vodotokove. Ovo podrazumeva tri koraka³:

1. uklanjanje suspendovanih čestica, neutralizacija kiselih/baznih tečnosti,
2. uklanjanje teških metala/smanjenje biohemijske potrošnje kiseonika,
3. uklanjanje soli.

Prvi korak u tretiranju tekstilne otpadne vode je uklanjanje suspendovanih čestica, masnoća i težih čestica. Obavezan korak je pregled otpadne vode na prisustvo plastike, vlakana i sl. Mehaničkim odvajanjem ove čestice se uklanjaju iz otpadne vode nakon čega se pristupa neutralizaciji. Efluent čiji je pH između 5 i 9 smatra se idealnim za dalji tretman.

Drugi korak jeste smanjenje biohemijske potrošnje kiseonika, BOD (*eng.* „biochemical oxygen demand“), sadržaja boja, fenola i zaostalih ulja. Ovaj korak zahteva biološki tretman mikroorganizmima koji mogu biti primenjeni na nekoliko načina. Pored toga što ovaj proces dugo traje (ponekad i do 6 dana) postoji još nekoliko problema:

visoka cena, potreban je veliki prostor za aeracione reaktore, veliki rizik od kontaminacije, emisija gasova i neprijatnog mirisa i formiranje mulja koji zaostaje nakon završetka tretmana.

Treći korak obuhvata metode uklanjanja soli i finalnog smanjenja obojenosti otpadne vode. U zavisnosti od procesa bojenja i kapaciteta fabrike metode izbora mogu biti različite: elektrodijaliza, reversna osmoza i jonoizmenjivači³.

Najvažniji hemijski i ekološki zakoni kao i regulative na svetskom nivou nalaze se u Prilogu (Prilog 1).

2.4.4 Tretmani obojenih otpadnih voda

Postoji nekoliko termina i definicija kada govorimo o tretmanu obojenih otpadnih voda. Smanjenje apsorbancije u UV–Vis spektru ili vidljive boje ukazuje na *izbeljivanje* ili *obezbojavanje*. Obezbojavanje označava degradaciju ili razgradnju hromofore boje, ali to može biti posledica razgradnje jednog dela molekula boje. *Mineralizacija* označava razgradnju molekula boje do ugljen dioksida i vode. *Apsorpcija* ili *biosorpcija* je proces pasivnog nakupljanja boje na određeni materijal ili ćelije.

Trenutno postoje tri grupe konvencionalnih metoda tretiranja obojenih otpadnih voda koje se generalno mogu podeliti na: fizičke tj. mehaničke, hemijske i biološke metode⁶⁵.

Mehaničke metode tretiranja (adsorpcija, koagulacija, filtracija, sedimentacija i dr.) obojenih voda ne pokazuju dovoljan stepen prečišćavanja obojenih otpadnih voda jer se stvara sekundarni otpad. Prelaz iz tečne faze u čvrstu iziskuje dodatna ulaganja i predstavlja novi izazov, zbog potrebe skladištenja i daljeg tretiranja sekundarnog otpada. Pri tome uglavnom dolazi do koncentrovanja toksičnih materija u njima⁹⁹. Naravno, raste i cena procesa.

Hemijske metode uključuju metode fotokatalitičkog obezbojavanja ili oksidaciju. Primenom vodonik-peroksida, izbeljivača, TiO₂, ili drugih oksidujućih sistema, dolazi do uništavanja molekula boje⁶⁵. Potrebno ih je dodavati u velikim količinama i nisu selektivni. Primena čistog ozona za tretman otpadnih voda ima opet visoku selektivnost ali nedovoljno smanjuje COD (eng. „chemical oxygen demand“) i turbiditet¹⁰⁰.

Kalijum-permanganat je jedan od hemijskih agenasa koji se primenjuje za oksidovanje boja u industrijskoj upotrebi, ali je veoma skup reagens¹⁰¹.

Biološke metode podrazumevaju primenu živih sistema u uklanjanju zaostalih organskih molekula⁶⁴. Postoji nekoliko različitih bioloških tretmana koji mogu biti primenjeni u aerobnim/anaerobnim uslovima: gajenje bakterijskih kultura, gljiva i algi sposobnih za delimično ili potpuno razlaganje boja u otpadnim vodama. Najnoviji trendovi uključuju primenu aerobnih mikroorganizama koji bi koristili molekulski kiseonik kao redukujući ekvivalent akceptora tokom procesa respiracije⁵⁷. Glavna prednost biološkog sistema je da preko 70% organske materije može biti prevedeno do biološki prihvatljivih molekula¹⁰². Iako je biološki tretman moguće primeniti u aerobnim i anaerobnim uslovima (ili kombinacijom oba) dobija se slab prinos biomase i potreban je dug aklimatizacioni period. Ovo direktno utiče na visoku cenu produkcije mikrobiološke kulture od interesa i predstavlja prvi ograničavajući faktor. Usled različitosti pH, saliniteta kao i toksičnosti obojenih otpadnih voda, degradacija boja je spora, a metabolička inhibicija mikroorganizama česta. Međutim, najveći problem predstavlja nemogućnost smanjenja toksičnosti otpadnih voda nakon tretmana biološkim metodama. U nekim slučajevima nakon anaerobne digestije, boje koje sadrže azot bivaju transformisane u aromatične amine koji pokazuju veću toksičnost i/ili mutagenost nego početni molekul boje¹⁰³. U drugom slučaju, usled nemogućnosti razgradnje rekalcitrantnih azo i nitro jedinjenja od strane mikroorganizama dolazi do njihove sedimentacije unutar bakterija, čime se povećava udeo kancerogenih amina u ekosistemu, samim tim i povećanja toksičnosti^{4,104}.

Međutim, biološki kao i hemijski tretmani (adsorpcija na aktivni ugalj, flokulacija) generišu veliku količinu zaostalog koncentrovanog mulja. Mulj se formira tokom prvog i drugog koraka tretiranja otpadne vode i podaci ukazuju na to da čak i nakon uobičajenih tretmana, 90% boja prolazi ovaj proces nepromenjeno⁶³. Pored slabe efikasnosti u prikupljanju boje iz efluenata (10-20%), kapaciteti adsorbenasa su veoma ograničeni.

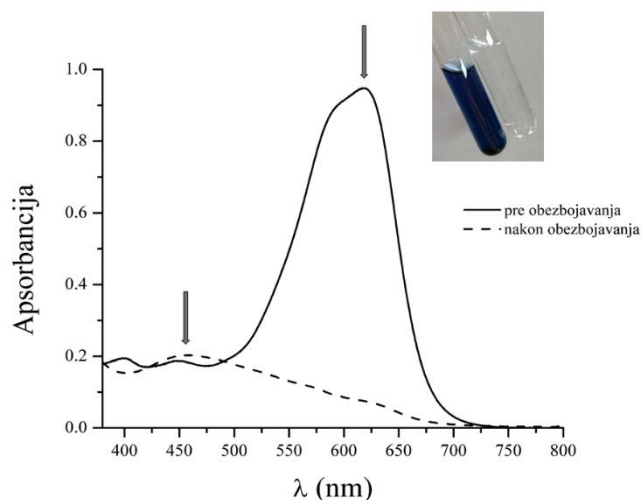
2.4.4.1 Enzimski tretman obojenih otpadnih voda

Enzimski sistemi spadaju u kategoriju između hemijskih i bioloških metoda. Ranija istraživanja usmerena na uklanjanje aromatičnih zagađivača u industrijskim vodama primenom oksidoreduktaza (mono- i di-oksigenaza, polifenol-oksidaza i peroksidaza) dovela su do upotrebe enzima u tretiranju obojenih otpadnih voda⁶. Neke od prednosti ovog enzimskog sistema su delovanje na kompleksne hemijske strukture pod blagim reaktivnim uslovima visokom efikasnošću u odnosu na konvencionalne, hemijske metode koje zahtevaju najčešće visoku temperaturu i ekstreman pH⁴.

Opisani su mnogi oksidativni enzimi u literaturi, sa potencijalnom primenom u uklanjanju ksenobiotika^{61,65,105}. Primena enzima odlikuje se malim energetskim zahtevima, lakom kontrolom, operativnom sposobnošću u širokom rasponu uslova i minimalnim uticajem na životnu sredinu¹⁹. Ukoliko bi enzimski tretman mogao da ponudi prevođenje obojenog ksenobiotika u manje toksičnu supstancu, u tom slučaju dalji tretman nije potreban, kao ni kompletna degradacija, odnosno mineralizacija¹⁰⁵.

2.4.5 Praćenje i analiza enzimskog obezbojavanja

U cilju praćenja i analize procesa obezbojavanja upotrebljavaju se razne analitičke tehnike. UV–Vis spektrometrija je prva metoda izbora kojom je moguće pratiti i kvantifikovati stepen obezbojavanja u reakcionoj smeši. Primer karakterističnih promena nastalih tokom reakcije obezbojavanja prikazan je na slici 28.



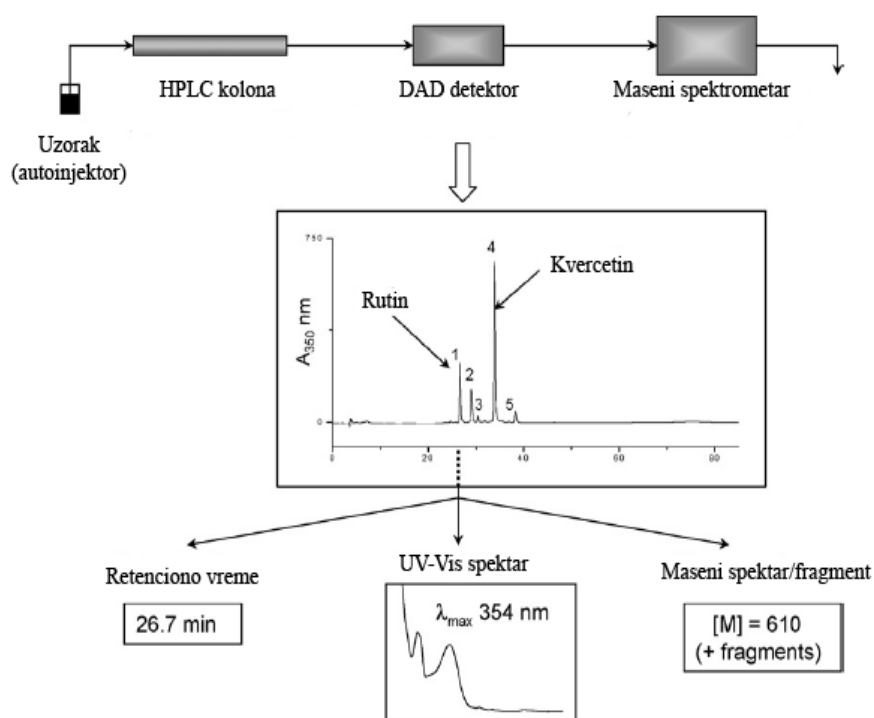
Slika 28. Izgled apsorpcionog spektra plave boje pre i nakon obezbojavanja.

Smanjenje intenziteta ili potpuni nestanak apsorpcionog maksimuma na određenoj talasnoj dužini u vidljivom delu spektra (λ_{\max}) ukazuje na obezbojavanje usled gubitka glavne hromofore (slika 28, strelica). Ukoliko je ova promena praćena stvaranjem novih ili porastom intenziteta postojećih apsorpcionih maksimuma u UV–Vis spektru, ona je uzrokovana stvaranjem novih intermedijera ili produkata obezbojavanja (slika 28, strelica).

Vrlo često, intermedijeri nastali tokom obezbojavanja ili proizvodi obezbojavanja nakon tretmana imaju iste ili slične UV–Vis apsorpcione spektre pa je nemoguće razlikovati ih klasičnom UV–Vis spektrometrijom. S obzirom na to da obezbojavanje ne mora nužno da znači i degradaciju boje, ova dva fenomena nemoguće je razlikovati isključivo na osnovu UV–Vis spektrometrije. Iz tih razloga potrebno je koristiti selektivniju analitičku metodu. Visokoeffikasna tečna hromatografija (HPLC, eng. „High Performance Liquid Chromatography“) osetljiva je analitička metoda koja omogućava razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenata u reakcionoj smeši. Kao takva, veoma je pogodna za razdvajanje i analizu većine boja organskog porekla koje su prisutne u otpadnim vodama. Moderni HPLC detektori sa nizom dioda (DAD, eng. „Diode Array Detector“) snimaju UV–Vis spektar svakog pika u hromatogramu, što omogućava praćenje i karakterizaciju molekula boje i proizvoda degradacije ne samo na osnovu njihovih retencionih vremena već i UV–Vis spektara.

U analizi tekstilnih boja sve više se koristi i masena spektrometrija (MS) u kombinaciji sa visokoefikasnom tečnom hromatografijom (LC—MS). Maseni spektri dobijeni ovom metodom omogućavaju dobijanje informacija o strukturi početnog molekula boje i njegovih fragmenata nastalih tokom ili nakon tretmana obezbojavanja što DAD detektorom nije moguće¹⁰⁶.

Shematski prikaz HPLC sistema za razdvajanje i karakterizaciju boja koji kombinuje oba tipa detekcije (DAD i MS) dat je na slici 29.



Slika 29. Analiza boje HPLC-DAD—MS tehnikom. Boja je okarakterisana na osnovu retencionog vremena, UV-Vis spektra i masenog spektra¹⁰⁷.

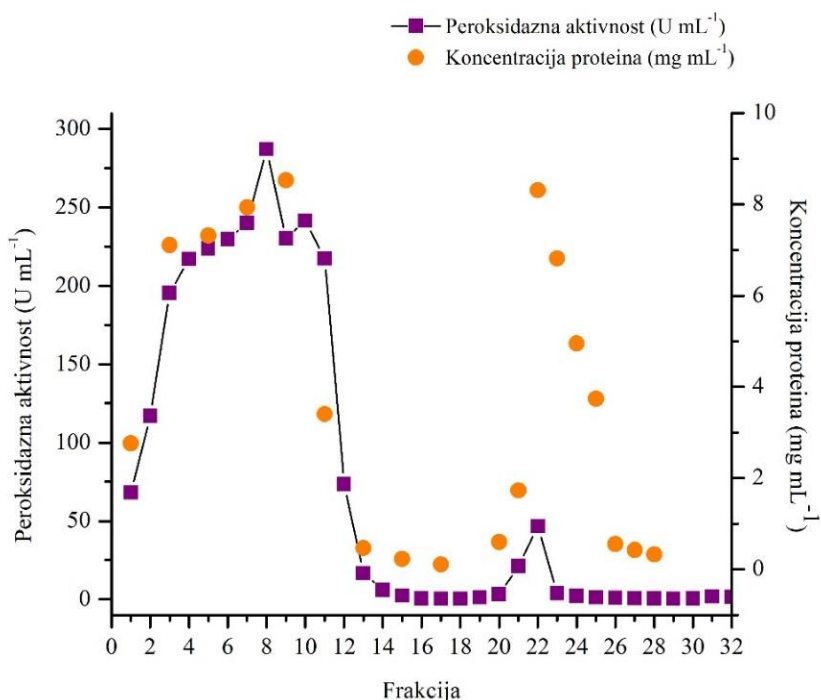
LC—MS metoda doživela je razvoj na polju istraživanja boja tek nakon razvoja elektrosprej jonizacije (ESI) koja je omogućila povezivanje masenog spektrometra za HPLC sistem¹⁰⁷ i na taj način identifikaciju jedinjenja direktno iz rastvora. ESI je meka tehnika jonizacije i veoma je pogodna kod analize jonskih i polarnih boja u pozitivnom i negativnom modu¹⁰⁸. U zavisnosti od masenog analizatora na koji je povezan ESI jonski izvor dobijaju se informacije o molekularnoj masi, formuli i/ili strukturi analiziranih supstanci.

3. Naši radovi

Ciljevi ovog rada bili su izolovanje i prečišćavanje kiselih i baznih izoformi HRP. Ispitana je zasebna efikasnost izolovanih izoformi u tretiranju 24 boje različitih karakteristika i struktura; dobijanje imobilizovanog biokatalizatora koji bi ispunjavao zahteve za prečišćavanje kompleksnih otpadnih voda, dobre stabilnosti i ekonomske isplativnosti; detaljno ispitivanje boja pre i proizvoda degradacije nakon primenjene metode u cilju procene ekogenotoksičnosti nastalih proizvoda; ispitivanje DNA interakcija boja i proizvoda obezbojavanja na bakterijskoj (plazmidnoj) i na sisarskoj DNA.

3.1 Hromatografsko odvajanje izoformi peroksidaze iz rena

Za izolovanje i prečišćavanje izoformi HRP korišćena su 2 kg svežeg korena rena. Nakon homogenizacije u sokovniku LaLane's sirovi ekstrakt (1 L) je ostavljen na hladno kako se odvojila skrobna frakcija. Centrifugiranjem je sirovi ekstrakt izbistren i taložen amonijum-sulfatom (AS) do 40% zasićenja. Ovaj korak imao je za cilj uklanjanje balastnih proteina iz sirovog ekstrakta. Nakon centrifugiranja dobijeni supernatant taložen je AS do 80% zasićenja. Pri ovom stepenu zasićenja dolazi do taloženja peroksidaze iz rena, koja nakon centrifugiranja pada u vidu muljavog taloga. Talog je potom resuspendovan u minimalnoj količini 5 mM Tris pufera, pH 7,3. U cilju pripremanja za jonoizmenjivačku hromatografiju, sirovi ekstrakt je intenzivno dijalizovan do postizanja jednake jonske sile i pH kao i startni pufer za hromatografiju. Kolona sa QAE Sephadex matriksom, kao i početni uzorak, ekvilibrisana je sa 5 mM Tris puferom pH 7,3. S obzirom na to da je zastupljenost kiselih izoformi očekivano niža u odnosu na ostale izoforme HRP-a, primenjena metoda (jakog anjonskog jonoizmenjivača) imala je za cilj da veže sve kisele izoforme HRP-a iz početne smeše za jonoizmenjivač i na taj način ih odvoji od baznih i neutralih izoformi. Fracionisanje izoformi postignuto je postepenim eluiranjem povećanjem jonske sile u startnom puferu. Dobijeni hromatogram prikazan je na slici 30.



Slika 30. Enzimaska aktivnost (-■-) i koncentracija proteina (●) prečišćenih frakcija HRP na koloni QAE Sephadex. Frakcije od 1 do 19 (HRP-B, HRP-C) – nevezane frakcije; frakcije od 20 do 23 (HRP-A) – vezane frakcije eluirane sa 0,150 M NaCl u startnom puferu.

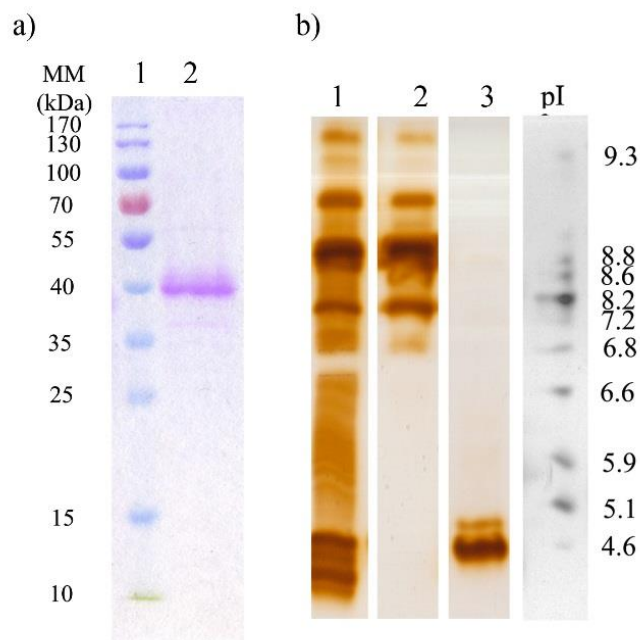
Frakcije označene od 1 do 19 nisu se vezale za QAE jonoizmenjivač, od kojih su prvih 12 frakcija pokazivale značajnu peroksidaznu aktivnost (neutralne i bazne izoforme HRP). Vezane frakcije eluirane su povećanjem jonske sile u startnom puferu (frakcije 20-32). Najaktivnije peroksidazne frakcije dobijene su eluiranjem sa 0,150 M NaCl (frakcije 21-23) i sadržavale su kisele izoforme (HRP-A). Frakcija 22 najaktivnija je kisela izoforma HRP čija peroksidazna aktivnost iznosi $46,58 \text{ U mL}^{-1}$ prema gvajakolu, dok je koncentracija proteina iznosila $1,31 \text{ mg mL}^{-1}$. Najaktivnija bazna izoforma HRP (frakcija 9) pokazala je aktivnost od $287,05 \text{ U mL}^{-1}$ prema gvajakolu, dok je koncentracija proteina iznosila $8,23 \text{ mg mL}^{-1}$. Rezultati prečišćavanja izoformi HRP-a prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Prečišćavanje izoformi peroksidaze iz rena.

	Zapremina (mL)	Aktivnost (U/mL)	Ukupna aktivnost (U)	Prinos (%)
Sirovi ekstrakt	1000	21,3	21300	100
Supernatant nakon 40% taloženja AS	550	20,8	11440	54
Resuspendovani talog nakon 80% zasićenja	30	211,2	6336	30
Uzorak nanošen na IEX	225	30,1	6772.5	32
Frakcija 9	20	287,05	5741	27
Frakcija 22	20	46,58	931.6	4

Prinos prečišćavanja HRP izoformi iznosio je 27% za bazne i neutralne, dok je za kisele izoforme HRP izoforme on iznosio 4%. Na ovaj način, uspešno su razdvojene i izolovane izoforme od interesa.

U cilju potvrde razdvojenosti kiselih od drugih HRP izoformi, i potvrde homogenosti dobijenog preparata, dobijene frakcije sa najvećom aktivnošću su analizirane izoelektričnim fokusiranjem (IEF) i SDS-PAG elektroforezom (slika 31).



Slika 31. a) SDS-PAG elektroforeza traka, 1- molekulski markeri (MM, kDa), 2-kisela HRP; b) Zimogramska detekcija peroksidazne aktivnosti u gelu. Traka 1- početni ekstrakt, traka 2 –HRP-B frakcija 9, traka 3- HRP-A frakcija 22, traka pI- markeri pI.

Molekulska masa dobijenog preparata HRP je procenjena na 40 kDa na osnovu molekulskih markera (Slika 31a). Evidentno prisustvo jedne trake na SDS-PAGE gelu u prisustvu 2- β -merkaptoetanolu potvrđuje da je izolovani HRP monomer. Takođe, ovo je još jedan od pokazatelja da je dobijeni preparat HRP prečišćen. Zimogramska detekcija peroksidazne aktivnosti u gelu nakon IEF-a (gvajakolom) ukazuje na to da se dobijena kisela, HRP-A, frakcija sastoji iz 3 vrlo bliske izoforme (Slika 31b). HRP-A izoforme locirane su u vrlo kiselom regionu gela sa jednom dominantnom izoformom (pI 4,7). Bazne i neutralne izoforme, HRP-B, sastoje se iz nekoliko bliskih izoformi. Uočavaju se 3 dominantne izoforme sa pI vrednostima 7,7, 8,3 i 9,1.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da su upotrebom jakog anjonskog jonoizmenjivača (QAE Sephadex-a) pri datim reakcionim uslovima uspešno razdvojene kisele izoforme HRP od baznih i neutralnih izoformi.

Određen je doprinos pojedinačnih izolovanih izoformi totalnoj peroksidaznoj aktivnosti (tabela 7).

Tabela 7. Zastupljenost izoformi HRP i njihov doprinos totalnoj peroksidaznoj aktivnosti

Izoenzimska grupa	Izoforma HRP	% totalne HRP aktivnosti *	Komentar
Neutralna	B	96,12	Nevezane frakcije sa QAE
Neutralna	C		
Bazna	D		
Bazna	E		
Kisela	A1	2,92	Eluirano sa QAE
Kisela	A2		
Kisela	A3		

*Zbirna aktivnost HRP = 100%

Na osnovu zastupljenosti izoformi u odnosu na ukupnu aktivnost dobijenih frakcija može se zaključiti da najveći doprinos pripada neutralnim i baznim izoformama, dok je zastupljenost kiselih izoformi oko 3%. Iako zastupljenost izoformi HRP u korenu rena zavisi kako od biotičkih, tako i abiotičkih faktora, ovo je u saglasnosti sa ranije opisanim rezultatima¹¹.

Izolovane dominantne izoforme HRP podelili smo na osnovu hromatografskih, elektroforetskih i spektrometrijskih parametara u dve kategorije:

- 1) anjonske, kisele (HRP-A),
- 2) katjonske, bazne i neutralne izoforme (HRP-B).

Pripajanje neutralnih i baznih frakcija HRP urađeno je iz dva razloga: (1) detaljno proučavanje ovih izoformi u literaturi ukazalo je na odsustvo značajnih promena u osobinama i hemijskoj kompoziciji, osim u pI vrednosti; (2) kako je zastupljenost ekstremno baznih peroksidaza, sa pI vrednostima oko 12, izuzetno mala (ispod 0,1%) njihov doprinos totalnoj peroksidaznoj aktivnosti je zanemarljiv u odnosu na „neutralne“ izoforme^{11,14}.

Stoga su u daljem radu u cilju upoređivanja efikasnosti različitih HRP izoformi u uklanjanju obojenih ksenobiotika korišćene kisele i bazne izoforme svedene na jednak broj enzimskih jedinica (7 U mL⁻¹).

3.2 Poređenje efikasnosti kiselih i baznih izoformi peroksidaze iz rena u uklanjanju obojenih ksenobiotika

S obzirom na to da su jasno dokumentovane razlike u aktivnosti, kao i osetljivosti kiselih i baznih HRP izoformi, vrlo je bitno da se prilikom odabira enzima uzmu u obzir svi faktori koji mogu uticati na postizanje željenih rezultata. U želji da proverimo efikasnost dva tipa izoformi HRP odabrali smo jednu boju koje je veoma čest model sistem (amido crno 10b). Naša istraživanja započeta su praćenjem obezbojavanja promenom apsorbancije na karakterističnom apsorpcionom maksimumu (A_{max}) boje, koji za našu model boju iznosi 620 nm. Mi smo na taj način ispitali optimalnu količinu enzima pri fiksnim reakcionim uslovima boje, pH i vodonik peroksida (30 mg L⁻¹ model boje AB, pH 5 i 0,44 mM H₂O₂) a pri različitim količinama HRP (0,028 do 0,54 U mL⁻¹). Optimalni uslovi obezbojavanja postignuti su pri 0,14 U mL⁻¹ HRP. S obzirom na to da je reakcija katalizovana HRP-om reakcija po bisupstratnom mehanizmu, odnosno da stepen obezbojavanja zavisi i od koncentracije kosupstrata, mi smo pri fiksnim jedinicama HRP (0,14 U mL⁻¹) i boje (30 mg L⁻¹) varirali količinu H₂O₂ (od 0,00044 mM

do 4,44 mM). Na osnovu dobijenih rezultata određen je koncentracioni optimum H_2O_2 za reakciju obezbojavanja, pri datim, specifičnim reakcionim uslovima, koji iznosi 0,44 mM.

Na osnovu ovih eksperimentalnih uslova (količine enzima i vodonik peroksida) želeli smo da dalje ispitamo razlike u supstratnoj specifičnosti kiselih i baznih izoformi HRP. Zbog različitog stepena aktivnosti ovih izoformi pri nižim, odnosno višim pH vrednostima, obezbojavanje smo ispitali pri širem opsegu pH vrednosti u cilju pronalaženja optimalnih uslova za obezbojavanje. Stoga je reakcija obezbojavanja ispitana na pH vrednostima 3, 5, 7 i 9. Takođe smo ispitali obezbojavanje 24 strukturno različite boje koje imaju primenu kako u tekstilnoj tako i drugim industrijama. Reakcione smeše pripremane su prema protokolu opisanom u poglavlju 4.7, rezultati su sumarizovani u tabeli 8 a strukture boja prikazane su u prilogu 2.

Tabela 8. Uticaj pH na obezbojavanje boja primenom kiselih i baznih izoformi peroksidaze iz rena.

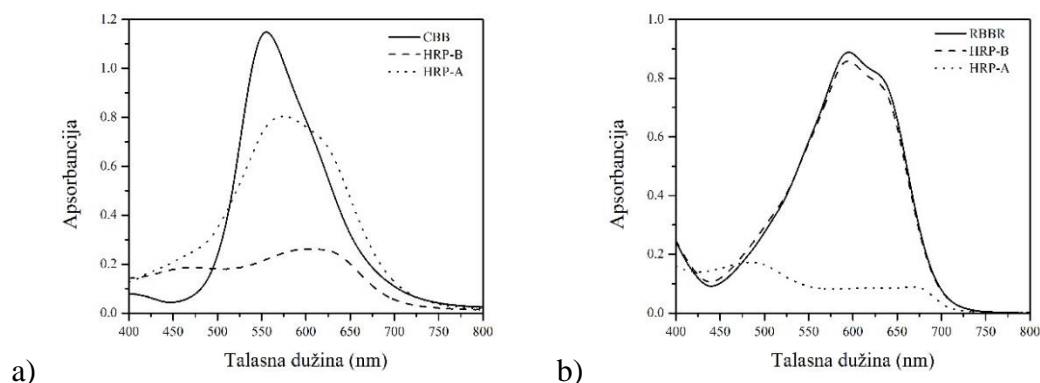
Boja	HRP izoforma	% obezbojavanja				A_{max}
		pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	
Akridin oranž (AO)	kisela	34	21	8	16	491
	bazna	15	34	13	38	
Amido crna 10b (AB)	kisela	19	92	91	88	620
	bazna	12	92	93	93.5	
Bizmark braon (BB)	kisela	43	53	51	52	460
	bazna	59	42	44	52	
Brom fenol plava (BPB)	kisela	3.6	99.5	94	39	591
	bazna	3.4	99	72.5	37.5	
Komasi brilijant plava R250 (CBB)	kisela	25	58	8	48	550
	bazna	27	85	51	46	
Kongo crvena (CR)	kisela	17	74	54	42	515/486
	bazna	11	63	35	24	
Metil oranž (MO)	kisela	21	86	86	17	460
	bazna	11	85	80	65	
Oranž 2 (OR2)	kisela	9	15	89	98	490
	bazna	5	11	18	91	
Ponso S (PS)	kisela	6	3	2	76	515
	bazna	4	2	2	52	
Procion® tamno plava (PDB)	kisela	47	98	85	14.5	603
	bazna	47	95	11	9	
Reaktivno plava 52 (RB)	kisela	65	99.8	99.6	63	615
	bazna	73	99.8	99.6	86	
Reaktivno zelena 15 (RG)	kisela	26	98	39	15	625
	bazna	26	78	48	20	
Reaktivno crna 5 (RB5)	kisela	8	6	4	74	600
	bazna	5	7	4.5	38	
Realan plava (RLB)	kisela	35	92	85	18	600
	bazna	35	82	43	12	
Realan žuta (RLY)	kisela	4	1	3	14	400
	bazna	3	2	4	12	
Remazol brilijant plava (RBBR)	kisela	3.3	91	91	13	595
	bazna	10	3	9	9	
Brilijant zelena (BG)	kisela	14	8	/	/	428/625
	bazna	13	13	/	/	
Drimaren zlatno žuta (DGY)	kisela	13	12	27	14	390
	bazna	26	29	17	47	
Metilen plava (MB)	kisela	18	20	23	40	590
	bazna	15	21	22	28	
Realan crvena (RR)	kisela	22	49	10	9	515
	bazna	17	22	6	7	
Fast zelena (FG)	kisela	12	37	12	19	427/621
	bazna	5	9	3	4	
Procion® ćilibarna (PRA)	kisela	6.5	6	16	31	416
	bazna	6	5	17	26	
Procion® crveno braon (PRB)	kisela	14	11	9	18	460
	bazna	7	10	6	11	
Procion® žuta (PRY)	kisela	6	8.5	8	8	410
	bazna	3	4	4	4	

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 8 možemo zaključiti da od 24 testirane boje HRP-B postigla je najbolje obezbojavanje u slučaju pet boja (AO, AB, BB, CBB, DGY) dok je HRP-A bila efikasnija u obezbojavanju 17 boja: šest pripada klasi azo, tri boje triarilmetanskoj i jedna boja triazinskoj klasi boja dok su preostalih 7 zaštićenih struktura nedostupnih za javnost. U slučaju dve boje obe izoforme pokazale su podjednaku efikasnost (BPB, RB). Većina boja je uspešno obezbojena na pH 5 (12 od 24 testiranih boje) dok je na pH 9 najveće obezbojavanje postignuto u slučaju 10 od 24 boje. Kada se reakcija obezbojavanja odvijala na pH 3 samo u slučaju dve boje postignuto je maksimalno obezbojavanje. Takođe, treba imati u vidu da prisustvo mnogih jonizujućih i drugih grupa u molekulu boje diktiraju optimalno pH za njeno uklanjanje. Ovi rezultati svakako bacaju novu svetlost na dosadašnje razloge zanemarivanja ostalih HRP izoformi, kada je obezbojavanje u pitanju.

Boje u današnjoj upotrebi odlikuju se prisustvom velikog broja funkcionalnih grupa i kompleksne su strukture. Stoga su mogući brojni načini njihove razgradnje tokom obezbojavanja koji mogu da dovedu do stvaranja različitih intermedijera. Spektar nastalog intermedijera može iskazivati potpuno ili delimično preklapanje sa apsorpcionim maksimumom početnog molekula boje, a da pri tom izgled apsorpcionog spektra bude potpuno drugačijeg profila. Takođe, moguće je i pomeranje apsorpcionog maksimuma intermedijera boje nastalog tokom obezbojavanja, što bi moglo da ukaže na „lažno“ veći stepen obezbojavanja nego što je to zaista slučaj. Poređenje dva biokatalizatora u obezbojavanju praćenjem stepena obezbojavanja isključivo na osnovu smanjenja intenziteta karakterističnog apsorpcionog maksimuma boje može dovesti do pogrešnog zaključivanja.

Iz navedenih razloga detaljnije smo se osvrnuli na slučajeve obezbojavanja gde je jedna izoforma pokazala drastično bolje obezbojavanje u odnosu na drugu izoformu pri istom pH.

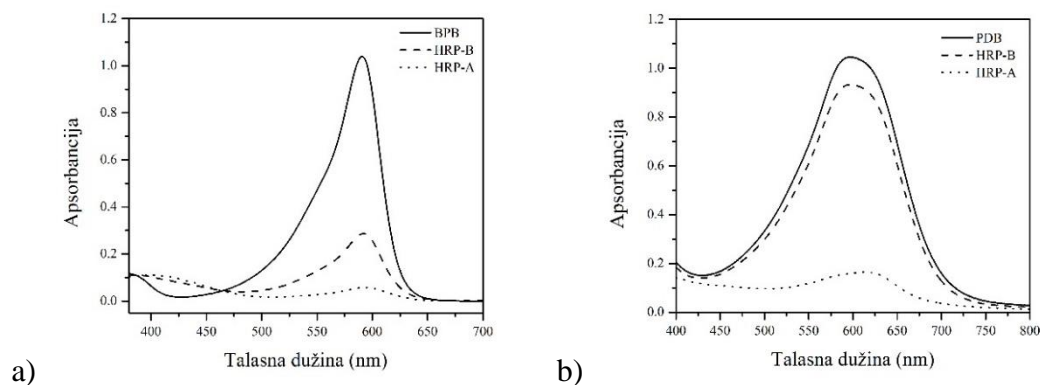
Na pH 5 uočena je razlika u obezbojavanju HRP-B i HRP-A u slučaju dve boje: CBB i RBBR (slika 32).



Slika 32. Vidljivi spektar CBB (a) i RBBR (b) na pH 5 pre (—) i nakon tretmana sa HRP-B (---) i HRP-A (···).

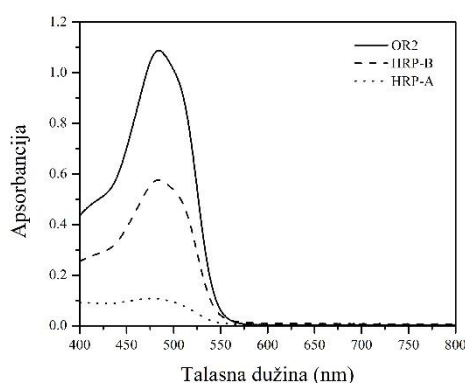
Bolje obezbojavanje CBB-a odvijalo se na pH 5 posredstvom HRP-B izoforme, dok je HRP-A izoforma uklonila 46% manje boje. Takođe, uočava se i promena u profilu dobijenih apsorpcionih spektara (slika 32a). U slučaju RBBR, antrahinonske boje, pri istom pH, HRP-A izoforma pokazala se daleko bolja nego HRP-B, obezbojavajući čak 82% više boje (slika 32b). Ove promene praćene su i promenom u profilu apsorbcije boje nakon obezbojavanja sa HRP-A, dok se apsorpcioni spektar boje nakon tretmana sa HRP-B poklapa sa spektrom početne boje, ali je manjeg intenziteta.

Različiti stepen obezbojavanja ispitivanih izoformi uočen je na pH 7 u slučaju tri boje: BPB, PDB i OR2 (slika 33 i slika 34).



Slika 33. Vidljivi spektar BPB (a) i PDB (b) na pH 7 pre (—) i nakon tretmana sa HRP-B (---) i HRP-A (···).

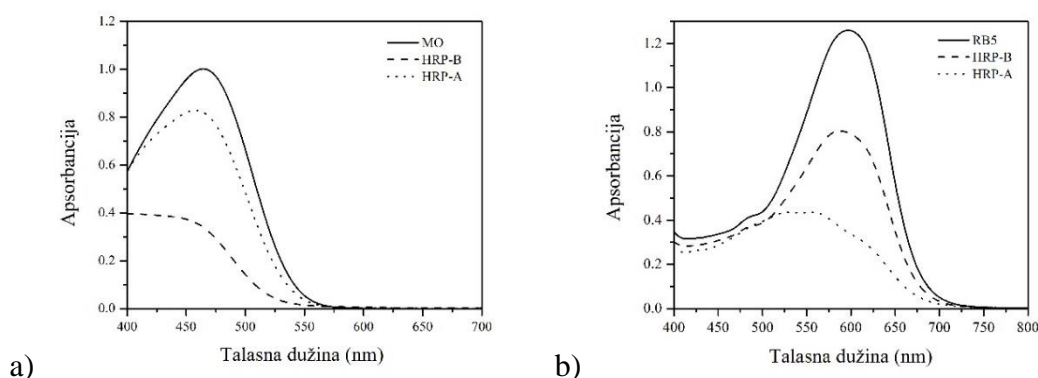
Boja BPB najviše je obezbojena primenom HRP-A izoforme, sa potpunim odsustvom glavnog apsorpcionog pika koji potiče od hromofore boje. HRP-B izoforma obezbojila je 22% manje BPB u odnosu na HRP-A izoformu (slika 33a). Dobijeni rezultati nisu u saglasnosti sa do sada publikovanim rezultatima, jer je u literaturi opisano inhibiranje HRP-a bojom na pH vrednostima višim od 5¹⁰⁹. Drastično bolje obezbojavanje HRP-A izoforme pokazano je i pri obezbojavanju PDB boje na pH 7. Ova izoforma obezbojila je 74% više boje od HRP-B, međutim nije uočena razlika u apsorpcionom profilu dobijenih spektara (slika 33b). Slični rezultati dobijeni su i za boju OR2 (slika 34)



Slika 34. Vidljivi spektar OR2 na pH 7 pre (—) i nakon tretmana sa HRP-B (---) i HRP-A (···).

Prilikom odvijanja reakcije obezbojavanja na pH 9 postignut je sličan stepen obezbojavanja sa obe izoforme (tabela 8). Međutim, to nije slučaj i prilikom odigravanja reakcije obezbojavanja na pH 7. Na osnovu apsorpcionih spektara prikazanih na slici 34 uočava se veći procenat obezbojavanja postignut primenom HRP-A izoforme u odnosu na HRP-B. Ova izoforma obezbojila je 70% više boje nego HRP-B.

Različita efikasnost izoformi HRP uočena je i na najvišoj testiranoj pH vrednosti, pH 9. Pri ovim reakcionim uslovima uočeno je različito obezbojavanje u slučaju dve boje: MO i RB5 (slika 35).



Slika 35. Vidljivi spektar MO (a) i RB5 (b) na pH 9 pre (—) i nakon tretmana sa HRP-B (---) i HRP-A (···).

U slučaju obezbojavanja MO na pH 9 HRP-B obezbojio je 48% više boje nego HRP-A (slika 35a). Ovo je ujedno i prvi primer boljeg obezbojavanja baznih izoformi HRP u odnosu na kisele. Obezbojavanje na ovako visokim pH vrednostima nije u saglasnosti sa dosada objavljenim rezultatima koji prikazuju smanjenje procenta obezbojavanja sa porastom pH¹⁰⁹. Najbolje obezbojavanje RB5 postignuto je na pH 9 (tabela 8). Međutim, kako je na ovom pH uočena i najveća razlika u obezbojavanju ispitivanih izoformi, snimili smo apsorpcioni spektar u vidljivom regionu u cilju detaljnije analize reakcionih smeša. Na apsorpcionom spektru prikazanom na slici 35b uočava se smanjenje intenziteta apsorpcione trake na 600 nm usled dejstva enzima. Izoforma HRP-A uspeła je da obezboji 74% boje, dok je HRP-B obezbojila 38%. Međutim, apsorpcioni spektar reakcione smeše nakon obezbojavanja sa HRP-A pokazuje i pomeranje A_{max} ka nižim talasnim dužinama (hipsokromni efekat). Ovo ukazuje na stvaranje novih degradacionih proizvoda drugačijih od početnog molekula boje. U literaturi su dostupni podaci o obezbojavanju AB boje sa HRP na pH 5, gde je postignuto obezbojavanje veće od 80% ali uz termostatiranje na 50 °C¹¹⁰.

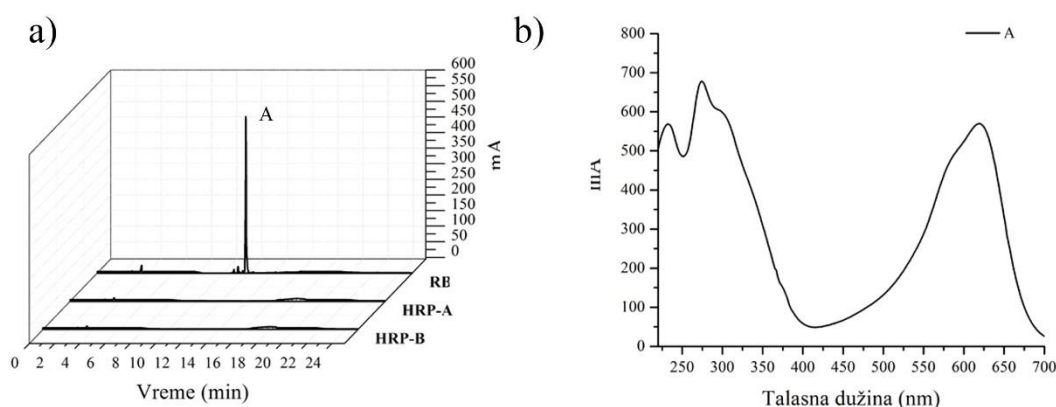
Na osnovu dobijenih podataka može se zaključiti da je afinitet ispitivanih izoformi HRP ka obezbojavanju različit i da ujedno zavisi od pH. Opisane razlike u obezbojavanju primenom ovih izoformi teško je porediti sa literaturnim podacima, s obzirom na to da nisu nađeni literaturni podaci o primeni kiselih izoformi HRP u obezbojavanju.

3.3 Analiza obezbojavanja HPLC-om

Na osnovu prethodnih rezultata uočeno je da kod određenih boja stepen obezbojavanja biva različit u zavisnosti od primenjene izoforme HRP. Analiza apsorpcionih spektara ukazala je na moguće prisustvo različitih proizvoda degradacije koje nije moguće razlikovati na osnovu UV–Vis apsorpcione spektrometrije. U cilju potvrde degradacije i identifikacije eventualnih proizvoda degradacije detaljnije smo analizirali četiri model-boje. Odabrane model-boje (RB, RB5, AB i OR2) tretirane su jednakim količinama HRP-A i HRP-B pri prethodno određenim reakcionim uslovima. Nakon postizanja maksimalnog stepena obezbojavanja, reakcione smeše su razblažene acetonitrilom u odnosu 1:5, centrifugirane i potom filtrovane kroz 0,22 μm filter u cilju uklanjanja proteina i eventualnih precipitata. Za HPLC-DAD analizu korišćena je *Hypersil Gold C8* kolona. Uzorci su eluirani smešom 100 mM acetatnog pufera pH 5,5 i acetonitrila (AN). Gradijent eluiranja bio je sledeći: 5–50% AN u 9 min, 50–95% AN u 2 min i 95–5% AN u 0,2 min. Vreme eluiranja bilo je 25 min, pri termostatiranju kolone na 25 °C. Detektor je podešen za brzu detekciju na karakterističnim A_{max} boja: 620 (AB), 615 (RB), 600 (RB5), 490 (OR2) i 280 nm (za praćenje aromatičnih proizvoda obezbojavanja). Glavni hromatografski pikovi detaljnije su analizirani pomoću opcije “3D field“ sa kojom je moguć uvid u celokupni UV–Vis spektar svakog pojedinačnog pika detektovanog na hromatogramu.

3.3.1 Analiza obezbojavanja RB sa HRP HPLC-om

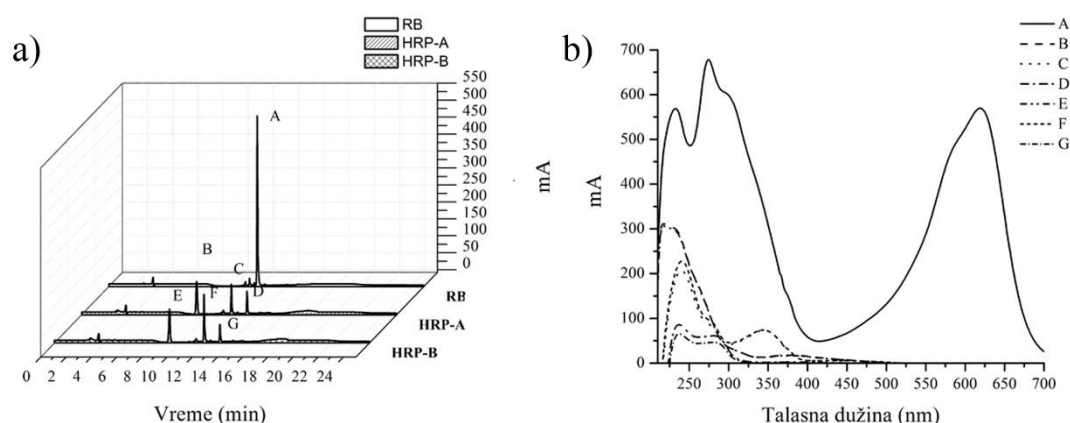
Ispitivanje smo započeli analizom reaktivno plave boje (RB) HPLC-om. Na osnovu prethodnih eksperimenata utvrđeno je da ova boja biva obezbojena podjednako i u visokom procentu sa obe HRP izoforme. Ovo nas je privuklo da detaljnije analiziramo reakcionu smešu nakon enzimskog tretmana u cilju identifikacije eventualno različitih proizvoda degradacije. Hromatogram boje RB pre i nakon obezbojavanja prikazan je na slici 36.



Slika 36. a) HPLC hromatogram RB pre i nakon tretmana sa HRP-A i HRP-B. Detektor je podešen na 615 nm; b) UV-vidljivi spektar pika A.

Boja RB pokazuje jedan hromatografski pik detektovan pri retencionom vremenu 11,7 min pri A_{\max} 615 nm (slika 36a). Analiziranjem UV-vidljivog dela spektra ovog pika uočavaju se tri apsorpciona maksimuma koji potiču od molekula boje (slika 36b). Dva apsorpciona maksimuma locirana su u UV regionu na 233 nm i 275 nm. Treći apsorpcioni maksimum lociran je na 615 nm i potiče od glavne hromofore molekula RB. Izoforme HRP-A i HRP-B, pokazale su visoku efikasnost u degradaciji RB, što je potvrđeno odustvom glavnog hromatografskog pika na hromatogramu pri λ_{\max} 615 nm nakon tretmana enzimom (slika 36a, HRP-A, HRP-B). Ovo ukazuje da HRP nije odgovoran samo za obezbojavanje (smanjenje karakterističnog A_{\max} pri specifičnoj λ_{\max}) nego i za degradaciju boje, što je u saglasnosti sa dosada objavljenim rezultatima razgradnje RB boje metodom elektrohemijske oksidacije¹¹¹.

HPLC hromatogram RB boje pri λ_{\max} 280 nm pruža jasan uvid u promene nastale usled delovanja HRP (slika 37a).

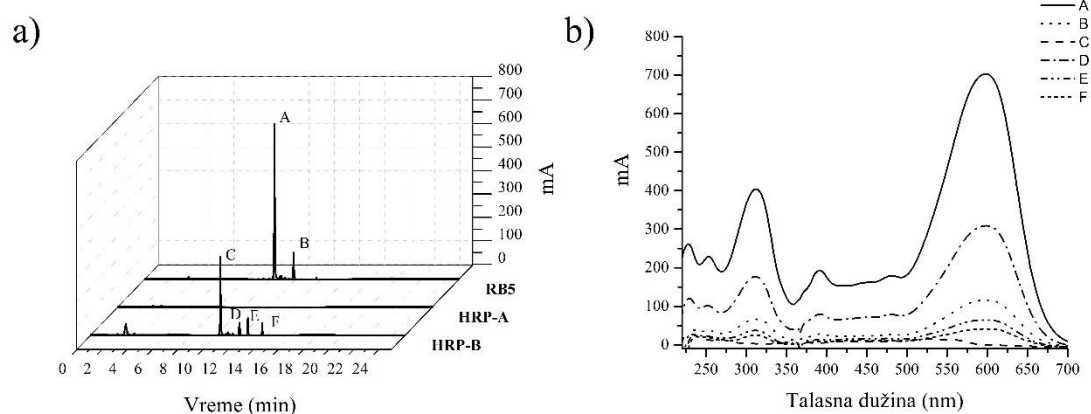


Slika 37. a) HPLC hromatogram RB pre i nakon tretmana sa HRP-A i HRP-B. Detektor je podešen na 280 nm; b) UV-vidljivi spektri hromatografskih pikova A-G.

Pik najjačeg intenziteta detektovan je pri retencionom vremenu od 11,7 min u slučaju boje RB. Nakon tretmana sa HRP-A detektovana su tri nova pika pri retencionim vremenima od 9,16, 11,89, i 13,10 min (slika 37a, HRP-A, pik B, C i D). Tretman RB sa HRP-B takođe je rezultovao razgradnjom glave hromofore boje, i pojavom tri pika pri retencionim vremenima od 9,16, 11,89, i 13,10 min (slika 37, HRP-B, pik E, F i G). Kompletni UV-vidljivi spektri detektovanih pikova prikazani su na slici 37b. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se vrlo sličan način razgradnje RB boje sa obe izoforme HRP-a, s obzirom na to da su detektovani pikovi istih retencionih vremena, kao i UV-Vis apsorpcionih profila.

3.3.2 Analiza obezbojavanja RB5 sa HRP HPLC-om

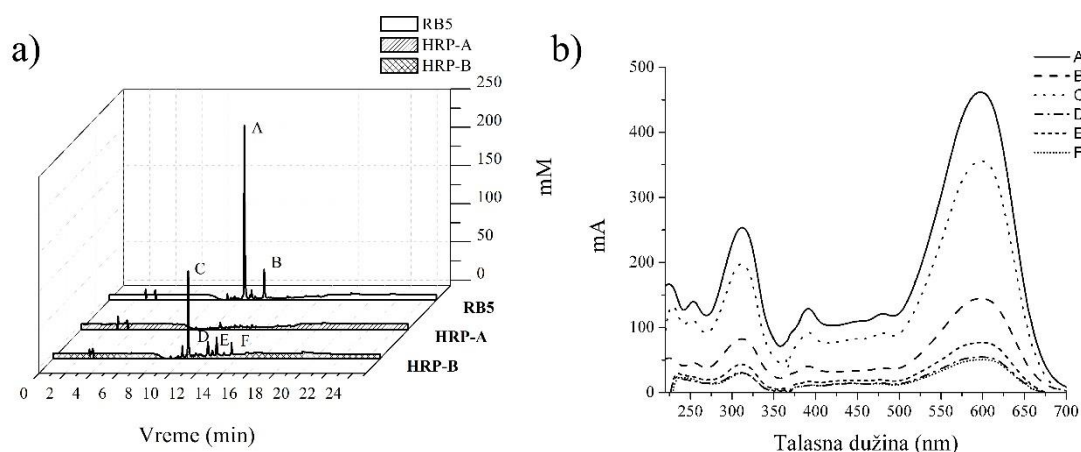
Prilikom odigravanja reakcije obezbojavanja boje RB5 na pH 9, pored razlike u stepenu obezbojavanja, uočena je razlika u profilu UV-Vis apsorpcionog spektra dobijenog nakon tretmana boje sa HRP-A u odnosu na HRP-B. Kako bismo utvrdili da je ova razlika posledica nastanka različitih proizvoda degradacije detaljnije smo analizirali reakcione smeše pre i nakon obezbojavanja. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 38.



Slika 38. a) HPLC hromatogram RB5 pre i nakon tretmana sa HRP-A i HRP-B. Detektor je podešen na 600 nm; b) UV-vidljivi spektri hromatografskih pikova A-F.

Hromatogram početnog rastvor boje RB5 pri λ_{\max} 600 nm prikazan je slici 38a i pokazuje dva pika pri retencionom vremenu od 10,3 i 11,87 min. Nakon tretmana RB5 boje sa HRP-A ne uočava se prisustvo novih pikova, a takođe i odsustvo pika A, usled razgradnje glavne hromofore boje pri λ_{\max} 600 nm. Tretman RB5 sa HRP-B, pri istim reakcionim uslovima, dovodi do nepotpunog obezbojavanja RB5 sa detekcijom novih proizvoda degradacije. Pri retencionim vremenima od 10,32, 12,51 i 13 min na hromatogramu uočavaju se novi pikovi (slika 38a, pik D, E i F). Na osnovu UV-Vis spektara dobijenih pikova gde se ne uočava značajnija promena u apsorpcionim profilima u odnosu na spektar početne boje može se zaključiti da nije došlo do potpune razgradnje glavne hromofore boje odnosno da postoji prisustvo nerazgrađenih molekula boje (slika 38b, pik C-F). Međutim, smanjenje intenziteta apsorpcije datih pikova svakako ukazuje na značajno obezbojavanje RB5 sa HRP-B (slika 38b).

U cilju bolje analize obezbojavanja RB5 boje sa HRP hromatografski pikovi analizirani su i pri λ_{\max} 280 nm (slika 39).



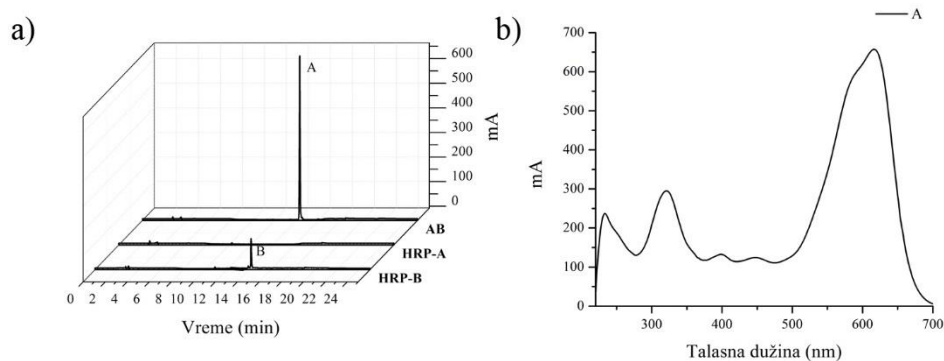
Slika 39. a) HPLC hromatogram RB5 pre i nakon tretmana sa HRP-A i HRP-B. Detektor je podešen na 280 nm; b) UV-vidljivi spektri hromatografskih pikova A-F.

Kompletno odsustvo glavnog hromatografskog pika boje potvrđuje degradaciju molekula boje RB5 usled dejstva HRP-A izoforme enzima, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima tretiranja RB5 boje sa enzimima iz drugih izvora, kao i metodom ultrazvuka (slika 39a)^{112,113}. Delimično obezbojavanje sa odsustvom formiranja drugačijih proizvoda degradacije nakon tretmana sa HRP-B potvrđena je analiziranjem UV-Vis apsorpcionih spektara pikova D-F (slika 30b).

Dobijene rezultate nije moguće porediti sa literaturnim podacima usled nedostatka podataka o primeni različitih izoformi peroksidaze iz rena u obezbojavanju boje RB5.

3.3.3 Analiza obezbojavanja AB sa HRP HPLC-om

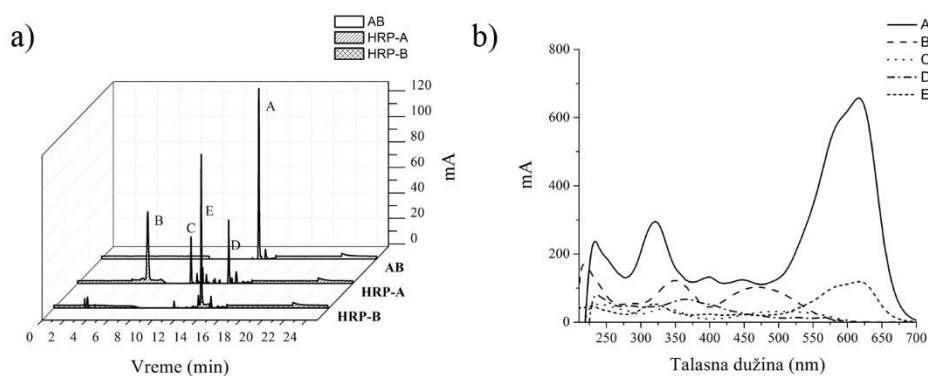
Obezbojavanje AB boje u zavisnosti od pH i izoforme HRP-a ukazalo je na to da ne samo pH boje nego i izoforme snažno utiču na stepen njenog uklanjanja (tabela 8). S obzirom na to da se ova boja odlikuje prisustvom različitih funkcionalnih grupa (sulfonatnih, nitro, aril, amin, hidroksil i azo) te su mogući brojni načini njene razgradnje, ovo nas je navelo da ispitamo postoji li razlika u nastalim proizvodima degradacije nakon primene izoformi HRP-a. Rastvor boje pre i posle obezbojavanja sa HRP analizirani su HPLC-om a dobijeni hromatogrami prikazani su na slikama 40 i 41.



Slika 40. a) HPLC hromatogram AB pre i nakon tretmana sa HRP-A i HRP-B. Detektor je podešen na 620 nm. UV-vidljivi spektar hromatografskog pika A.

Početni rastvor boje odlikuje se prisustvom jednog hromatografskog pika detekovanog pri retencionom vremenu od 13,40 min pri λ_{\max} 620 nm (slika 40a, pik A). Reakciona smeša AB nakon obezbojavanja sa HRP-A odlikuje se odsustvom hromatografskih pikova pri istom λ_{\max} (slika 40a, HRP-A). Smanjenje intenziteta pika lociranog pri istom retencionom vremenu kao i početni rastvor boje uočava se nakon tretmana boje sa HRP-B (slika 40a, pik B).

Usled nemogućnosti detektovanja hromatografskih pikova pri λ_{\max} 620 nm nakon obezbojavanja, hromatografski profili su analizirani podešavanjem detektora pri λ_{\max} 280 nm. Dobijeni hromatogram i apsorpcioni spektri prikazani su na slici 41.



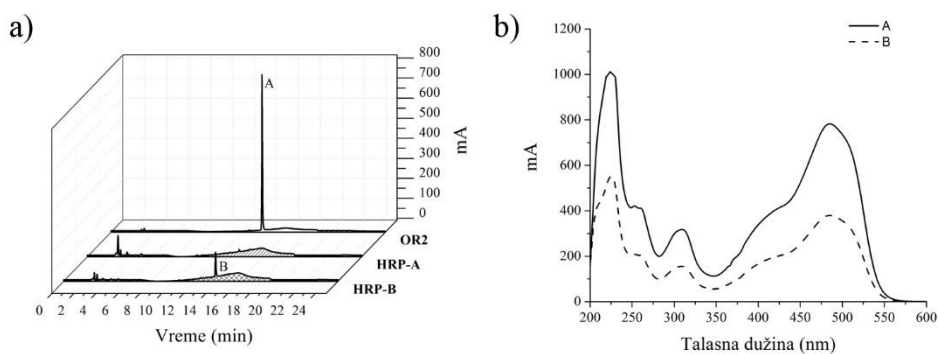
Slika 41. a) HPLC hromatogram AB pre i nakon tretmana sa HRP-A i HRP-B. Detektor je podešen na 280 nm. UV-vidljivi spektari hromatografskih pikova A-E.

Hromatogram reakcione smeše AB nakon obezbojavanja sa HRP-A pokazuje pikove pri retencionim vremenima od 6,12, 10,27 i 13,40 min (slika 41a, pik B, C i D). Nakon obezbojavanja sa HRP-B uočava se prisustvo jednog hromatografskog pika pri

istom retencionom vremenu kao pik početne boje, ali manjeg intenziteta (slika 41a, pik E). Daljim analiziranjem apsorpcionih spektara detektovanih pikova uočava se da pikovi D i E potiču od molekula boje dok pikovi B i C potiču od proizvoda degradacije (slika 41b). Dobijeni rezultati potvrđuju razliku u načinu obezbojavanja kisele i bazne izoforme HRP. Međutim, njihovo poređenje sa do sada publikovanim rezultatima za AB boju nije moguće, jer su u literaturi korišćeni drugi načini razgradnje boje. Moguća je samo potvrda kompletne mineralizacije boje odsustvom hromatografskog pika pri karakterističnom λ_{\max}^{114} .

3.3.4 Analiza obezbojavanja OR2 sa HRP HPLC-om

Kako je u prethodnim eksperimentima pokazano da postoji razlika u stepenu obezbojavanja OR2 na pH 7 koja se manifestuje različitim smanjenjem intenziteta A_{\max} ali ne i promenom profila apsorpcionog spektra, želeli smo da proverimo da li proizvodi degradacije pokazuju različite hromatografske profile. Dobijeni rezultati prikazani su na slikama 42 i 43.

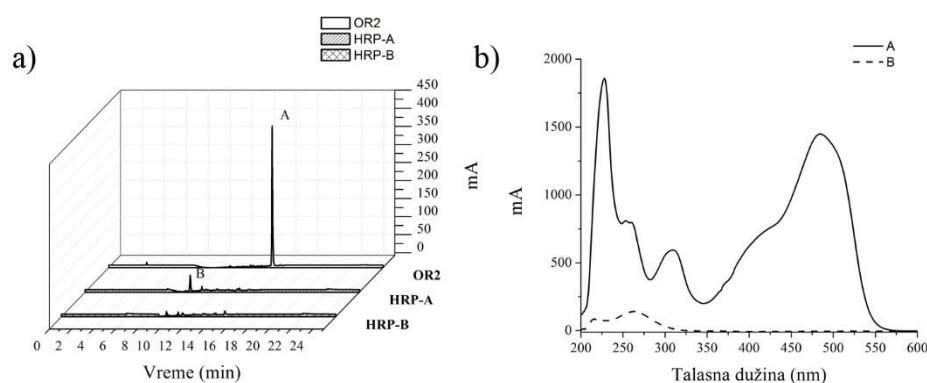


Slika 42. a) HPLC hromatogram OR2 pre i nakon tretmana sa HRP-A i HRP-B. Detektor je podešen na 490 nm; b) UV-vidljivi spektri hromatografskih pikova A i B.

Hromatogram boje OR2 pokazuje pik lociran pri retencionom vremenu od 13,78 min pri λ_{\max} 490 nm (slika 42a, OR2). Potpuna razgradnja boje potvrđena je u slučaju HRP-A, dok je nakon tretmana sa HRP-B uočen pik pri istom retencionim vremenu kao i početni molekul boje ali znatno manjeg intenziteta (slika 42a, HRP-B). Analiza apsorpcionih spektara dobijenih pikova ukazuje na to da se molekul boje odlikuje

prisustvom dva apsorpciona maksimuma locirana na 490 i na 310 nm (slika 42b, pik A). Spektar pika B potpuno se poklapa sa spektrom pika A ali je manjeg intenziteta, što ukazuje na prisustvo nerazgrađenih molekula boje (slika 42b, pik B).

Rezultati dobijeni praćenjem hromatografije nakon podešavanja detektora na 280 nm prikazani su na slici 43.



Slika 43. a) HPLC hromatogram OR2 pre i nakon tretmana sa HRP-A i HRP-B. Detektor je podešen na 280 nm; b) UV-vidljivi spektri hromatografskih pikova A i B.

Jedan pik pri retencionom vremenu od 9,57 min detektovan je u slučaju reakcione smeše obezbojavanja koja je sadržavala HRP-A (slika 43a, pik B). S obzirom na to da se ovaj pik odlikuje i drugačijim apsorpcionim profilom nego početni molekul boje ovo ukazuje na to da je u pitanju proizvod degradacije usled dejstva enzima (slika 43b, pik B).

U literaturi je opisana HPLC analiza razgradnje OR2 boje enzimima iz *P. ostreatus* gde je 1,2-naftohinon identifikovan je kao glavni intermedijer tokom razgradnje boje¹¹⁵. Usled primene različitog tipa HPLC aparata kao i metode, poređenje sa dobijenim rezultatima nije u potpunosti moguće.

3.4 Analiza obezbojavanja OR2 sa HRP LC—ESI-ToF-MS-om

Identifikacija intermedijera, odnosno proizvoda degradacije, nakon enzimskog tretmana može pomoći u razumevanju uloge strukture aromatičnih boja u eventualnom indukovanju toksičnosti. S obzirom na to da su naši prethodni eksperimenti pokazali da proizvodi obezbojavanja imaju različite hemijske osobine od početnog molekula boje,

njihova karakterizacija neophodna je u cilju razumevanja daljih istraživanja. Na osnovu rezultata publikovanih u literaturi želeli smo da proverimo da li su produkti obezbojavanja OR2 boje isti u slučaju primene komercijalno dostupnog preparata HRP i naše kisele izoforme, HRP-A¹¹⁶. Urađena je analiza boje i proizvoda obezbojavanja LC—ESI-MS tehnikom. OR2 boja pripada klasi mono-azo boja, odnosno poseduje jednu azo grupu, što značajno olakšava identifikaciju potencijalnih proizvoda degradacije. Takođe, boja OR2 u negativnom ESI modu daje deprotonovan $[M-H]^-$ i denatrijumovan $[M-Na]^-$ molekulski jon i omogućava veću selektivnost prilikom detektovanja nastalih aromatičnih struktura.

U cilju identifikacije proizvoda obezbojavanja, rastvor boje OR2 obezbojen je pomoću HRP-A prema ranije utvrđenim uslovima. Reakcija je zaustavljena po postizanju 95% obezbojavanja filtriranjem reakcione smeše kroz 0,22 μ m filter i razblaživanjem sa AN u odnosu 1:20. Na ovaj način, reakciona smeša je ujedno pripremljena za LC—ESI-ToF-MS analizu. Početni rastvor boje pripremljen je na isti način. Analiza je urađena na Agilent Technologies 1200 Series HPLC hromatografu koji je opremljen Warcosil 5 C18 RS kolonom i povezan sa Agilent Technologies 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom opremljenim ESI jonskim izvorom i analizatorom vremena preleta (ToF, *eng.* „Time-of-flight“). Eluiranje je postignuto izokratskom metodom i prikupljeni su maseni spektri u opsegu m/z 500–1000. Dobijeni rezultati prikazani su u Prilogu 3.

Karakteristični jon na m/z 327 potiče od monosulfonovane azo boje OR2 ($C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$). Maseni spektar proizvoda degradacije sadrži intenzivne jone na m/z 173, 186, 202 i 485. Tri od četiri najintenzivnija jona identifikovana su kao 4-hidroksibenzensulfonat, 4-nitrozobenzensulfonat i pseudodimer. Takođe, u masenom spektru detektovani su i drugi joni, koji do sada nisu opisani u literaturi.

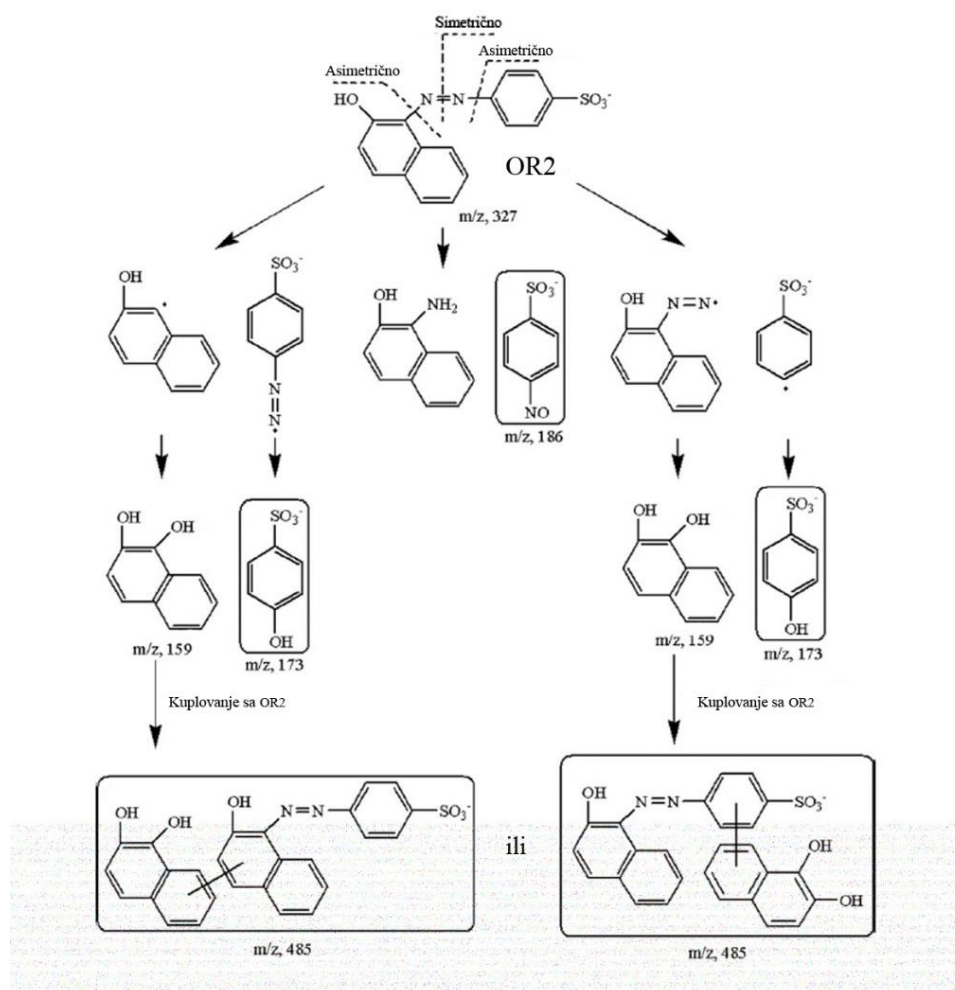
Identifikacija jona izvršena je na osnovu pregleda literature prikazane u tabeli 9.

Tabela 9. Proizvodi degradacije OR2 boje identifikovani ESI-ToF-MS tehnikom.

HRP	<i>m/z</i>	detektovano	Mod	Ref.
1,2-dihidroksinaftalen	159		negativan	
4-hidroksibenzenesulfonat	173	da	negativan	116
4-nitrozobenzenesulfonat	186	da	negativan	
pseudodimer	485	da	negativan	
MnP				
4-hidroksiibenzenesulfonat	173	da	negativan	
4-aminobenzenesulfonat	172		negativan	
benzenesulfonat	157		negativan	
4-sulfofenilhidroperoksid	189		negativan	
2-naftol	143		negativan	117
1-diazo-2-naftol	171	da	negativan	
4-nitrozobenzenesulfonat	186	da	negativan	
1-amino-2-naftol	160		pozitivan	
1,2-naftohinon	159		pozitivan	
LiP				
4-sulfofenilhidroperoksid				
1-amino-2-naftol				118
Elektro-enzimska degradacija				
sulfanilna kiselina				119
1-amino-2-naftol				

Slični proizvodi degradacije detektovani su nakon tretmana OR2 sa mangan- i lignin-peroksidazom^{117,118}, dok se kao finalni proizvod degradacije OR2 elektro-enzimskom metodama dobija sulfanilna kiselina i 1-amino-2-naftol¹¹⁹ (tabela 9). Međutim, treba naglasiti da jon detektovan na *m/z* 485, za koji se smatra da potiče od pseudodimera boje, još uvek nije detaljno ispitan i potvrđen u literaturi.

Na osnovu dobijenih rezultata predloženi mehanizam obezbojavanja OR2 pomoću HRP-a, adaptiran je i prikazan je na slici 44.



Slika 44. Mehanizam razgradnje OR2 nakon tretmana sa HRP ¹¹⁶.

Zhang i saradnici predložili su dva načina formiranja degradacionih proizvoda tokom cepanja boje dejstvom HRP-a (slika 44): (1) asimetrično raskidanje C—N veze koja dovodi do formiranja 1,2-dihidroksinaftalena i 4-hidroksibenzensulfonata; (2) simetrično raskidanje azo veze što dovodi do formiranja 4-nitrozobenzensulfonata ¹¹⁶. Finalni korak je kuplovanje OR2 i 1,2-dihidroksinaftalena i nastajanje pseudodimera sa očuvanom strukturom hromofore.

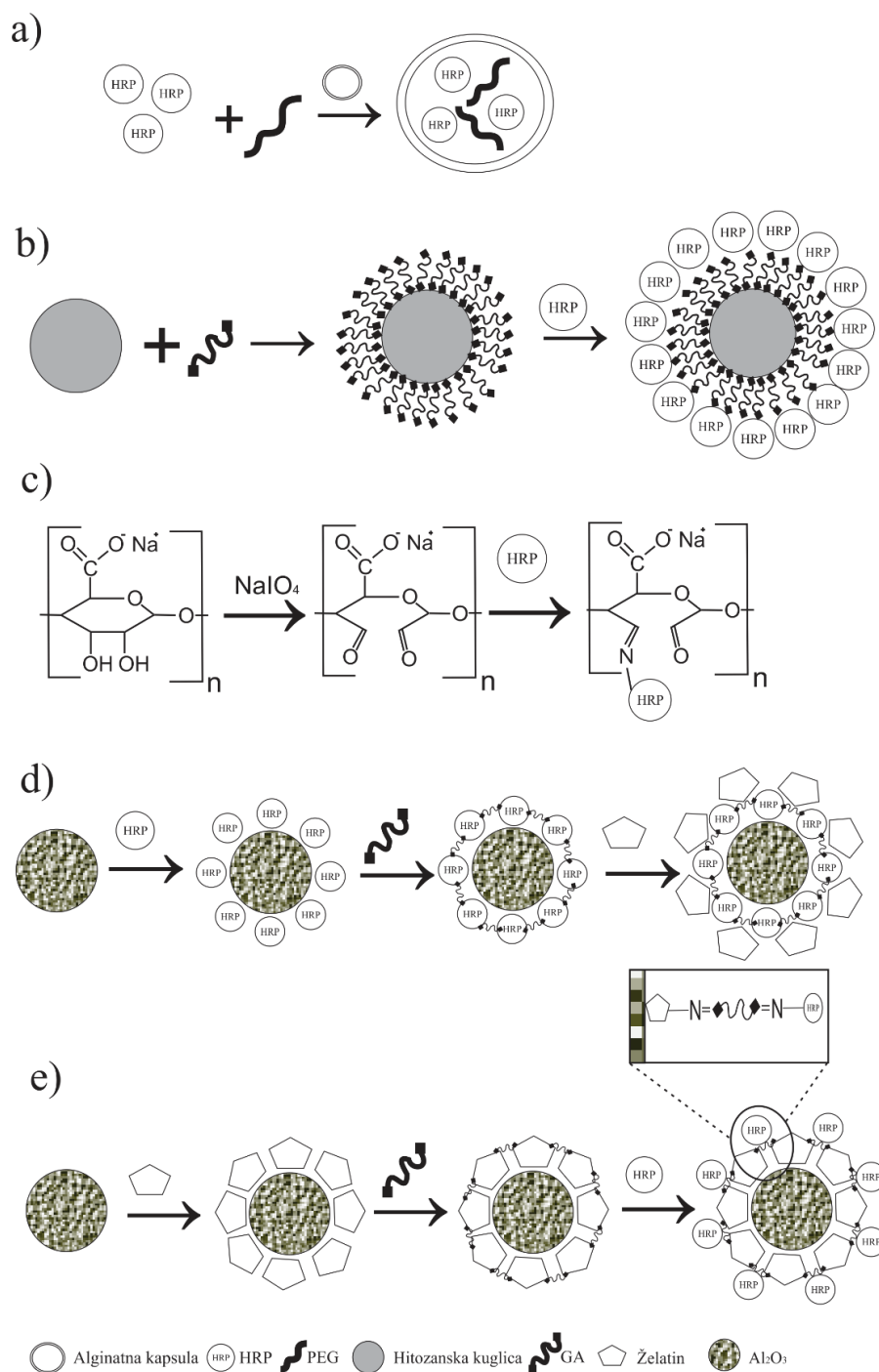
Dobijeni rezultati ukazuju na sličnosti sa do sada publikovanim rezultatima obezbojavanja OR2 sa HRP-om i definitivno ukazuju na tri moguća načina degradacije OR2 boje u zavisnosti od raskidanja azo veze. Takođe, interesantan je i rezultat koji ukazuje na moguće formiranje pseudodimera nastalih umrežavanjem zaostalih molekula boje sa nekim od intermedijera ili proizvoda degradacije tokom enzimske reakcije.

3.5 Imobilizacija HRP-A

Jedan od ciljeva ovog rada bio je dobijanje imobilizata na bazi HRP sa povećanom stabilnošću i efikasnošću u uklanjanju širokog spektra obojenih ksenobiotika. Usled toga što je jedan od glavnih problema primene imobilizata u obezbojavanju adsorpcija boje na površinu imobilizata, čime se smanjuje ili potpuno inhibira njegova aktivnost, veoma je teško predvideti koji tip nosača bi bio idealan za imobilizaciju HRP-a. Iz tih razloga, kao nosač za imobilizaciju našeg enzima odabrali smo dva organska (hitozan, alginat) i jedan neorganski nosač (aluminijum-oksidi). Odabir adekvatne metode imobilizacije podrazumevao je sintezu HRP imobilizata primenom 4 različite metode. Kako je na osnovu dobijenih rezultata obezbojavanja pokazano da kisela izoforma peroksidaze iz rena (HRP-A) ima veći afinitet ka ispitanim model-bojama (tabela 8) i nedovoljno je ispitana i kod nas i u svetu, ova izoforma odabrana je za sintezu imobilizata sa potencijalnom primenom u tretiranju otpadnih voda.

3.5.1 Specifična peroksidazna i dekolorizaciona aktivnost HRP-A imobilizata

Pripremljeno je 10 imobilizata peroksidaze iz rena primenom komercijalno dostupnih i laboratorijski sintetisanih nosača (alginat, hitozan, aluminijum-oksidi). Prečišćena HRP-A je imobilizovana inkubiranjem preparata HRP-A sa odgovarajućim nosačima. Shematski prikaz primenjenih načina imobilizacije HRP-A prikazan je na slici 45.



Slika 45. Imobilizacija peroksidaze iz rena (HRP): a) enkapsuliranjem enzima pomoću polietilen-glikola (PEG) i alginata, b) na hitozanske kuglice pomoću glutaraldehida (GA), c) aktiviranjem alginata perjodatom, d) direktnim vezivanjem enzima na alumijum-oksidi praćeno unakrsnim povezivanjem sa GA i zasićenjem želatinom, e) oblaganjem aluminijskog oksida želatinom praćenim unakrsnim povezivanjem GA i enzima.

Enkapsulacija enzima u alginatnim kapsulama je postignuta ukapavanjem smeše enzima, PEG 8000 i CaCl_2 u rastvor natrijum-alginata (slika 45a). Nakon formiranja kapsula, dobijeni imobilizati su dodatno učvršćeni prebacivanjem u svež rastvor CaCl_2 . U cilju optimizacije imobilizacije sintetisane su kalcijum-alginatne hidrokapsule uz pomoć 0,25% i 0,5% rastvora natrijum-alginata. Dobijeni imobilizati označeni su kao AP0,25 i AP0,5.

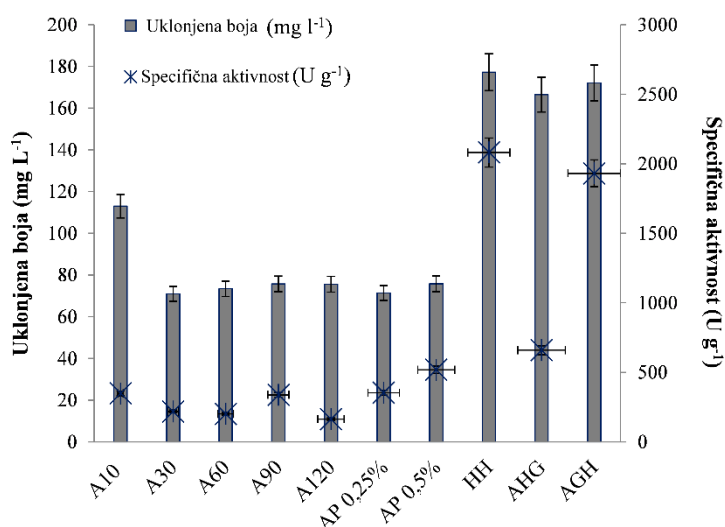
Imobilizat na bazi hitozana sintetisan je rastvaranjem 2% hitozana u 2% sirćetnoj kiselini i naknadnim ukapavanjem u 1 M rastvor NaOH uz mešanje. Dobijene kuglice su „aktivirane“ inkubiranjem u 1% rastvoru glutaraldehida u mraku. Nakon toga postupak imobilizacije enzima se sastojao od inkubiranja rastvorne HRP-A sa nosačem uz konstantno mešanje, čime je dobijen HH imobilizat (slika 45b).

Imobilizat na bazi alginata dobijen je kontinualnim ukapavanjem rastvora 2% rastvora natrijum alginata u 2% rastvor CaCl_2 bez mešanja. Na ovaj način sintetisani su alginatni rezanci koji su naknadno aktivirani perjodatnom oksidacijom. Perjodatna oksidacija alginatnih vlakana, pre nego enzima, izabrana je usled prirode kiselih izoformi peroksidaze iz rena. S obzirom na to da su ove izoforme više glikozilovane u odnosu na katjonske tj. bazne izoforme, perjodatna oksidacija ugljenohidratnog ostatka mogla bi imati negativne efekte na katalitičku aktivnost enzima^{84,120}. Oksidacija alginata dovodi do stvaranja novih reaktivnih grupa generišući dialdehidne ostatke koji bi potom mogli biti iskorišćeni za imobilizaciju enzima putem Šifove baze¹²¹. Svakako jedna od prednosti ove metode su netoksični i biodegradabilni biokatalizatori¹²². Vreme perjodatne oksidacije variralo je od 10 do 120 min. Enzim je imobilizovan inkubiranjem alginatnih rezanaca uz mešanje u rastvoru HRP-A. Na ovaj način sintetisani su sledeći imobilizati: A10, A30, A60, A90 i A120 (slika 45c).

HRP je imobilizovana adsorpcijom na neorganski nosač, aluminijum-oksidi. U cilju poboljšanja curenja enzima sa neorganskog nosača HRP je imobilizovan na aluminijum-oksida uz pomoć želatina. Jedan pristup imobilizaciji HRP-a sastojao se iz adsorpcije HRP-A inkubiranjem čestica aluminijum-oksida u rastvoru enzima, nakon čega bi usledilo umrežavanje uz pomoć glutaraldehida. Naknadno inkubiranje u rastvoru želatina imalo je za cilj da dodatno obloži enzim oko nosača i na taj način spreči njegovo curenje (AHG imobilizat, slika 45d)¹²³. Drugi pristup sastojao se iz oblaganja čestica aluminijum-oksida sa želatinom, inkubiranjem u 0,3% rastvoru želatina. Potom je

obloženi želatinski omotač dodatno umrežen pomoću glutaraldehida. Ovako pripremljen nosač inkubiran je u rastvoru enzima uz mešanje, nakon čega je dobijen AGH imobilizat (slika 45e).

Dobijeni imobilizati okarakterisani su određivanjem specifične peroksidazne aktivnosti gvajakolom kao i obezbojavanjem RB boje (Eksperimentalni deo, poglavlje 4.11.5 i poglavlje 4.11.6). Rezultati su prikazani na slici 46.



Slika 46. Poređenje aktivnosti dobijenih biokatalizatora. Prikazane vrednosti predstavljaju specifičnu aktivnost dobijenih biokatalizatora (* U/g suvog nosača) prema gvajakolu kao i količinu uklonjene RB boje (■ mg/L).

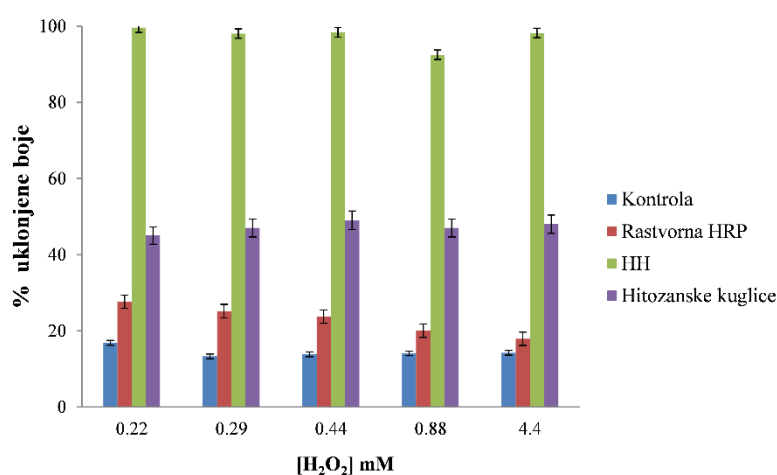
Od deset dobijenih imobilizata tri su se izdvojila po količini uklonjene model boje, RB. Najveća specifična aktivnost postignuta je imobilizacijom peroksidaze iz rena na hitozanu (HH), dok je peroksidaza iz rena imobilizovana na želatinu i aluminijum-oksidu (AGH) pokazala veoma sličnu aktivnost. HH imobilizat uklonio je 175 mg L⁻¹ reaktivne azo boje u jednom ciklusu, dok su AGH i AHG bili manje efikasni. U slučaju peroksidaze iz rena imobilizovane na aluminijum-oksidu, pa naknadno obložene želatinom (AHG), dobijena je znatno niža specifična aktivnost koja je nesrazmerna količini uklonjene boje. Ovi eksperimentalni podaci ukazuju na važnost položaja enzima prilikom dizajna imobilizata. Usled bolje supstratne dostupnosti gvajakola prilikom određivanja specifične aktivnosti dobijena je veća vrednost u slučaju HH i AGH imobilizata nego kod AHG. Međutim, kada je vreme reakcije dovoljno dugo da omogući prodiranje supstrata (u ovom slučaju boje) do enzima, (1 h za obezbojavanje model boje) dobijeni eksperimentalni podaci ukazuju na sličan nivo efikasnosti kod sva tri imobilizata. Ispitali smo uticaj

vremena na aktivaciju alginatnih vlakana natrijum-perjodatom tokom 10, 30, 60, 90 i 120 min. Svi alginatno oksidovani imobilizati pokazali su slične specifične aktivnosti prema gvajakolu, dok je imobilizat A10 uklonio više boje (115 mg L^{-1}) od ostalih imobilizata u ovoj seriji. Imobilizati HRP-a dobijeni enkapsuliranjem tj. zarobljavanjem peroksidaze iz rena u alginatnoj kuglici sa dodatkom PEG-a u 0,25% i 0,5% (AP0,25% i AP0,5%) takođe pokazuju slične dekolizacione sposobnosti. Nešto značanja specifična aktivnost dobijena je u slučaju 0,5% alginata korišćenog za zarobljavanje enzima unutar kapsule (AP0,5%).

Kako je najveća specifična i dekolizaciona aktivnost pokazana primenom HH imobilizata, dalja analiza i karakterizacija dobijenih imobilizata urađena je na ovom imobilizatu.

3.5.2 Optimizacija količine vodonik-peroksida pri reakciji obezbojavanja hitozan-HRP imobilizatom

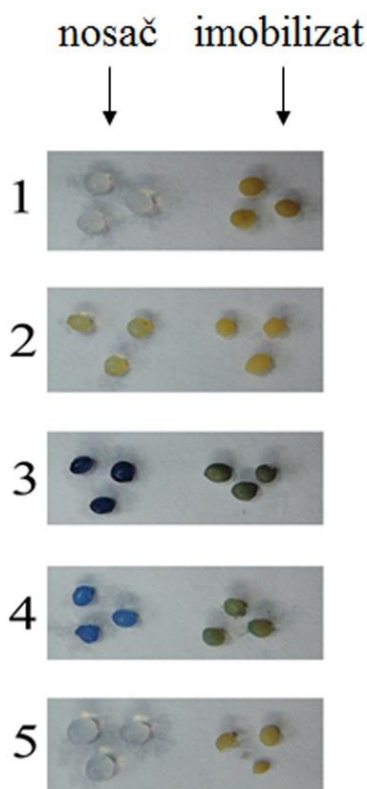
S obzirom na to da je HRP bisupstratni enzim, količina vodonik-peroksida predstavlja značajan parametar u reakcijama obezbojavanja. Uticaj količine vodonik-peroksida u reakcijama obezbojavanja RB boje ispitan je na rastvornoj i HRP imobilizovanoj na hitozanu, HH. Ispitan je uticaj vodonik-peroksida na obezbojavanje, kao i stepen adsorbovanja boje na hitozanski nosač. Rezultati su prikazani na slici 47.



Slika 47. Uticaj vodonik-peroksida na obezbojavanje RB. Kontrola: uticaj vodonik-peroksida na RB.

Vodonik-peroksid u koncentraciji od 0,22 mM pokazao je obezbojavanje od 16%, dok dalje povećanje koncentracije vodonik-peroksida nije imalo značajniji uticaj (slika 47, kontrola). Rastvorna peroksidaza uklonila je 28% boje iz rastvora pri istoj koncentraciji vodonik-peroksida. Daljim povećanjem koncentracije vodonik-peroksida uočava se opadanje dekolorizacione aktivnosti rastvorne peroksidaze. Nakon četvoročasovnog izlaganja rastvoru boje, hitozanske kuglice (nosači) uklonile su 49% boje iz rastvora, dok je HRP imobilizovan na hitozanu (HH) uklonio 100 % boje iz rastvora.

S obzirom na to da je pokazano da postoji afinitet ispitane boje prema nosaču postavlja se pitanje prevashodnog mehanizam uklanjanja boje HRP imobilizatima. Jednostavnim ispitivanjem i upoređivanjem obojenosti nosača i imobilizata u rastvorima boje tokom obezbojavanja moguće je zaključiti o procesu biodegradacije. Inkubiranjem hitozanskih nosača i HH imobilizata u rastvoru boje i vodonik-peroksida moguće je vizuelno pratiti stepen adsorpcije odnosno obezbojavanja (slika 48).



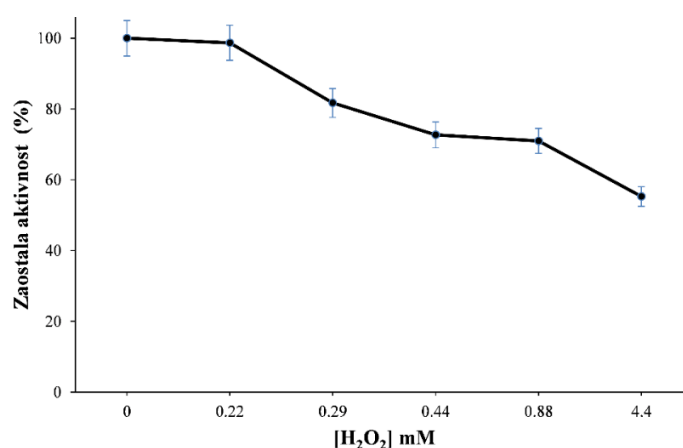
Slika 48. Kontrola adsorpcije boje na hitozanski nosač i HH nakon 4h reakcije: 1) pufer, 2) AO, 3) RBBR, 4) RB, 5) CBB.

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 48 jasno je vidljivo da u slučaju hitozanskih kuglica dolazi do adsorpcije boje. Međutim inkubiranjem HH imobilizata u rastvoru boje stepen obojenja imobilizata je značajnije manji nego što je to slučaj sa hitozanskim nosačem. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se uklanjanje boje HH imobilizatima odigrava prvenstveno reakcijom razgradnje boje pre nego pasivnog adsorbovanja.

3.5.3 Ispitivanje stabilnosti hitozan-HRP imobilizata prema višku vodonik-peroksida

Klasične peroksidaze vrlo su podložne nereverzibilnoj inaktivaciji prilikom izlaganja visokim koncentracijama vodonik-peroksida^{13,124}. Istraživanja su pokazala da postoji nelinearno zavisna inaktivacija kiselih izoformi HRP-a koja je indukovana pri veoma visokim odnosima koncentracija HRP-A i vodonik-peroksida (veći od 5000)¹. Dobijeni eksperimentalni podaci prikazani na slici 47 pokazali su inhibitorni uticaj visoke koncentracije vodonik-peroksida prilikom obezbojavanja RB sa rastvorom, ali ne i ukoliko je imobilizovanom HRP. Kako je reakcija obezbojavanja veoma brza te se dostupna količina vodonik-peroksida brzo troši, želeli smo da ispitamo uticaj koncentracije vodonik-peroksida na imobilizovan enzim bez njegovog trošenja pri reakciji obezbojavanja.

Inhibitorni uticaj vodonik-peroksida na aktivnost peroksidaze iz rena imobilizovane na hitozan ispitan je nakon četvoročasovne inkubacije HH biokatalizatora u rastvorima vodonik-peroksida. Nakon inkubiranja imobilizat je ispran destilovanom vodom i ponovo mu je određena specifična gvajakolna aktivnost. Aktivnost imobilizata pre inkubiranja u vodonik-peroksidu označena je kao 100% (slika 49).



Slika 49. Rezidualna aktivnost peroksidaze iz rena imobilizovane na hitozanu nakon četvoročasovnog izlaganja vodonik-peroksidu.

Blagi pad aktivnosti HH imobilizata uočava se nakon inkubiranja u 0,29 mM rastvoru vodonik-peroksida. Ovaj trend se nastavlja sa povećanjem koncentracije vodonik-peroksida. Međutim, inkubiranjem pri veoma visokim koncentracijama vodonik-peroksida (4,4 mM) HH imobilizat i dalje pokazuje preko 55% aktivnosti. Dobijeni eksperimentalni podaci ukazuju na povećanu stabilnost kisele peroksidaze iz rena imobilizovane na hitozanu.

3.5.4 Ispitivanje stepena obezbojavanja HH imobilizatom u zavisnosti od koncentracije i tipa boje

Pored azo i antrahinonskih boja, u industrijskim otpadnim vodama mogu se naći i druge vrste boja. Kako primena nekog imobilizata u tretiranju obojenih otpadnih voda ima smisla samo ukoliko dati imobilizat pokazuje široki spektar delovanja na različite boje, ispitali smo efikasnost HH imobilizata na obezbojavanje 4 strukturno različite boje. Takođe, kako u enzimski posredovanim reakcijama koncentracija supstrata može biti od ključnog značaja, dalja optimizacija zasnivala se na ispitivanju uticaja koncentracije boje i vodonik-peroksida. S obzirom na to su naša prethodno opisana istraživanja pokazala da vodonik-peroksid ima zanemarljiv uticaj prilikom obezbojavanja koje je katalizovano peroksidazom iz rena imobilizovanom na hitozanu, ispitali smo uticaj dve koncentracije boje (niske i visoke) na stepen obezbojavanja.

Obezbojavanje odabranih predstavnika različitih klasa boje ispitano je pri konstantnim uslovima količine polusuvog biokatalizatora, odnosno vodonik-peroksida, pH kao i vremena reakcije. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 10.

Uticaj koncentracije supstrata na stepen obezbojavanja HH imobilizata ispitan je pri koncentracijama boja od 25 mg L⁻¹ i 100 mg L⁻¹. Pri koncentraciji boje od 25 mg L⁻¹ najveće obezbojavanje postignuto je u slučaju antrahinonske (RBBR) i dvostruke azo boje (RB). U slučaju trifenilmetanske boje CBB, postignuto je 45% uklanjanje boje, dok je u slučaju akridinske boje uklonjeno 28%. Pri koncentraciji od 100 mg L⁻¹ boje HH imobilizat je i dalje uspešno uklanjao većinu boje, osim u slučaju AO.

Tabela 10. Obezbojavanje HH imobilizatom u zavisnosti od tipa i koncentracije boje.

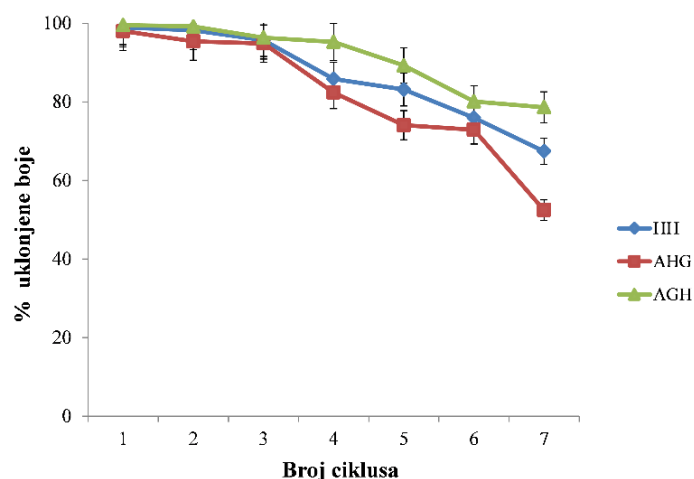
Koncentracija	Boja			
	AO	RBBR	CBB	RB
mg L ⁻¹	% uklonjene boje			
25	28	68	45	50
100	16	71	70	76

Dobijeni eksperimentalni podaci ukazuju na eventualnu kosupstratnu inhibiciju peroksidaze iz rena ili proizvodima reakcije ili bojom AO. Slični rezultati opisani su u literaturi gde je upotrebom oksidativnog enzima lakaze dolazilo do velikih poteškoća prilikom uklanjanja ove boje. Bez primene medijatora količina uklonjenog AO iznosila je manje od 5%¹²⁵. Nešto bolji procenat uklanjanja AO postignut je enzimom iz gljive *P. ostreatus* gde je nakon desetodnevnog inkubiranja uklonjeno 8,5% boje¹²⁶. Kada je peroksidaza iz *Saccharum spontaneum* imobilizovana na modifikovani polietilenski matriks, za potpunu dekolorizaciju 50 mg L⁻¹ antrahinonske i azo boje bilo je potrebno 6-8h pod datim reakcionim uslovima⁵⁰.

3.5.5 Ispitivanje efikasnosti HH, AGH i AHG imobilizata u ponovljenim ciklusima uklanjanja obojenog ksenobiotika

Imobilizacija može biti ekonomski isplativa i prihvatljiva samo ukoliko je biokatalizator stabilan i može mnogostruko da se primeni u ponovljenim reakcijama. S obzirom na to da koncentracija obojenog ksenobiotika u otpadnim vodama ponekad

prevazilazi 100 mg L^{-1} (kao što je to testirano u prethodnim eksperimentima) takva situacija bi lako mogla da se prevaziđe ponovljenim tretiranjem otpadne vode ili razblaživanjem uzorka i tretiranjem u ponovcima. Stoga, operativna stabilnost tri najbolja biokatalizatora ispitana je u uklanjanju model-boje RB. Rezultati su prikazani na slici 50.



Slika 50. Operativna stabilnost dobijenih imobilizata u obezbojavanju RB: peroksidazom imobilizovanom na hitozanu (HH), peroksidazom imobilizovanom na aluminijum-oksidu pa naknadno obloženo želatinom (AHG) i peroksidazom iz rena imobilizovanom na želatinom obloženo aluminijum-oksidu (AGH).

Za sva tri testirana imobilizata (HH, AGH i AHG) efikasnost uklanjanja boje bila je preko 90% u prva tri ciklusa, od kojih je svaki trajao 4 časa. Nakon sedmog ciklusa efikasnost uklanjanja RB pala je na 52% za AHG, 65% za HH i 78% za AGH. Imobilizacija enzima na neporoznim nosačima pokazuje manje stabilizujuće efekte usled izlaganja enzima spoljnim faktorima²⁴. Međutim, u slučaju AGH imobilizata, gde je enzim direktno izložen reaktivnoj boji, nakon sedam uzastopnih ciklusa stepen obezbojavanja je i dalje bio veoma visok (78%).

U literaturi opisano je nekoliko primena HRP imobilizovanog u cilju obezbojavanja u ponovljenim ciklusima. Komercijalno dostupan preparat HRP imobilizovan na akrilamidne kuglice pokazao je 10% smanjenje uklanjanja kisele azo boje odmah nakon prvog ciklusa, dok je nakon petog ciklusa imobilizat izgubio 50% svoje aktivnosti. Još veći pad u efikasnosti obezbojavanja pri istim reakcionim uslovima zabeležen je za HRP imobilizovan na alginatnim kuglicama⁴⁵. U slučaju peroksidaze iz

rena imobilizovane na β -ciklodekstrinu, nakon petog ciklusa procenat zadržane dekolizacije aktivnosti otpadne vode na bazi indigo plave, izosio je 52%⁴⁷. Imobilizacijom peroksidaze iz rena na metakaolinu i primenom u nekoliko ponovljenih ciklusa, obezbojavanje kisele violet 109 boje opada tokom svakog ciklusa i zadržava se na 35% u sedmom ciklusu¹²⁷.

3.6 Akutna toksičnost prema *Artemia salina*

Enzimsko obezbojavanje može dovesti do stvaranja proizvoda degradacije koji mogu biti manje ili više toksični nego početni molekul boje usled nedostatka potpune mineralizacije boje. Kako se procena ispravnosti otpadne vode nakon nekog tretmana uglavnom zasniva isključivo na proceni hemijskog sastava (npr. smanjenju intenziteta obojenosti rastvora) to nije dovoljan parametar za potpunu procenu efikasnosti nekog tretmana. Naši prethodni eksperimenti analize HPLC-DAD i ESI-ToF-MS su u velikom broju slučajeva potvrdili nastanak proizvoda degradacije koji bi mogli uticati na toksičnost u zaostaloj reakcionoj smeši nakon obezbojavanja. Stoga, primena biološkog testa čiji su rezultati pokazatelji potencijalnog ekološkog uticaja, u smislu procene ekotoksikološkog aspekta tretmana obojenih optadnih voda, trebalo bi da bude sastavni deo celokupne analize primenjenog tretmana.

Akutna toksičnost ispitana je pomoću „brine shrimp“ testa pre i posle obezbojavanja nekoliko model-boja sa HRP-A, sa ciljem utvrđivanja efikasnosti HRP kao ekološki prihvatljivog biokatalizatora. Uzorci za testiranje uzimani su pre i nakon postizanja maksimalnog stepena obezbojavanja sa HRP-A. Pre izlaganja jedinkama *A. salina*, rastvorima boje i proizvoda obezbojavanja podešen je pH na 7 i ostavljen; nakon 48 h kako bi se raspao eventualni zaostali vodonik-peroksid. Test akutne toksičnosti trajao je narednih 24 h tokom kojih larve nisu aerisane niti hranjene. Ovakva postavka eksperimenta imala je za cilj utvrđivanje akutne toksičnosti usled izlaganja rastvoru boje pre i nakon enzimskog tretmana. Kontrolna grupa larvi izlagana je rastvoru morske vode istog pH. S obzirom na to da je stepen preživljavanja kontrolne grupe larvi bio preko 90% pokazana je ispunjenost kriterijuma validnosti primenjenog testa. Rezultati su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Procenat mortaliteta *A. salina* nakon 24 h izlaganja tekstilnim reaktivnim bojama pre i nakon tretmana sa HRP-A.

Boja	% mortaliteta	
	Pre obezbojavanja	Nakon obezbojavanja
Amido crna 10b (AB)	19	14
Oranž 2 (OR2)	31	9
Kongo crvena (CR)	48	30
Akridin oranž (AO)	66	38

Najveći procenat mortaliteta zabeležen je u slučaju AO i CR boje, a najmanji kod OR2 i AB. Nakon obezbojavanja, procenat mortaliteta je značajno snižen u svim ispitanim rastvorima, a najviše u slučaju OR2 boje.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da obezbojeni rastvori boja poseduju manju toksičnost prema *A. salina* nego rastvori boja pre tretmana sa HRP-A. Ovo je u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima analize akutne toksičnosti boja, gde je uočeno značajno smanjenje akutne toksičnosti nakon obezbojavanja rastvora sa komercijalnim preparatom HRP-a^{46,104}. Međutim, smanjenje procenta mortaliteta nakon enzimskog obezbojavanja sa HRP nije u saglasnosti sa ranije publikovanim vrednostima za reaktivno plavu 19: nakon tretmana sa SBP uočeno je značajno povećanje toksičnosti prema *A. salina* usled nagomilavanja toksičnih proizvoda¹²⁸.

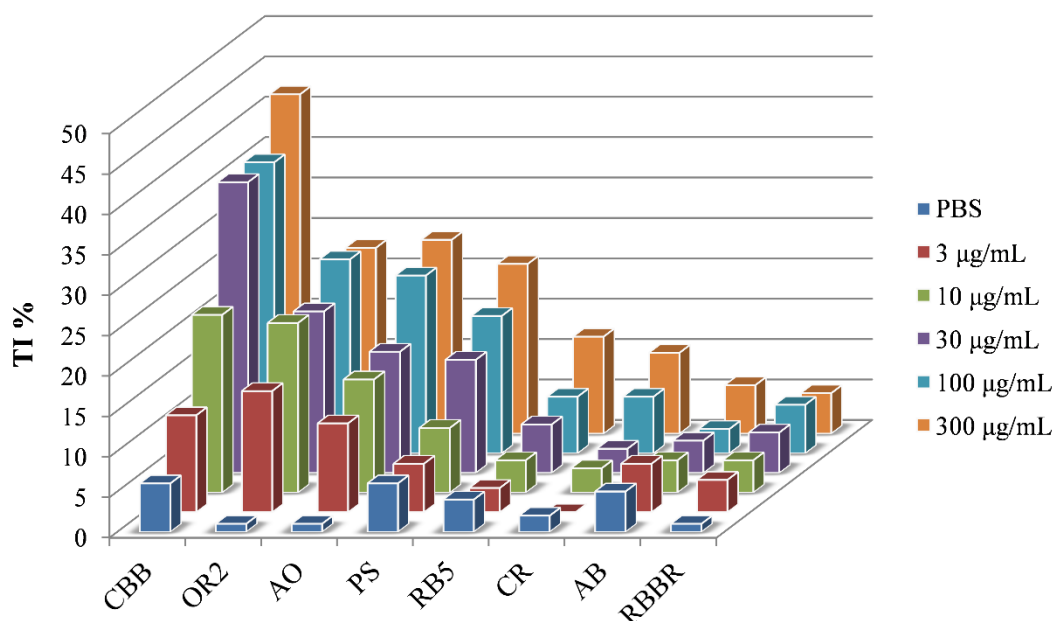
3.7 Ispitivanje genotoksičnosti boja i proizvoda degradacije boja komet testom

Rezultati dobijeni nakon analize akutne toksičnosti usmerili su nas ka daljem ispitivanju potencijalne toksičnosti boja metodom koja bi mogla da ukaže i na eventualnu ekogenotoksičnost ispitivanih rastvora. Najvažnije oštećenje na molekularnom nivou genotoksičnih supstancija je indukovanje različitih tipova lezija na molekulu DNA uključujući i prekide na lancu DNA. Detekcija i kvantifikovanje prekida na molekulu DNA, i to na nivou pojedinačne eukariotske ćelije, mogući su primenom komet testa na veoma brz i lak način.

Potencijalni genotoksični efekti obojenih ksenobiotika prvobitno su ispitani pre tretmana sa kiselim izoformom peroksidaze iz rena primenom komet testa na bronhijalnim epitelnim ćelijama (BEAS-2B). BEAS-2B ćelijska linija usled svog ne-kancerogenog fenotipa poseduju prednost u istraživanjima vezanim za kancerogene procese poput oštećivanja DNA i ćelijske transformacije, kao i u *in vitro* toksikološkim ispitivanjima u polju zagađivača, proizvoda na bazi duvana i nanometrijala ¹²⁹. Primenjen je komet test „srednje protočnosti“ zbog mogućnosti paralelnog ispitivanja većeg broja uzoraka. Ćelije su nakon polaganja u gel izlagane rastvorima boje (tokom 30 min) u širokom koncentracionom opsegu, u cilju određivanja koncentracione zavisnosti. Primenjene koncentracije boja bile su ispod subtoksičnih jer je vijabilnost ćelija bila preko 80%. Ovakva postavka eksperimenta omogućila je realniju procenu izlaganja ćelija okolnom rastvoru boja, kao što je to slučaj u otpadnoj vodi. Nakon preliminarnih eksperimenata određivanja stepena oštećenja DNA kod ispitivanih boja, odabrane su dve model-boje u cilju detekcije šireg spektra oštećenja DNA pre i nakon obezbojavanja sa HRP-A.

3.7.1. Ispitivanje genotoksičnosti obojenih ksenobiotika osnovnim komet testom

Primenom komet testa merili smo kapacitet oštećivanja DNA bojama u širokom opsegu koncentracija, nakon 30-minutnog izlaganja ćelija bojama. Dobijeni rezultati izraženi su preko vrednosti intenziteta fluorescencije repa komete u odnosu na glavu i rep komete izražene u procentima (TI%). Rezultati su prikazani na grafiku (slika 51). PBS je korišćen kao negativna kontrola, dok je izlaganje rastvoru vodonik-peroksida služila kao pozitivna kontrola (5 min, 100 μ M). Eksperimenti su rađeni u triplikatu i ponavljeni u tri nezavisna ponavljanja. Statistički značajna razlika između boje, ispitanih koncentracija boje i negativne kontrole (PBS) potvrđena je dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA) praćenom Tukey-Kramer testom višestruke analize za $P < 0,05$.



Slika 51. Procena genotoksičnih efekata boja različitih koncentracija (3, 10, 30, 100 i 300 µg mL⁻¹) na BEAS-2B ćelije merena komet testom.

Testirane koncentracije boja (0–300 µg mL⁻¹) pokazale su različit uticaj na stepen oštećivanja DNA. Nakon izlaganja ćelija bojama CR, AB i RBBR, stepen oštećenja DNA bio je u granicama negativne kontrole (TI% <10%). U slučaju RB5 pokazan je manji uticaj na DNA sa TI% 12. U ovom slučaju, kao i u preostala četiri uočava se porast vrednosti TI% sa porastom koncentracije boja. Najveći TI% uočen je nakon izlaganja ćelija CBB boji. Pri koncentraciji od 300 µg mL⁻¹ TI% je iznosio 47%. BEAS-2B ćelije pokazale su TI% od 23% nakon inkubiranja u OR2 pri koncentraciji od 300 µg mL⁻¹. Maksimalna vrednost TI% od 24% i 20% detektovana je u ćelijama nakon inkubiranja sa AO i PS.

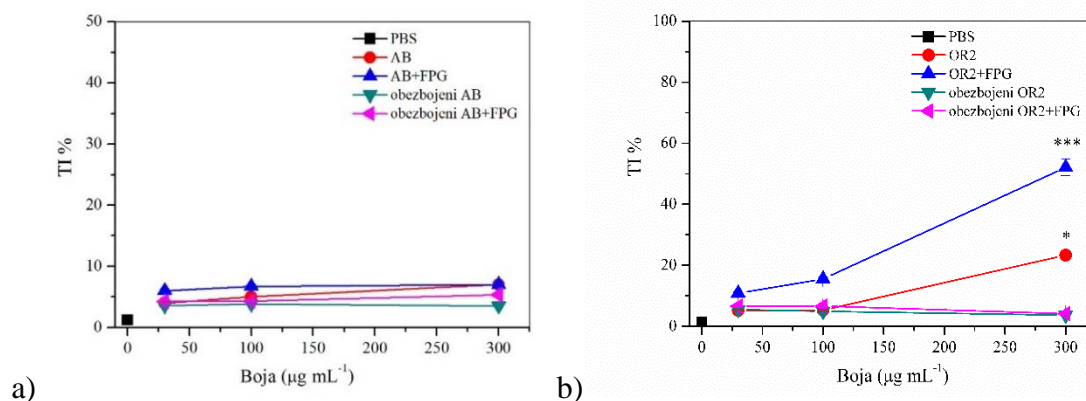
Antrahinonska boja, označena kao potencijalni mutagen, pokazala je negativan uticaj na stepen oštećenja DNA prilikom izlaganja normalnim humanim dermalnim ćelijama fibroblasta⁷². U našem slučaju, nakon 30-minutnog izlaganja ćelija boji antrahinonskog tipa (RBBR) uočava se koncentraciono zavisno oštećenje molekula DNA. Najveći nivo oštećenja detektovan je nakon izlaganja ćelija trifenilmetanskoj boji (CBB). Dvostruka azo boja, Red HE3B pokazala je visok nivo oštećivanja DNA u *Allium cepa* koji nastaje kao posledica oksidativnog stresa tokom izlaganja rastvoru boje¹³⁰. Komet testom

detektovana su genotoksična oštećenja u HepG2 ćelijama nakon izlaganja dvema azo bojama (Basic Red 51 i Basic Brown 19)⁶¹. Značajni toksični efekti na gljivama vrste *Schizophyllum commune* objašnjeni su kao posledica produžene lag faze gljiva usled bioakumulacije boje OR2¹³¹. Azoreduktaze, enzimi koji metabolizuju boje produkujući slobodne aromatične amine takođe predstavljaju potencijalne kancerogene i mutagene¹³².

3.7.2. Procena oksidativnog oštećenje DNA modifikovanim komet testom

Procena stepena oštećenja DNA u BEAS-2B ćelijama nakon 30 min izlaganja boji detaljnije je analizirana u slučaju dve model-boje: AB koja je pokazala nizak stepen oštećenja DNA (TI% <10%) i OR2 koja je pokazala nešto viši stepen oštećenja DNA (TI% 23). Model-boje i njihovi proizvodi degradacije, zaostali nakon enzimskog tretmana sa HRP-A, ispitani su standardnim i modifikovanim komet testom. Kako je poznato da se vodonik-peroksid koristi kao pozitivna kontrola komet testa, a potreban je za reakciju enzimskog obezbojavanja, pre inkubiranja ćelija sa proizvodima degradacije reakcione smeše su tretirane katalazom u cilju uklanjanja rezidualnog vodonik-peroksida. Kako bismo bili sigurni da li ovi enzimi zaostali u reakcionoj smeši mogu uticati na stepen oštećivanja DNA, urađeni su kontrolni eksperimenti. Dobijeni rezultati prikazani su u Prilogu 4. Modifikovani komet test imao je za cilj da detektuje i druge vrste oštećenja DNA: baze koje su pretrpele oksidativna oštećenja. Radi praćenja ovog procesa komet testom potrebna je primena FPG-a ili drugih enzima specifičnih za lezije, izolovanih iz odgovarajućeg hiperprodukujućeg bakterijskog soja. Postavka eksperimenta je identična do momenta nakon izlaganja ćelija ispitivanim reakcionim smešama, nakon čega je potrebno dodatno inkubiranje izlaganih ćelija sa FPG-om. S obzirom na to da FPG pored glikozilazne aktivnosti poseduje i AP-lijaznu aktivnost (detektuje i AP mesta), potrebne su dodatne kontrole u cilju određivanja isključivo izmenjenih, oksidativnih baza¹³³. Stoga je potrebna priprema tri mikroskopske pločice za jedan uzorak: jedna za merenje prekida u lancu DNA i AP mesta, jedna za kontrolu pufera potrebnog za FPG, i jedna za inkubiranje sa FPG-om nakon inkubiranja u uzorku. Posebnim titracionim eksperimentom utvrđuje se stepen razblaženja FPG-a u cilju sprečavanja nespecifičnih interakcija tokom inkubiranja. Iz razlike u TI% u ćelijama inkubiranim sa FPG-om i bez njega određuje se neto broj FPG-senzitivnih mesta. Dobijeni eksperimentalni rezultati

prikazani su na slici 52. Statistički značajna razlika između ispitivanih reakcionih smeša potvrđena je ANOVA testom za $P < 0,05$ i $P < 0,01$.



Slika 52. Nivo oksidativnih oštećenja DNA molekula u BEAS-2B ćelijama detektovanih nakon 30 min izlaganja boji i proizvodima obezbojavanja; a) AB, b) OR2; * $P < 0,05$, *** $P < 0,01$.

Nakon inkubiranja sa $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ OR2 ćelije pokazuju TI% od 23%. Nakon inkubiranja sa FPG-om detektovan je porast u broju jednolančanih prekida na DNA (53%) ukazujući na značajna oksidativna oštećenja na molekulu DNA nakon tretmana bojom. Tretman obezbojavanja OR2 doveo je do značajnog smanjenja nivoa oštećenja DNA u ćelijama. Dodatno inkubiranje sa FPG nije dovelo do porasta u broju SB-ova ukazujući na izostanak oksidativnog oštećivanja DNA, kao što je to slučaj sa netretiranom bojom.

Nivo oštećenja DNA nakon 30 min izlaganja AB boji bio je nizak pri svim testiranim koncentracijama. Čak i nakon tretmana sa FPG-om nisu detektovani SB-ovi. Ćelije izlagane proizvodima obezbojavanja AB takođe nisu pokazale značajniji stepen oštećenja DNA u poređenju sa početnom bojom i negativnom kontrolom, dovodeći do zaključka o potpunom nedostatku genotoksičnih efekata pri testiranim koncentracijama.

Smanjenje genotoksičnosti detektovane osnovnim komet testom na humanim limfocitima nakon enzimskog tretmana oranž 2MR boje sa *Lysinibacillus* sp. u prisustvu hrom (VI) zabeleženo je od strane Chaudhari i saradnika¹³⁴. Primena modifikovanog komet testa u cilju procene ekogenotoksičnosti boja i enzimskog tretmana je opisana prvi put u ovoj doktorskoj disertaciji.

3.8 Ispitivanje interakcija obojenih ksenobiotika sa DNA

Toksičnost azo boja smatra se direktnom posledicom njihove niske molekulske mase i lipofilnosti koja olakšava difuziju kroz ćelijsku membranu. Međutim, voluminoznost molekula boje može se razlikovati u zavisnosti od njihovih struktura, kao i raspored naelektrisanja. Za razliku od početnih molekula boje, proizvodi obezbojavanja su uglavnom manji, hidrofobni molekuli koji bi trebalo mnogo lakše da prolaze kroz ćelijsku membranu⁶². Direktna posledica ovoga jeste različita difuzija ispitivanih boja tokom ograničenog vremenskog perioda laboratorijskog testiranja. Rezultati našeg istraživanja pokazali su različit stepen oštećivanja DNA nakon izlaganja BEAS-2B ćelija rastvorima boja. Ovo je ukazalo na postojanje interakcija molekula boja sa DNA. U cilju određivanja prirode, odnosno tipa interakcija boja i DNA ispitivali smo moguće interakcije boja sa DNA iz dva različita izvora klasičnim spektrometrijskim i elektroforetskim metodama. Kako su naši eksperimenti pokazali nastajanje nakon obezbojavanja novih proizvoda degradacije, koji bi mogli iskazati različit način interakcije u odnosu na početni molekul boje (bez obzira na pretpostavljenu početnu toksičnost), naša ispitivanja smo proširili i na reakcione smeše zaostale nakon obezbojavanja model-boja OR2 i AB.

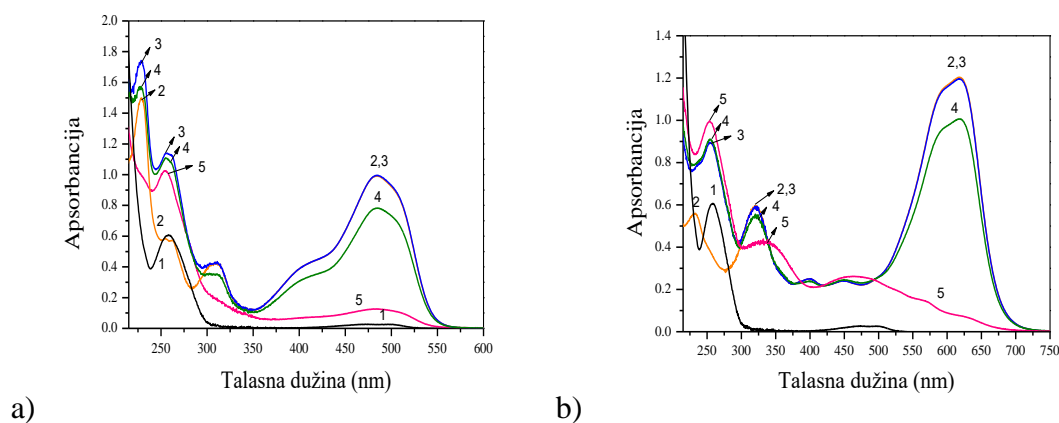
3.8.1. Ispitivanje interakcija OR2 i AB sa CT-DNA UV–Vis spektrometrijom

Ispitivanje interakcija sa DNA započeli smo sa linearnom DNA iz telećeg timusa (CT-DNA). Metodom UV–Vis spektrometrije pratili smo promene nastale nakon inkubiranja reakcionih smeša sa CT-DNA. Boje su direktno primenjene za inkubiranje sa DNA rastvaranjem u odgovarajućem puferu. Reakcione smeše obezbojavanja pripremljene su kao što je opisano u poglavlju 3.2. Inkubiranje sa CT-DNA trajalo je 90 min uz povremeno mešanje i konstantnu temperaturu od 25 °C. Nakon toga uzorcima su snimani UV–Vis spektri u opsegu 200-800 nm. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 53.

Spektar DNA iz telećeg timusa (CT-DNA) odlikuje se apsorpcionim maksimumom na 260 nm (slika 53a, spektar 1 (9×10^{-5} mol L⁻¹)). Boja OR2 sadrži dva karakteristična apsorpciona maksimuma na 490 i 309 nm koji su praćeni sa dva manja pika locirana na 251 i 261 nm (slika 53a, spektar 2). Inkubiranjem OR2 sa CT-DNA ne dolazi do značajnijih promena u vidljivom delu spektra. Međutim, u UV oblasti

apsorbovanja DNA zapaža se hiperhromizam koji iznosi 60% (slika 53a, spektar 3). Ovaj efekat rezultat je oštećivanja strukture dvostrukog heliksa DNA. Dodatak vodonik-peroksida u reakciju izazvao je blago smanjenje intenziteta apsorpcionih traka na 490 nm i 390 nm usled razgradnje boje (slika 53a, spektar 4). Kao posledica toga uočava se da je hiperhromizam na 260 nm manje izražen nego u slučaju OR2–CT-DNA spektra. Enzimskom degradacijom OR2 dolazi do nestanka karakterističnih apsorpcionih maksimuma boje usled degradacije glavne hromofore boje OR2 (slika 53a, spektar 5). Ova promena praćena je pomeranjem od 3 nm sa hipohromizmom od 30% na 260 nm, što ukazuje na stabilizaciju sekundarne strukture DNA.

S obzirom na to da opisane promene u OR2—CT-DNA spektru nisu praćene značajnim batohromnim pomeranjem λ_{\max} ka većim talasnim dužinama (>10 nm) moguće je zaključiti da opisane interakcije nisu interkalacionog tipa⁹³. Rezultati dobijeni nakon inkubiranja proizvoda obezbojavanja OR2 sa CT-DNA ukazuju na to da enzimsko obezbojavanje OR2 utiče na smanjenje nivoa interakcija sa DNA, u odnosu na početni molekul boje.



Slika 53. Promene u apsorpcionim spektrima OR2 (a, $30 \mu\text{g L}^{-1}$) i AB (b, $30 \mu\text{g L}^{-1}$) pre i posle obezbojavanja izoformom HRP-A ($0,14 \text{ U mL}^{-1}$) u prisustvu H_2O_2 ($6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$).

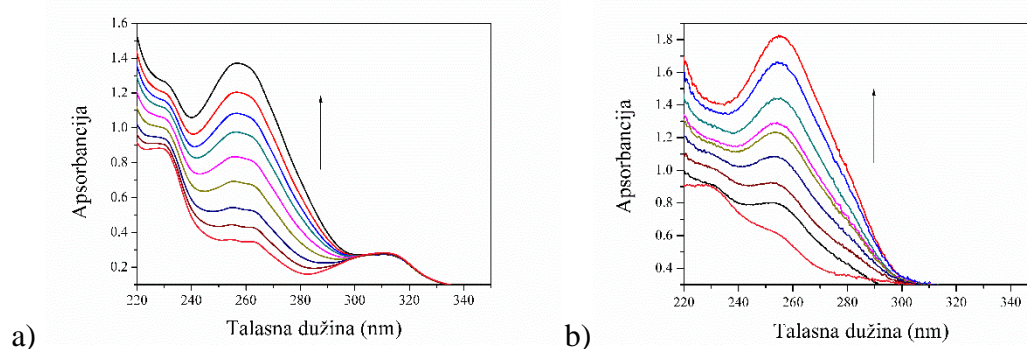
Apsorpcioni spektar AB pokazuje dva maksimuma, glavni na 620 nm i sporedni na 320 nm. Manji pik pojavljuje se i u UV oblasti spektra, na 230 nm (slika 53b, spektar 2). Inkubiranjem AB sa CT-DNA dolazi do pomeranja λ_{\max} na 260 nm ka plavom delu spektra (hipsohromni efekat), koje je praćeno 4% hipohromnim efektom (slika 53b, spektar 3). Nastale promene ukazuju na interakciju boje sa DNA praćenu promenom konformacije i stabilizacijom sekundarne strukture¹³⁵. Slične promene izazvane su

inkubiranjem CT-DNA sa rastvorom vodonik-peroksida (slika 53b, spektar 4). Obezbojavanje AB sa HRP-om dovodi do nagomilavanja proizvoda degradacije što je vidljivo pojavom novog pika na 464 nm i 332 nm (slika 53b, spektar 5). Inkubiranje proizvoda degradacije AB sa DNA rezultovalo je pojavom hipsohromnog pomeranja apsorpcionog pika od 6 nm u regionu karakterističnom za DNA (260 nm) i praćen je hiperhromizmom od 8% (slika 53b, spektar 5). Jedan od mogućih razloga ovih efekata bi mogao da bude nagomilavanje aromatičnih intermedijera prilikom obezbojavanja koji mogu interagovati sa dvostrukim heliksom. Međutim, kako su opisane promene veoma malog opsega, na osnovu dobijenih rezultata nije moguće uočiti korelaciju sa poznatim, klasičnim interkalatorima ili molekulima koji se vezuju u DNA brazdu¹³⁶.

3.8.2 Spektrometrijska titracija OR2 i AB sa CT-DNA

U cilju određivanja konstante vezivanja boje odnosno proizvoda obezbojavanja za DNA, fiksne koncentracije boje ili proizvoda obezbojavanja titrovane su rastućim koncentracijama CT-DNA. Kako su naši prethodni rezultati ukazali na odsustvo promena u vidljivom delu spektra pri λ_{\max} karakterističnim za boje, nastale promene pratili smo u UV regionu spektra karakterističnom za DNA (260 nm).

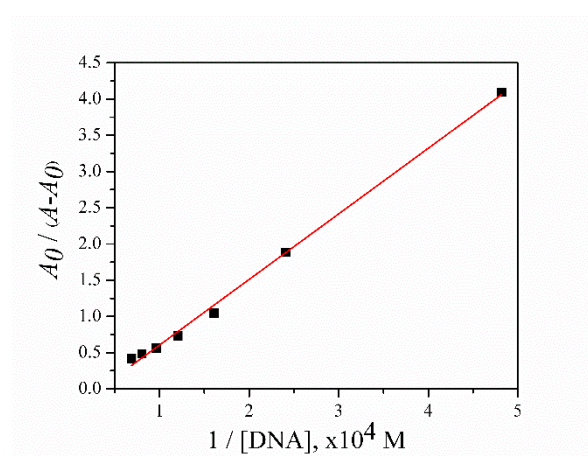
Na slici 54 prikazane su promene u UV regionu spektra OR2 i proizvoda obezbojavanja u prisustvu rastućih koncentracija CT-DNA.



Slika 54. Interakcija 35 μM OR2 (a) i proizvoda obezbojavanja (b) u prisustvu 0,23, 46, 92, 115, 138, 162, 185 i 205 μM CT-DNA.

Po dodavanju DNA boji OR2 intenzitet apsorpcione trake oko 260 nm je u porastu ali bez očiglednih pomeranja u talasnim dužinama. Obezbojavanjem OR2 apsorpcioni

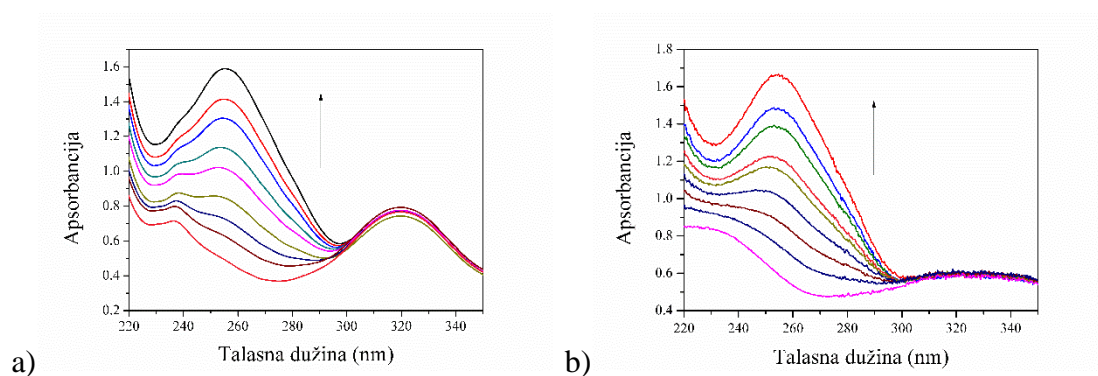
maksimum lociran na 309 nm je nestao usled razgrađivanja boje, dok dodatkom DNA dolazi do blagog hipsohromnog efekta i zaravnjavanja pika lociranog oko 230 nm. Ovo ukazuje na moguće preklapanje apsorpcionih spektara novonastalih proizvoda degradacije OR2 sa CT-DNA. U cilju poređenja jačine interakcija određena je konstanta vezivanja boje za DNA na osnovu odnosa odsečka i nagiba između $A_0/(A-A_0)$ prema $1/[DNA]$ (slika 55). Konstanta vezivanja proizvoda obezbojavanja nakon tretmana sa HRP nije prikazana usled toga što nakon obezbojavanja zaostaje reakciona smeša različitih proizvoda degradacije u nepoznatim koncentracijama.



Slika 55. Određivanje konstante vezivanja OR2 za CT-DNA.

Dobijene konstante iznosile su $3,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ za OR2.

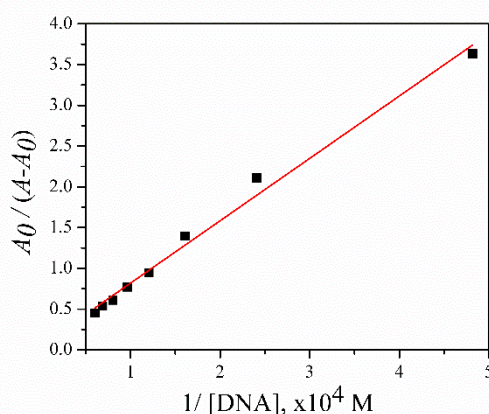
Spektrometrijske titracije AB i njegovih proizvoda obezbojavanja sa DNA prikazane su na slici 56.



Slika 56. Interakcija $33 \mu\text{M}$ AB (a) i proizvoda obezbojavanja (b) u prisustvu $0,23, 46, 92, 115, 138, 162, 185$ i $205 \mu\text{M}$ CT-DNA.

Nakon titracije AB boje sa CT-DNA primećene su veoma male promene u karakterističnom apsorpcionom delu spektra boje (320 nm). Usled dodavanja DNA uočava se porast apsorpcije na 260 nm koji nije praćen pomeranjem λ_{\max} . Takođe, slične promene zapažene su po dodatku DNA na 236 nm, manje piku koji takođe potiče od boje (slika 56a). ApSORPCIONI spektri nakon titracije proizvoda obezbojavanja AB sa CT-DNA ne dovode do porasta apsorpcije na 320 nm, ali su praćeni porastom apsorpcije na 260 nm (slika 56b). Prikazani rezultati ukazuju na interakcije boja sa DNA, međutim posmatrane promene nisu dovoljno i jasan pokazatelj prirode datih interakcija.

Na osnovu podataka prikazanih slici 57 određena je konstanta vezivanja AB za CT-DNA.



Slika 57. Određivanje konstante vezivanja AB za CT-DNA.

Dobijena konstanta iznosila je $7,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

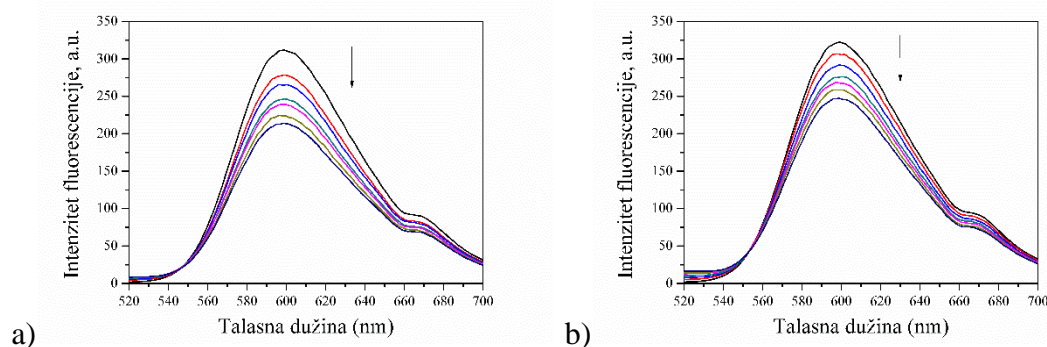
3.8.3 Ispitivanje interakcija boja sa CT-DNA fluorescentnom spektrometrijom

Fluorescentna spektrometrija je jedna od češćih metoda za praćenja interakcija nekog molekula i DNA. Prednost ove metode naspram drugih tehnika je visoka osetljivost, selektivnost i linearnost u velikom koncentracionom opsegu merenih parametara. Pomoću ove metode moguće je proceniti način vezivanja molekula za DNA. Kako odabrane model boje nisu pokazale fluorescenciju pod datim eksperimentalnim uslovima, direktno predviđanje njihovog vezivanja za DNA nije moguće praćenjem emisijih spektara. Iz tog razloga sledeći eksperimenti koncipirani su na praćenju

„istiskivanja“ EB iz prethodno formiranog kompleksa sa CT-DNA. U cilju procene kompetitivnog vezivanja boje pre i nakon obezbojavanja, kompleks EB—CT-DNA smo titrovali rastućim koncentracijama boje ili proizvoda degradacije pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Nastale promene praćene su snimanjem fluorescentnih spektara od 520 do 700 nm pri ekscitaciji na 500 nm.

3.8.3.1 Ispitivanje interakcija OR2 sa CT-DNA fluorescentnom spektrometrijom

Ispitivanja smo započeli titracijom kompleksa EB sa CT-DNA (EB—CT-DNA) rastućim koncentracijama OR2 (Slika 58a). Sa porastom koncentracije OR2 boje uočava se smanjenje intenziteta fluorescencije na 600 nm koji potiče od kompleksa EB—CT-DNA. Maksimalni pad intenziteta fluorescencije EB—CT-DNA (72,8%) uočen je pri 15,2 μM OR2. Dobijeni rezultati ukazuju na moguću kompeticiju molekula boje OR2 sa EB za vezivanje u DNA.



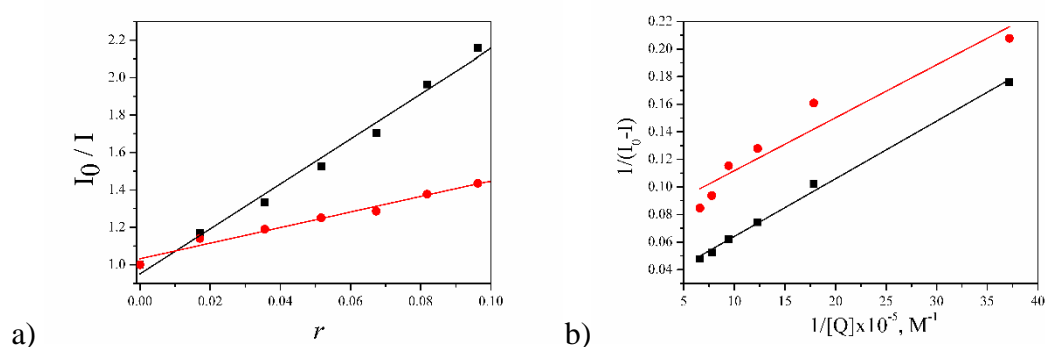
Slika 58. Fluorescentni spektri EB—CT-DNA u prisustvu OR2 (a) i njegovih degradacionih proizvoda (b) pri različitim koncentracijama: 0, 2,7, 5,7, 8,2, 10,7, 12,9 i 15,2 μM . Koncentracije EB i CT-DNA su 25 μM i 100 μM .

Nakon obezbojavanja OR2, proizvodi degradacije pokazuju značajnije manji stepen istiskivanja EB iz EB—CT-DNA kompleksa pri istim reakcionim uslovima. Kompletno obezbojavanje 15,2 μM OR2 i naknadna titracija kompleksa EB—CT-DNA rezultovalo je smanjenjem intenziteta fluorescencije od 32%. Rezultati ukazuju na to da proizvodi degradacije OR2 pokazuju manji stepen kompetitivnog vezivanja sa EB za CT-DNA nego što je to slučaj sa OR2.

K_{sv} određena je primenom jednačine (2) iz nagiba prave dobijene na grafiku na slici 59a: $K_{sv} = 7,62 \times 10^4$ i $2,64 \times 10^4$ za boju i proizvode obezbojavanja. Vrednosti K_{sv}

sugerišu da je efekat OR2 mnogo jači pre nego nakon obezbojavanja. Takođe, izračunate konstante su značajno niže u odnosu na K_{sv} klasičnih interkalatora poput nil plave $(3,2 \times 10^6)^{92}$.

Priroda gašenja fluorescencije određivana je primenom jednačine (3). U slučaju OR2 i proizvoda degradacije izračunata konstanta k_q iznosi $7,62 \times 10^{11}$ odnosno $2,64 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$. S obzirom na to da su dobijene vrednosti k_q veće od $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ što predstavlja maksimalnu brzinu difuzione kolizije konstante kvenčovanja različitih kvenčera sa biopolimerima, to ukazuje da je vezivanje OR2 i degradacionih proizvoda prevashodno statičnog tipa pre nego dinamičnog (koliziono). Ovo dodatno potvrđuje interakciju boje ili proizvoda obezbojavanja sa DNA bilo formiranjem nefluorescentnog kompleksa boje ili proizvoda degradacije sa DNA bilo indirektnim putem indukovanjem strukturnih promena u DNA što rezultuje istiskivanjem EB iz EB—CT-DNA⁹².

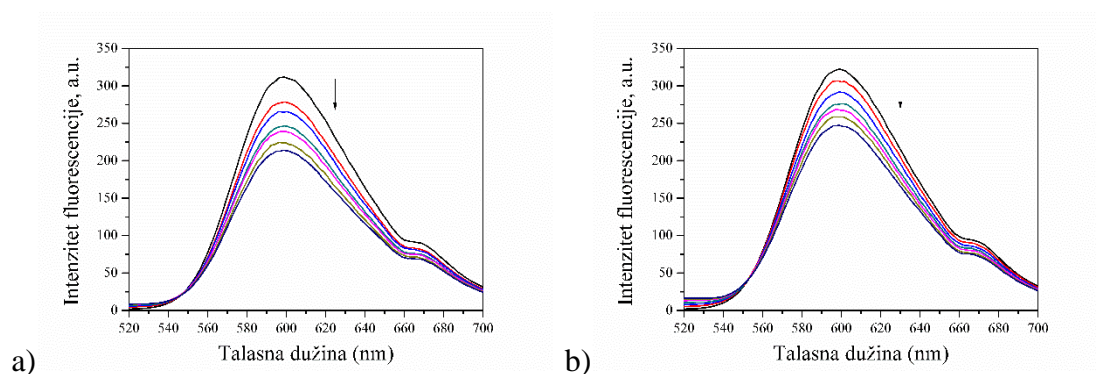


Slika 59. (a) Stern-Volmer grafik fluorescentnog gašenja kompleksa EB—CT-DNA sa OR2 (■) i proizvodima obezbojavanja (●) na $\lambda_{max}=600 \text{ nm}$; (b) Dvostruki recipročni grafik zavisnosti $1/(I_0-I)$ od $1/[Q]$ pre (■) i nakon obezbojavanja OR2 (●).

Konstante vezivanja, K_B , za OR2, pre i nakon obezbojavanja, određene su na osnovu grafika prikazanog na slici 59b primenom jednačine (5) kao $5,33 \times 10^4$ i $0,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, redom. Konstante vezivanja antrahinonskih jedinjenja sa EB—CT-DNA kompleksom su sličnog reda veličine i ukazuju da se boja jače vezuje za DNA nego proizvodi obezbojavanja HRP-om⁹³.

3.8.3.2 Ispitivanje interakcija AB sa CT-DNA fluorescentnom spektrometrijom

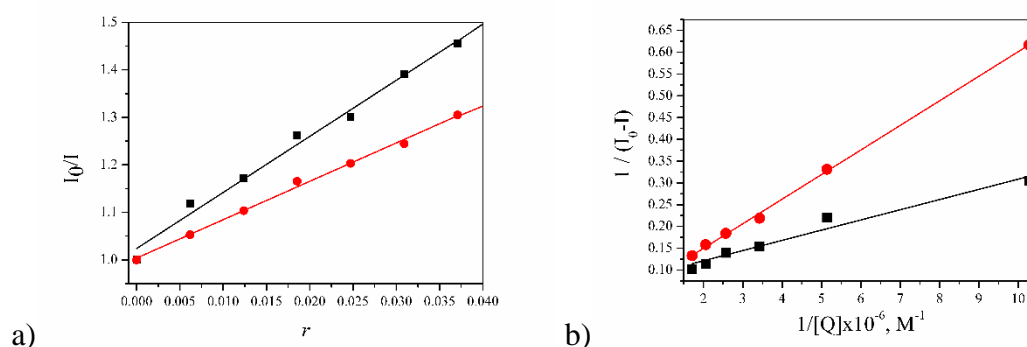
Fluorescentni spektri kompleksa EB—CT-DNA u prisustvu i odsustvu AB i proizvoda obezbojavanja prikazani su na slici 60.



Slika 60. Fluorescentni spektri EB—CT-DNA u prisustvu AB (a) i njegovih degradacionih proizvoda (b) pri različitim koncentracijama: 0, 1, 2, 3, 4, 5 i 6 μM . Koncentracije EB i CT-DNA su 25 μM i 100 μM .

Postepenim dodavanjem AB kompleksu EB—CT-DNA uočava se smanjenje intenziteta fluorescencije na 600 nm od 31% (slika 60a). Titracija kompleksa EB—CT-DNA dodavanjem proizvoda degradacije AB rezultuje smanjenjem intenziteta fluorescencije od 23% (slika 60b). Prikazani rezultati ukazuju da je interakcija degradacionih proizvoda sa DNA ili EB—CT-DNA kompleksom mnogo manje izražena nego u slučaju netretirane boje, AB.

Sa grafika prikazanog na slici 61a, primenom jednačine (2) određena je konstanta gašenja fluorescencije (K_{sv}) za AB pre i nakon obezbojavanja. Konstante su iznosile $7,50 \times 10^4$ i $5,13 \times 10^4$. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranije opisanim konstantama gašenja fluorescencije za metilensko plavo ($4,22 \times 10^4$)¹³⁷.



Slika 61. (a) Stern-Volmer grafik fluorescentnog gašenja kompleksa EB—CT-DNA sa AB (■) i proizvodima degradacije (●) na $\lambda_{max}=600$ nm; (b) Dvostruki recipročni grafik zavisnosti $1/(I_0-I)$ od $1/[Q]$ pre (■) i nakon obezbojavanja AB (●).

Prividna bimolekularna konstanta brzine kvenčovanja, k_q (jednačina (3)), pre i nakon obezbojavanja AB iznosi $7,49 \times 10^{11}$ i $5,13 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$. Takođe i u ovom slučaju dobijena vrednost za k_q ukazuje na to da je interakcija između kvenčera (boje/proizvoda obezbojavanja) i DNA rezultat statičkog procesa gašenja fluorescencije. Na osnovu dvostrukog recipročnog grafika prikazanog na slici 61b, jednačinom (5) određena je konstanta vezivanja, K_B , za AB i obezbojeni AB: $3,18 \times 10^5$ i $0,65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Promene opisane u fluorescentnim spektrima u slučaju titracije kompleksom EB—CT-DNA ispitivanim bojama i proizvodima degradacije nakon tretmana sa HRP-om rezultat su interakcija između molekula boje/proizvoda degradacije i DNA. Ovi efekti su mnogo izraženiji u slučaju boje pre, nego nakon tretmana sa HRP. Takve pojave mogu biti rezultat kompeticije ovih molekula za mesta vezivanja EB na DNA, formiranja jedinjenja ovih molekula sa EB što smanjuje vezivanje EB za DNA, formiranja novog nefluorescentnog kompleksa između ovih molekula, EB i DNA. S obzirom na to da nisu uočene promene u intenzitetu fluorescencije boje odnosno proizvoda degradacije pri dodatku EB drugi fenomen je malo verovatan. Dodavanje boje kompleksu EB—CT-DNA uzrokuje smanjenje intenziteta fluorescencije pri samom početku titracije, što dovodi do zaključka da je to rezultat kompetitivnog vezivanja za EB mesta na CT-DNA, pri čemu se gradi novi nefluorescentni kompleks između boje i DNA. Ovaj efekat je izraženiji u slučaju boje OR2 nego AB. Ovi rezultati su u korelaciji sa rezultatima dobijenim UV–Vis spektrometrijom.

Eksperimenti ukazuju na to da je u slučaju obe boje proces gašenja fluorescencije linearan, odnosno da postoji jedan način vezivanja i da je on statičnog tipa. Efekat gašenja

fluorescencije mnogo je izraženiji kod OR2 nego AB boje, a u oba slučaja se značajno smanjuje nakon obezbojavanja. Izračunate konstante vezivanja to i potvrđuju. Rezultati ukazuju da ispitivane boje inhibiraju vezivanje EB za DNA ukazujući na moguće oštećenje DNA, ali nakon tretiranja boje HRP-om ti efekti oštećenja DNA su mnogo manji.

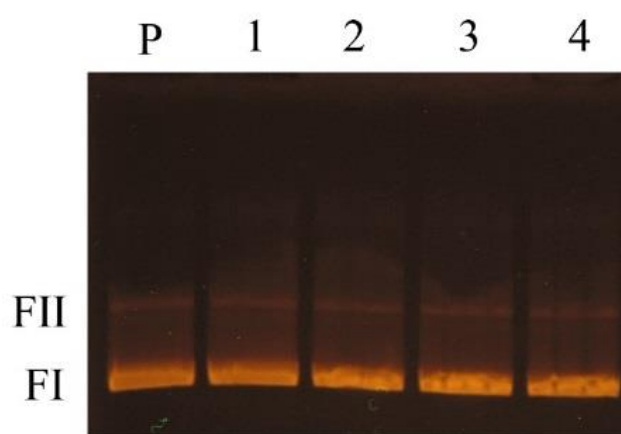
3.9 Ispitivanje interakcija plazmidne DNA sa bojama i proizvodima degradacije sa HRP-A

U nativnom, neoštećenom stanju dvolančani plazmid pUC19 zauzima kompaktnu supernamotanu konformaciju (FI). Ova konformacija odlikuje se visokom elektroforetskom pokretljivošću u agaroznom gelu. Do kovalentnih prekida na lancu bakterijskog plazmida dolazi zbog raskidanja fosfodiesterarskih veza. Narušava se tercijerna struktura plazmida, što rezultuje formiranjem otvorene cirkularne konformacije plazmida sa smanjenjom pokretljivosti na agaroznom gelu (FII). Međutim, ukoliko se ovi prekidi manifestuju na oba lanca (tzv. dvolančani prekidi) formiraće se linearna forma plazmida (FIII). Ova forma ima pokretljivost između FI i FII forme plazmida.

Analiza formi plazmida u agaroznom gelu može da pruži informaciju o prisustvu prekida lanaca i degradaciji cirkularnog molekula DNA na osnovu elektroforetskog razdvajanja različitih konformacionih formi plazmidne DNA. Stoga su interakcije plazmidne DNA sa azo-bojama i njihovim proizvodima degradacije nakon tretmana sa HRP-A ispitane na plazmidu pUC19. Izolovani i prečišćeni plazmid pU19 dobijen je transformacijom iz ćelija *E. coli* soja *XII blue* pomoću komercijalnog kita Qiagene Plasmid Plus Maxi. Čistoća i koncentracija dobijenog plazmida analizirana je UV-Vis spektrometrijom kao i agaroznom elektroforezom. Koncentracija izolovanog pUC19 iznosila je 460 ng/μL. Odnos koncentracija FI i FII forme plazmida na agaroznom gelu iznosio je 90:10.

3.9.1 Ispitivanje interakcija pUC19 sa OR2 pre i nakon obezbojavanja

Sposobnost mono azo boje, OR2, kao i njenih proizvoda nakon enzimskog obezbojavanja sa HRP-A, da izazove prekide na DNA ispitana je pomoću plazmida pUC19. Reakcione smeše pripremljene su prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2. Nakon 90 min inkubiranja reakcionih smeša sa plazmidom rezultati su analizirani elektroforetski razdvajanjem u 1% agaroznom gelu. Dobiveni elektroforegram prikazan je na slici 62.



Slika 62. Agarozna gel elektroforeza reakcionih smeša koje su se sastojale od pUC19 (460 ng μL^{-1}), HRP (0,14 U mL^{-1}), H_2O_2 (170 μM) i različitih koncentracija OR2: uzorak P - pUC19, uzorak 1 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OR2, uzorak 2 - 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OR2, uzorak 3 - proizvodi obezbojavanja 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OR2, uzorak 4 - proizvodi obezbojavanja 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OR2.

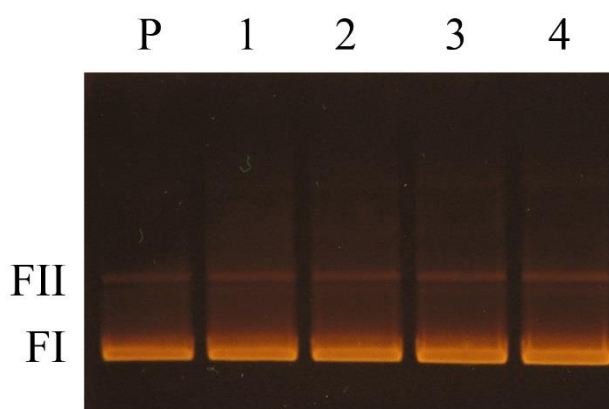
U svojoj nativnoj, neoštećenoj formi, plazmid pUC19 postoji kao kompaktno negativno naelektrisana supernamotana DNA sa velikom elektroforetskom pokretljivošću (slika 62, P). Rezultati agarozne elektroforeze ukazuju na to da ne postoji značajno cepanje molekula plazmidne DNA prilikom inkubiranja sa OR2 (slika 62, uzorak 1 i 2). Slični rezultati dobijeni su i nakon inkubiranja proizvoda enzimske degradacije OR2 sa plazmidnom DNA (slika 62, uzorak 3 i 4).

Slični rezultati dobijeni su prilikom ispitivanja efekata iradijacionog tretmana u cilju uklanjanja kiselo oranž 52 boje. Inkubiranje pBluescript plazmida sa vodonik-peroksidom nije ukazalo na prisustvo prekida bez dodatnog izlaganja UV zračenju. Tretman plazmida sa rastućim koncentracijama boje nije indukovao prekide na ispitivanom plazmidu osim u slučaju zračenja UV svetlošću. Međutim, nakon tretmana

obezbojavanja sa *Pseudomonas putida* zaostala reakciona smeša nije pokazivala genotoksičnost detektovanu ovom metodom⁶⁹.

3.9.2 Ispitivanje interakcija pUC19 sa AB pre i nakon obezbojavanja

Efekat di-azo boje AB na plazmidnu DNA ispitan je pomoću plazmida pUC19. Cepanje plazmida pUC19 ispitano je i nakon enzimskog tretmana AB boje sa HRP-A. Reakcione smeše pripremljene su prema protokolu za OR2 opisanom u prethodnom poglavlju. Dobiveni elektroforegram prikazan je na slici 63.



Slika 63. Agarozna gel elektroforeza reakcionih smeša koje su se sastojale od pUC19 (460 ng μL^{-1}), HRP (0,14 U mL^{-1}), H_2O_2 (170 μM) i različitih koncentracija AB: uzorak P - pUC19, uzorak 1 -100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AB, uzorak 2 - 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AB, uzorak 3 - proizvodi obezbojavanja 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AB, uzorak 4 - proizvodi obezbojavanja 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AB.

Sposobnost AB da izazove prekide na DNA ispitani su u prisustvu 100 i 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ boje. Karakteristične promene prelaska supernamotane FI forme u druge forme plazmida nisu uočene ni pri jednoj od testiranih koncentracija boja (slika 63, uzorak 1 i 2). Inkubiranje plazmida pUC19 sa proizvodima obezbojavanja AB nakon tretmana sa HRP-A pri različitim koncentracijama nije pokazao uočljivo cepanje molekula DNA u odnosu na nativni plazmid.

Promene na plazmidu pBR322 detektovane su nakon izlaganja plazmida uzorku otpadne vode iz okoline Mathura oblasti u Indiji usled stvaranja ROS-a nakon izlaganja DNA uzorku¹³⁸. Međutim, vrlo malo podataka se može naći u literaturi o uticaju obojenih otpadnih voda na plazmidnu DNA.

3.10 Zaključci

- Uspešno izolovanje i prečišćavanje, u zadovoljavajućem prinosu, izuzetno kiselih, anjonskih od baznih i neutralnih HRP izoformi postignuto je jonoizmenjivačkom hromatografijom na QAE-Sephadex koloni.
- Kisele HRP izoforme sastoje se iz 3 bliske izoforme sa dominantnom izoformom pI vrednosti oko 4,7.
- Uspešno je ispitana efikasnost kiselih i baznih HRP izoformi u obezbojavanju 24 boje različitih struktura i karakteristika. U slučaju 4 boje pokazana je bolja efikasnost HRP-B, dok je u slučaju 15 boja najveći stepen obezbojavanja postignut sa HRP-A. Podjednaka efikasnost obe izoforme uočena je u slučaju 5 testiranih boja.
- Optimalno pH za reakciju obezbojavanja bilo je 5 u slučaju 12 od 24 testirane boje, dok je u slučaju 10 boja najbolje obezbojavanje postignuto na pH 9.
- Efikasnost HRP izoenzima u obezbojavanju, ali i degradaciji nekih model-boja potvrđena je HPLC analizom.
- Pomoću LC—ESI-ToF-MS analize preciznije smo analizirali proizvode degradacije OR2 nakon tretmana sa HRP-A. Na osnovu dobijenih rezultata i literaturnih podataka možemo zaključiti da su 4-hidroksibenzensulfonat, 4-nitrozobenzensulfonat i pseudodimer glavni degradacioni proizvodi.
- Sintetisano je 10 imobilizata primenom HRP-A. Najveća specifična gvajakolna (2080 U g^{-1}) i dekolizaciona aktivnost (uklonjeno 175 mg L^{-1} RB boje) postignuta je sa imobilizacijom HRP-A na hitozanu.
- HH imobilizat pokazao je veću stabilnost ka visokim koncentracijama vodonik-peroksida u odnosu na rastvorni enzim.
- HH imobilizat testiran je u šaržnom reaktoru za uklanjanje 4 boje različitih struktura. Postignuto je uklanjanje preko 75% pri koncentraciji boje od 100 mg L^{-1} u slučaju 3 boje, dok je u slučaju rezistentne AO boje uklonjeno 55%.
- Ispitana je toksičnost boja i proizvoda obezbojavanja prema jedinkama *A. salina*. U svim slučajevima potvrđeno je odsustvo toksičnosti nakon izlaganja jedinki rastvoru boja nakon tretmana sa HRP.
- Potencijalni genotoksični efekti 8 obojenih ksenobiotika ispitani su pre i nakon tretmana sa HRP-A primenom komet testa na bronhijalnim epitelnim ćelijama (BEAS-2B).

- Oksidativna oštećenja DNA usled izalaganja BEAS-2B ćelija detektovana su u slučaju OR2 , ali ne i AB boje. Nakon enzimskog tretmana OR2 ovi efekti su poništeni.
- Eksperimentalni rezultati prikazani ovde ukazuju na postojanje interakcije boja i proizvoda degradacije sa DNA.
- Prilikom ispitivanja interakcija fluorescentnom spektrometrijom na 2 model boje dobijeni rezultati ukazali su na to da proizvodi degradacije imaju manji stepen kompetitivnog vezivanja sa EB za CT-DNA nego što je to slučaj sa početnim molekulom boje.
- Rezultati agarozne elektroforeze ukazuju na to da ne postoji značajno cepanje molekula plazmidne DNA prilikom inkubiranja sa bojama i proizvodima degradacije.
- Dobijeni rezultati ukazuju na to da obezbojavanje sa HRP dovodi do stvaranja netoksičnih proizvoda degradacije, što ga svakako svrstava u ekološki prihvatljiv proces tretiranja obojene otpadne vode.

4. Eksperimentalni deo

4.1 Spisak korišćene opreme

Tehnička vaga Mettler PE 3600

Analitička vaga Mettler

Centrifuga Eppendorf minifuga Model 5414S

Termostat Eppendorf Thermostat Model 5320

UV transilluminator Vilber-Lourmat France

Sistem za dokumentaciju gelova Nikon Coolpix P340

Sistem za izoelektično fokusiranje Multiphor II, Pharmacia-LKB Biotechnology

Sistem za elektroforezu Sub-Cell GTDNA Electrophoresis Cell, Bio Rad, USA

Sistem za vertikalnu elektroforezu Hoefer SE620 Ruby

Ispravljač za struju Iskra electronics

Spektrofotometar UV-1800 Shimadzu, USA

Kvarcne kivete (1 cm, Varian)

Fluorescentni spektrofotometar Lumina, Thermo Scientific

pH metar Checker sa kombinovanom elektrodom

Konduktometar WTW LF521, inoLab

Vorteks

Termostat Memert

Termostatirana mućkalica IKA KS 4000i

HPLC-MS sistem Agilend 1200, Agilend Technology kupolovan sa TOF-LC-MS sistemom za detekciju, Agilend Technologies.

HPLC sistem Dionex Ultimate 3000 opremljen sa DAD, Thermo Scientific.

Komorica za komet esej 12-Gel Comet Assay Unit™, Severn Biotech Ltd.

Horizontalni sistem za elektroforezu komet test , TS-Comet-20, Thistle Scientific.

Ispravljač za elektroforezu komet testa Consort E835, Sigma Aldrich.

Invertovani mikroskop Nikon Eclipse 1000 opremljen sa kamerom Marlin F-046B.

Countess II FL Automated Cell Counter, Thermo Fisher Scientific.

4.2 Spisak korišćenih kitova

QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit

4.3 Materijal

Peroksidaza iz rena, izolovana i prečišćena iz lokalnog uzgoja;

CT-DNA (liofilizovana, visokopolimerizovana) Serva, Heidelberg

pUC19 plazmidna DNA za transformaciju *E. Coli Xll blue*, Sigma-Aldrich, USA

Agarozna, „normal melting point“, Pharmacia-Biotech, GE Healthcare

Agarozna „low melting point“, ultra pure, Invitrogen.

Ro 19-022, La Hofman Roche.

BEAS-2B ćelije, (ATCC® CRL-9609™, normalne bronhijalne epitelne ćelije).

BEBM sa BEGM komercijalnim kit za gajenje BEAS-2B ćelija, Lonza.

PBS, Ca²⁺ i Mg²⁺ free, Gibco.

4.4 Izolovanje i prečišćavanje peroksidaze iz rena

Peroksidaza iz rena izolovana je i svežeg korena rena. Koren rena je kupljen u lokalnom supermarketu i inkubiran je na 5 °C 12 h. Oprani i oljušten ren (2 kg) homogenizovan je u LaLane's sokovniku. Homogenat (1 L) je ostavljen 1h na hladnom kako bi se istaložio škrob. Dobijeni homogenat izbistren je centrifugiran 30 min na 3500 o/min na 4 °C. Supernatant (izbistreni ekstrakt) je potom taložen amonijum-sulfatom do 40 % zasićena. Nakon centrifugiranja, bistar supernatant taložen je do 80% tnog zasićenja amonijum-sulfatom u cilju taloženja peroksidaze iz rena. Talog dobijen nakon centrifugiranja rastvoren je u minimalnoj količini 5mM natrijum fosfatnog pufera pH 7,1 i skladišten u frižideru do dalje upotrebe uz dodatak par kapi toluola.

4.4.1 Rasoljavanje preparata peroksidaze iz rena dijalizom

Uzorak je stavljen u crevo za dijalizu naspram dH₂O u hladnoj komori preko noći. Nakon centrifugiranja (30 min 11 000 o/min) uzorak je pripremljen za dijalizu naspram 5mM tris pufera pH 7,3. Uzorak je intenzivno dijalizovan, do postizanja optimalne jonske sile i pH (412 µS).

5mM Tris-HCl pufer

Tris 0,60 g

Dopuniti dejonizovanom voda do 1000 mL, podesiti pH na 7,3.

4.4.2 Jonoizmenjivačka hromatografija preparata peroksidaze na koloni QAE-Sephadex

Kolona dimenzije 2,5x10 cm napakovana je sa 100mL prethodno nabubrenog QAE Sephadex A-50 matriksom. Kolona je ekvilibrisana 5 mM Tris-HCl puferom pH 7,3 dok konduktivitet i pH na ulazu i izlazu iz kolone nije bio jednak ($\chi=415 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, pH 7,3). Celokupna količina rasoljenog sirovog ekstrakta peroksidaze iz rena (225 mL) naneta je na kolonu. Sakupljane su frakcije od 20 mL. Nevezane frakcije (HRP-B) su eluirane istim puferom (190 mL). Vezane frakcije (HRP-A) su eluirane 0,150 M NaCl (225 mL) a potom 0,5 M NaCl u startnom puferu (100 mL).

0,150 M NaCl u 5 mM Tris-HCl puferu

Tris 0,60g

NaCl 8,77 g

Dopuniti dejonizovanom voda do 1000 mL, podesiti pH na 7,3.

0,5 M NaCl u 5 mM natrijum fosfatnom puferu

NaH₂PO₄ 0,60 g

NaCl 29,3 g

Dopuniti dejonizovanom voda do 1000 mL, podesiti pH na 7,3.

4.4.3 Izoelektrično fokusiranje frakcija peroksidaze sa kolone QAE-Sephadex

Izoelektrično fokusiranje je urađeno na focusing Multiphor II sistemu za elektroforezu prema upustvu proizvođača.

Priprema 7,5 % gela

<u>Komponente</u>	<u>Zapremina (mL)</u>
Akrilamid (30 %)	3,75
Amfoliti pI 3-10, 5	0,75
Glicerol (50%)	4
Destilovana voda	6,5
Temed	12 μ L
Dezaeracija par minuta	
APS	75 μ L

Rastvor za polimerizaciju se nadsloji n-butanolom prethodno zasićenim vodom. Nakon jednog sata polimerizovanja sendvič se otvori i staklena ploča se postavi na hladnjak. Hladnjak se sa donje strane nakvasi destilovanom vodom. Ploča se postavlja tako da se tečnost ravnomerno rasporedi u obliku filma ispod ploče. Višak rastvora koji ploča istisne ukloni se papirnom vatom.

Elektrodni rastvori

Anodni elektrolit 75 mM H ₂ SO ₄	
Koncentrovana H ₂ SO ₄	1,02 mL
Dejonizovana voda do	250 mL
Katodni elektrolit 150 mM NaOH	
NaOH	0,3 g
dejonizovana voda do	50 mL

U guč bocu se stavi sveže prokuvana destilovana voda i hidroksid. Rastvor se ohladi uz dezaeraciju. Elektrodni papiri se umoče u elektrodne rastvore i prosuše u omotaču od papirne vate, skoro „do suva“. Tako pripremljene trake se stave na gel, a platinske elektrode preko njih.

Silikonskim aplikatorom se nanosi po 30 μ L nerazblaženih uzoraka.

Uslovi rada:

- Temperatura 10 °C

Fokusiranje:

<u>Faza</u>	<u>U (V)</u>	<u>I (mA)</u>	<u>P (W)</u>	<u>Vreme (min)</u>
fokusiranje	Do 1000	Do 7	7	90
kraj	Do 1200	Do 7	10	10

Nakon fokusiranja gel je korišćen za detekciju aktivnosti peroksidaze, zimogramskom detekcijom.

4.4.3.1 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

NaH₂PO₄ 6,9 g

Dopuniti dejonizovanom voda do 1000 mL, podesiti pH na 7,1.

2. Rastvor supstrata

Gvajakol 20 µL

4,41 M H₂O₂ 20 µL

50 mM Na-fosfatni pufer pH 7,5 20 mL

Rastvor se pravi neposredno pre upotrebe.

4.4.4 SDS-PAG elektroforeza**Potrebni rastvori:**1. Monomerni rastvor (30% T¹, 2,7% C)

AA	58,40 g
Bisakrilamid	1,60 g
dejonizovana voda do	200,0 mL

2. Pufer za razdvajajući gel, (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

Tris	36,30 g
dejonizovana voda do	200,0 mL
4 M HCl do	pH 8,8

3. Pufer za koncentrujući gel, (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)

Tris	6,00 g
dejonizovana voda do	100,0 mL
4 M HCl do	pH 6,8

4. Rastvor detergenta (natrijum dodecilsulfat-SDS) 10% m/V

SDS	10,00 g
dejonizovana voda do	100,0 mL

5. Inicijator (amonijum-persulfat) 10% m/V

APS	0,20 g
destilovana voda do	2,0 mL

6. Rastvor za nadslojavanje (2-butanol ili n-butanol zasićen vodom)

<i>n</i> -butanol ili 2-butanol	100,0 mL
destilovana voda	do postojanog donjeg sloja vode

¹ T je g akrilamida + bisakrilamida u 100 ml rastvora, C je g bisakrilamida u odnosu na zbirnu masu akrilamida i bisakrilamida. Obe vrednosti se izražavaju u procentima.

7. Pufer za obradu uzoraka (PUZ)

rastvori za PUZ	za 25 mL, 3X
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	9,38 mL
85 % glicerol	9,0 mL
SDS	1,5 g
0,1 % bromfenol-plavo	1,5 mL
destilovana voda do	21,25 mL
komercijalni β-merkaptoetanol	3,75 mL

8. Pufer za elektroforezu (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1% SDS pH 8,3)

komponente	1x	10x
Tris	3,0 g	30,0 g
glicin	14,4 g	144,0 g
10% SDS	10,0 mL	0,1 L
destilovana voda do	1,0 L	1,0 L

Priprema uzoraka:

40 μ l uzorka pomešano je sa 20 μ l PUZ-a i kuvano 3 min na 100°C. Umesto kuvanja moguće je uzorke ostaviti u PUZ-u na sobnoj temperaturi preko noći.

Priprema gela:

rastvori	gel za razdvajanje (10%)	gel za koncentrovanje (4%)
AA	3,33	0,66
Tris pH 8,8	2,5	-
Tris pH 6,8	-	1,25
destilovana voda	4	3
temed	0,004	0,005
dezaeracija 5-10 minuta		
SDS	0,1	0,05
APS	0,05	0,025
finalna zapremina	10,0 mL	5,0 mL

Nakon pripreme rastvor gela za razdvajanje se sipa između ploča. Površina gela se nadsloji *n*-butanolom. Kada gel polimerizuje, butanol se ispere i nalije se rastvor za koncentrujući gel. U rastvor se stavi “češalj”. Nakon polimerizacije češalj se izvadi, nastali bunari se isperu i nanose se uzorci na gel.

Pri izvođenju elektroforeze, voltaža je podešena na 80 V prilikom kretanja uzoraka kroz koncentrujući gel. Nakon ulaska uzoraka u gel za razdvajanje voltaža je podešena na 100 V. Nakon završene elektroforeze proteini na gelu se detektuju bojenjem gela.

4.4.4.1. Detekcija proteina na gelu, bojenje CBB-om

Potrebni rastvori:

1. Rastvor za bojenje, fiksiranje i obezbojavanje, fiksir (40% etanol, 10% sirćetna kiselina)

Etanol	400,0 mL
Sirćetna kiselina	100,0 mL
Destilovana voda do	1,0 L

2. Rastvor boje (0,1% CBB, 40% etanol, 10% sirćetna kiselina)

CBB G ili R 250	0,5 g
Fiksir do	500,0 mL

3. Rastvor za obezbojavanje (5% metanol, 7% sirćetna kiselina)

Metanol	50,0 mL
Sirćetna kiselina	70,0 mL
Destilovana voda do	1,0 L

Za gel debljine 1mm postupak bojenja je sledeći:

faza	rastvor	vreme (minuti)
ispiranje	destilovana voda	1
fiksiranje	1	20
bojenje	2	20
obezbojavanje	1	20
obezbojavanje	3	preko noći

4.4.5 Analiza gelova

Gelovi su nakon bojenja određenom metodom skenirani Canon CanoScan Lide 90 skeneru pri rezoluciji od 300 dpi i obrađeni u Adobe Photoshop CS6 programu

4.5 Određivanje aktivnosti HRP gvajakolom

Peroksidazna aktivnost određena je spektrometrijski pomoću gvajakola kao supstrata. Jedna jedinica peroksidazne aktivnosti izražava se kao ona količina enzima koja katalizuje konverziju 1 μmol gvajakola po minuti pri zadatim reakcionim uslovima.

Potrebni rastvori

100 mM natrijum-fosfatni pufer pH 7,0

NaH_2PO_4 13,8 g

Dopuniti dejonizovanom vodom do 1000 mL, podesiti pH na 7,0.

0,02 M gvajakol

Gvajakol 58,8 μL

destilovana voda do 24 mL

<u>0,008 M H₂O₂</u>	
4,41 M H ₂ O ₂	0,1 mL
destilovana 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 pomešaju u kivetu. Za merenje na A₄₃₆ se poništi - to je slepa proba i dalje se meri A₄₃₆ u vremenu na svakih 15 sekundi. Aktivnost peroksidaze se računa prema formuli:

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

$\Delta A/min$ - A je merena na 436nm na svakih 60 sekundi.

V_{rs}- Zapremina reakcione smeše

R-razblaženje

V_e- zapremina dodatog uzorka

4.6 Određivanje koncentracije proteina Bradford-ovom metodom

Potrebni rastvori:

1. Koncentrovana boja, *Coomassie brilliant blue* G-250 (CBB G-250)

CBB G-250	100 mg
95% etanol	50 ml
H ₃ PO ₄	100 ml
destilovana voda do	200 ml

Boja se rastvori u etanolu, pa se dodaju redom kiselina i voda do finalne zapremine.

2. *Bradford-ov reagens*

Rastvor 1	100 ml
destilovana voda do	500 mL

3. Rastvor BSA za standardnu pravu u opsegu od 0,2 do 1,5 mg/ml.

uzorak	BSA (1mg ml⁻¹) μl	destilovana voda μl	Finalna konc. μg/ml
1	10	90	100
2	20	80	200
3	40	60	400
4	60	40	600
5	80	20	800
6	100	-	1000
slepa proba	-	100	-

U 50 μl uzorka dodato je 2,5 ml Bradford-ovog reagensa i vorteksovano. Nakon 30 min izmerena je A_{595} . Koncentracija proteina određena je na osnovu standardne prave.

4.7 Poređenje efikasnosti kisele i bazne izoforme HRP u obezbojavanju

Priprema pufera:

100 mM acetatni pufer pH 3,0

Glacijalna sirćetna kiselina 5,7 mL

Dopuniti do 1000 mL dejonizovanom vodom, podesiti pH na 3 sa 1M NaOH.

100 mM acetatni pufer pH 5,0

Glacijalna sirćetna kiselina 5,7 mL

Dopuniti do 1000 mL dejonizovanom vodom, podesiti pH na 5,0 sa 1M NaOH.

100 mM bikarbonatno-karbonatni pH 9,0

NaHCO₃ 8,4 g

Dopuniti do 1000 mL dejonizovanom vodom, podesiti pH na 9,0 sa 1M NaOH.

Ispitana je zavisnost obezbojavanja kisele i bazne izoforme peroksidaze iz rena u zavisnosti od pH. Napravljen je koncentrovani rastvor boje rastvaranjem 0,2 g boje u 1L dejonizovane vode. Štok rastvor svake boje je potom razblažen u puferu odgovarajućeg pH: acetatni pufer za pH 3 i 5, fosfatni pufer za pH 7 i bikarbonatni pufer za pH 9. Karakteristični apsorpcioni maksimum svake boje (λ_{\max}) određen je snimanjem UV-vidljivog apsorpcionog spektra u opsegu od 200 do 700 nm pomoću UV-1800 Shimadzu spektrometra. Jedan mL boje odgovarajućeg razblaženja (pri $A_{\max} \sim 1$) tretiran je sa 0,14 U/mL HRP i 0,44 mM H₂O₂. Reakcija obezbojavanja katalizovana peroksidazom iz rena praćena je smanjenjem karakterističnog A_{\max} za svaku boja. Nakon 1h inkubiranja reakcione smeše u mraku rezultati dobijeni snimanjem UV-vidljivih spektara korišćeni su za izračunavanje stepena obezbojavanja pomoću sledeće jednačine:

$$\% \text{ obezbojenja} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

Gde A_0 predstavlja apsorbancu boje na specifičnoj λ_{\max} pre obezbojavanja, a A_i apsorbancu boje nakon obezbojavanja peroksidazom iz rena.

4.8 Analiza obezbojavanja HPLC-om

Reversno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (HPLC eng. *High Performance Liquid Chromatography*) kuplovana sa DAD detektorom (eng. *Diode array detektor*) primenjena je za analizu boja pre i posle obezbojavanja.

Hromatografske analize efikasnosti degradacije boja urađene su na instrumentu Dionex UltiMate 3000 sa DAD detektorom. Obrada podataka rađena je pomoću softvera Chromeleon v7.2 (ThermoFisher Scientific, Nemačka). Efikasnost degradacije boje nakon tretmana sa HRP praćena je po postizanju najvećeg stepena obezbojavanja. Uzorci su neposredno pre analize razblaženi sa acetonitrilom (AN) u odnosu 1:5, vorteksovani i centrifugirani 2 min na 14 000 o/min. Potom su uzorci filtrovani kroz 0,22 µm filter (Millipore, Irska).

Za HPLC-DAD analizu korišćena je kolona *Hypersil Gold C8* (Therm Scientific), veličina čestica 5µm i dimenzije 250 x 3mm. Eksperimentalni uslovi bili su sledeći. Kao mobilna faza A korišćen je 100 mM acetatni pufer pH 5,5, a kao mobilna faza B acetonitril. Kolona je termostatirana na 25 °C i komponente su eluirane brzinom od 0,5 mL/min. Injekciona zapremina bila je 10 µL. Gradijent elucije: 5-50% B u 9 min, 50-95% B u 2 min i 95-5% u 0.2 min. Ukupno vreme analize je bilo 25 min. Detektor je podešen za detekciju na 620 nm, 615 nm, 600 nm, 490 i 280 nm sa opcijom prikupljanjem podataka za 3D spektre (190–700 nm).

4.9 Identifikacija proizvoda obezbojavanja OR2 LC—ESI-ToF-MS

Identifikacija OR2 i proizvoda obezbojavanja posle enzimskog tretmana urađena je pomoću HPLC u kombinaciji sa masenom spektrometrijom. Uzorci su pripremljeni u 20 mM bikarbonatnom puferu pH 9,0 i filtrirani neposredno pre analize.

Analiza je urađena na instrumentu Agilent 1200 Series (Agilent Technologies) opremljenim sa Wakosil 5C 18 RS kolonom (250 mm x 4,6 mm, 5 µm čestice) u kombinaciji sa masenim spektrometrom Agilent Technologies 6210 i analizatorom vremena preleta (TOF, eng. *Time-of-flight*). Injekciona zapremina bila je 3 µL za OR2 i 10 µL za proizvode obezbojavanja. Kolona je termostatirana na 25 °C. Eluiranje je

postignuto izokratskom metodom: 90% metanol, 10 % voda pri brzina protoka 0,2 mL/min. Negativno naelektrisani joni generisani su elektrosprej jonizacijom (ESI) pri atmosferskom pritisku na sledeći način: kapilarni napon 3,0 kV, temperatura gasa 300 °C, protok gasa (N₂) od 8 L/min, pritisak u nebulajzeru 40 psi i napon fragmentora 125V. Maseni spektri prikupljeni su u opsegu m/z 50–1000. Prikupljanje i analiza podataka urađena je pomoću softvera Mass Hunter Workstation i Analyst QS.

4.10 Imobilizacija HRP-A na različitim nosačima

Uprkos svojim odličnim katalitičkim osobinama, enzimi uglavnom moraju biti pobošljani pre implementacije na industrijskoj skali. Rastvorni enzimi moraju biti imobilizovani u cilju upotrebe u velikom broju ciklusa u industrijskim reaktorima, ali takođe moraju da poseduju poboljšane katalitičke osobine (stabilnost, aktivnost, inhibiciji i dr.). Pripremljeno je 10 biokatalizatora kovalentnim vezivanjem enzima na hitozan i alginat, adsorpcijom praćenom unakrsnim umrežavanjem na neorganskom nosaču i enkapsulacijom (zarobljavanjem) u sferičnoj alginatnoj kapsuli.

4.10.1 Zarobljavanje HRP-A u kalcijum-alginatnoj kapsuli

Rastvor 2% natrijum-alginata pripremljen je rastvaranjem praha u dejonizovanoj vodi preko noći. Potom je rastvor razblažen dodatkom dejonizovane vode do finalne koncentracija 0,25% i 0,5 %. Pripremljeno je 10 mL rastvora enzima koji je sadržavao sledeće: 4 g PEG 8000, 0.2 g CaCl₂ i 1 mL HRP (16 U/mL). Smeša je dobro homogenizovana i pomoću šprica sa iglom (prečnik otvora 0,5 mm) izlivena u kapima u rastvor alginata uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon formiranja kapsula rastvor alginata je razblažen dodatkom dejonizovane vode. Kapsule su filtrirane ceđenjem kroz mrežasti filter, isprane dejonizovanom vodom i prebačene u rastvor 2% CaCl₂.

4.10.2 Imobilizacija na hitozanskim kuglicama

Hitozan (2%) je pripremljen u 2% sirćetnoj kiselini. Kuglice su formirane propuštanjem rastvora hitozana kroz špricu sa iglom (prečnika 0,5 mm) u rastvor 1 M NaOH uz konstantno mešanje. Nakon 1h kuglice su isprane dejonizovanom vodom i ekvilibrisane u 50 mM fosfatnom puferu pH 6,5. Kuglice hitozana su potom prebačene u vajlicu sa čepom i inkubirane u 1% rastvor glutaraldehida (GA). Umrežavanje kuglica odvijalo se u mraku, pri 4 h mešanja u rotacionom šejkeru od 100 o/min. Umrežene kuglice isprane su 3x puferom i prebačene u rastvor enzima (16 U/mL). Inkubiranje trajalo je 6 h pri mućkanju od 50 o/min. Imobilizati isprani su od zaostalog enzima istim puferom, a potom resuspendovani u svežem puferu i skladišteni su na 4 °C do daljne upotrebe.

4.10.3 Imobilizacija na alginatnim rezancima

Prethodno pripremljeni rastvor natrijum-alginata (2%) iskapavan je odjednom kroz iglu šprica u rastvor 2% CaCl₂ bez mešanja. Alginatni rezanci su nakon 3h inkubiranja u rastvoru CaCl₂ prebačeni u rastvor 5 mM natrijum perjodata u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5. Vreme inkubiranja alginatnih rezanaca je bilo sledeće: 10, 30, 60, 90 i 120 minuta. Reakcija aktivacije zaustavljena je prebacivanjem rezanaca u 1% glicerol u 2% CaCl₂. Nakon prekonoćnog inkubiranja, rezanci su isprani dejonizovanom vodom. HRP je imobilizovan inkubiranjem aktiviranih rezanaca u rastvoru enzima (16 U/mL) tokom 6h uz konstantno mešanje na rotacionoj mešalici (100 o/min).

4.10.4 Imobilizacija na alumijum-oksidu

HRP je imobilizovan na aluminijum-oksidi adsorpcijom. Prah aluminijum-oksida (500 mg) inkubiran je 2 h ili u rastvora enzima (2,5 mL 16 U/mL) ili u 0,3% rastvoru želatina (2,5 mL). Nevezani proteini uklonjeni su sa aluminijum-oksida dvostrukim ispiranjem dejonizovanom vodom (5 mL, 10 min). Potom su sorbenti umreženi inkubiranjem u 0,25 % GA pripremljenim u 20 mM bikarbonatnom puferu pH 8.4. Nakon

2 h sorbent je ispran dva puta u vodi i prebačeni su u rastvor želatina (sorbent prethodno inkubiran u enzimu) ili u rastvor enzima (sorbent prethodno inkubiran u rastvoru želatina). Inkubiranje trajalo je 2 h sa povremenim mešanjem.

4.10.5 Određivanje specifične aktivnosti imobilizovane peroksidaze gvajakolom kao supstratom

Specifična aktivnost imobilizovane peroksidaze određena spektrometrijski korišćenjem gvajakola kao standardnog supstrata. Reakciona smeša sadržavala je 50 mg polusuvog imobilizata, 2,9 mL 20 mM fosfatnog pufera, 0,33 mM gvajakol i 0,133 mM vodonik peroksid. Reakciona smeša inkubirana je 3 min pri mešanju od 100 o/min. Imobilizat je prikupljen centrifugiranjem od 30 sekundi pri brzini od 13 000 o/min. Formiranje tetragvajakola u supernatantu praćeno je merenjem apsorbancije na 436 nm ($\epsilon=25.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Jedna jedinica specifične peroksidazne aktivnosti imobilizovane HRP definisana je povećanjem A od 0,001 po minuti po gramu imobilizata pod datim reakcionim uslovima.

4.10.6 Specifična degradaciona aktivnost (obezbojavanje)

Degradaciona aktivnost imobilizata određena je sa bojom RB u 20 mM natrijum-acetatnom puferu pH 5, 0. Reakciona smeša sadržavala je 200 mg polusuvog imobilizata, 50 mg/L boje i 0,44 mM H_2O_2 . Kvantitativna procena stepena obezbojavanja izračunata je sledećom formulom:

$$D = \frac{A_i - A_d}{A_i} \times 100$$

gde je A_i apsorbanca boje pre početka tretmana, A_d nakon tretmana sa HRP na λ_{max} 615 nm.

4.10.7 Ispitivanje uticaja vodonik-peroksida na stepen obezbojavanja RB

Uticaj vodonik-peroksida na stepen obezbojavanja RB boje ispitan je u slučaju rastvorne i peroksidaze imobilizovane na hitozan. Rastvor boje koncentracije 50 mg/L pripremljen je u acetatnom puferu pH 5,0. U pripremljene rastvore boje doda se vodonik-peroksid do postizanja finalnih koncentracija u opsegu od 0,22 do 4,4 mM. Reakcione smeše sadržavale su ekvivalenti broj enzimskih jedinica u rastvorom i u imobilizovanom obliku.

Kontrolni ekperiment podrazumevao je određivanje stepena obezbojavanja u slučaju sledećih reakcionih smeša: rastvor boje i vodonik-peroksida, rastvor boje, vodonik-peroksida i hitozanskog nosača.

Stepen obezbojavanja praćen je spektrometrijski, a nakon 4 h određena je finalna dekolozaciona aktivnost pomoću jednačine opisane u poglavlju 4.11.6.

4.10.8 Ispitivanje stabilnosti HH imobilizata u prisustvu vodonik-peroksida

Inaktivacija peroksidaze imobilizovane na hitozanu praćena je gvajakolnim testom nakon inkubiranja u prisustvu vodonik peroksida. U prvoj seriji eksperimenata, koncentracija vodonik-peroksida je varirana u opsegu od 0 do 4,4 M pri konstantnom pH i količini biokatalizatora (50 mg). Nakon 4h biokatalizatori su odvojeni od reakcione smeše i isprani u dejonizovanom vodi u trajanju od 1 min. U drugoj seriji eksperimenata određena je zaostala enzimska aktivnost biokatalizatora testom sa gvajakolom kao što je navedeno u 4.11.5.

4.10.9 Ispitivanje uticaja hemijske strukture boje i količine boje na stepen obezbojavanja HH imobilizatom

Za ispitivanje uticaja različitih tipova boja na stepen obezbojavanja hitozanskim biokatalizatorom pripremljene su četiri vrste boja. Osnovni rastvor boje (koncentracije 200 mg L⁻¹) pripremljen je u dejonizovanoj vodi. Eksperiment obezbojavanja postavljen je u baču pri konstatnim uslovima: 50 mg polusuvog imobilizata i 0,44 mM vodonik-

peroksid. Koncentracija boje podešena je na 25 mg L^{-1} i 100 mg L^{-1} pomoću pufera razblaživanjem štok rastvora odgovarajuće boje. Reakcija obezbojavanja tekla je 4 h pri mešanju od 100 o/min. Kontrolni eksperiment adsorbovanja boje na hitozanski nosač izveden je na isti način.

Reakcija obezbojavanja praćena je spektrometrijski na specifičnim maksimalnim talasnim dužinama.

4.10.10 Određivanje operativne stabilnosti HRP-A imobilizata

Operativna stabilnost peroksidaze imobilizovane na hitozanu ispitana je na boji RB. U reaktoru zapremine 3 mL odmereno je 200 mg polu suvog biokatalizatora pri konstantni uslovima: 20 mM acetatnim puferom pH 5,0, koncentracija boje 50 mg L^{-1} i 0,44 mM H_2O_2 .

Nakon svakog ciklusa od po 4h biokatalizator je odvojen od reakcione smeše i ispran je 2x sa acetatnim puferom pH 5,0. Nakon ispiranja biokatalizator je postavljen u novu reakcionu smešu.

Količina uklonjene boje u prvom ciklusu definisana je kao 100% zaostala aktivnost imobilizata, nakon čega je posle svakog ciklusa određen stepen obezbojavanja

4.11 Procena toksičnosti prema *Artemia salina*

Suve larve *Artemia salina* postavljene su u bocu sa morskom vodom (1 L) pripremljenom prema proizvođačkom uputstvu navedenom na pakovanju veštačke morske soli (Sera marin salt, Heinsberg, Nemačka). Nakon 24–48h na sobnoj temperaturi i uslovima jake aeracije i neprekidnom osvetljavanju nejonskim izvorom svetlosti (60 W) postignuto je izleganje larvi. Larve su potom prikupljene pasterovom pipetom i prebačene u novi aerisani medijum u cilju dostizanja odgovarajućeg uzrasta (metanauplius, subklasa Branchiopoda).

Test akutne toksičnosti *A. salina* sastojao je od izlaganja larvi dejstvu boja pre i nakon tretmana sa HRP-A u periodu od 24 h. Prethodno testiranju svim uzorcima podešen je pH na oko 7 i salinitet do 3% koristeći čvrsti NaCl. Tokom izlaganja larve nisu hranjene i medijum nije aerisan. Pasterovom pipetom pažljivo je prebačeno 15 jedinki u 10 mL rastvora boje i proizvoda obezbojavanja (30 mg/L). Kao negativna kontrola korišćena je morska voda. Test je izveden u triplikatu. Nakon 24h izlaganja određen je stepen mortaliteta utvrđivanjem „imobilnosti“ jedinki pod uvećavajućom lupom odnosno ne kretanje duže od 15 sekundi.

Procenat mortaliteta izračunat je na osnovu broja preživelih jedinki u ispitivanim rastvorima i kontroli. Toksični efekat izračunat je na osnovu sledeće formule:

$$M (\%) = \frac{N_m}{N_0} \times 100$$

Gde $M(\%)$ predstavlja mortalitet jedinki u određenom vremenu izlaganja, N_m - srednju vrednost uginulih jedinki, N_0 -početni broj jedinki izloženih rastvoru.

4.12 Ispitivanje genotoksičnosti boja pre i posle obezbojavanja HRP komet testom

4.12.1 Produkcija formamidopirimidin DNA glikozilaze (FPG) fermentacijom *E.coli*

FPG je pripremljen u vidu sirovog ekstrakta hiperprodukujućeg soja *E.coli* JM105.

4.12.1.1 Dobijanje pojedinačnih kolonija

Glicerolska osnovna suspenzija bakterije soja *E. coli* JM105 koji nosi vektor pFPG230 zasejana je na LBagar podlogu sa dodatkom ampicilina (100 µg/mL) metodom išarane ploče. Petri šolje inkubirane su preko noći na 37 °C do pojave kolonija.

LB agar ploče sa ampicilinom

Tripton	10g
NaCl	10g
Ekstrakt kvasca	5g
Agar	15g

Podesiti pH na 7,2. Autoklaviranje 20 min, 121 °C.

U rastvor ohlađen na ispod 50 °C dodat je ampicilin do finalne koncentracije 100 µg mL⁻¹.

4.12.1.2 Priprema inokuluma i fermentacija

Pojedinačna kolonija *E. coli* dobijena na LBagar ploči zasejane su u 5 mL LBamp podloge i inkubirane na 37 °C i 300 o/min. Nakon 16h uzeto je po 1 mL prekonnočne kulture i presejano u erlenmajere od 500 mL sa 100 mL LBamp podloge. Kada je OD₆₀₀ ~ 1, indukovana je ekspresija dodatkom 50 µL 1M IPTG (finalna koncentracija 0,5 mM). Brzina mućkanja smanjena je na 180 o/min. Nakon 17 h fermentacija je prekinuta

centrifugiranjem na 4500 o/min 15 min na 4 °C. Dobijeni pelet je resuspendovan u PBS i korak centrifugiranja je ponovljen. Bakterijski pelet je skladišten na –80 °C.

Luria Bertani (LB) medijum

Tripton	10g
NaCl	5g
Ekstrakt kvasca	10g

Dopuniti do 1000 mL dejonizovanom vodom, podesiti pH na 7,2 sa 1 M NaOH, potom autoklavirati 20 min, 121 °C.

4.12.1.3 Izolovanje FPG-a iz bakterijskog peleta *E. Coli*

Bakterijske ćelije lizirane su sledećim postupkom. Bakterijski pelet (2g vlažne težine) resuspendovan je u 12,5 mL pufera za lizu kome je prethodno dodat lizozim (1 mg/ml).

1. Smeša je inkubirana u ledenom kupatilu 20 min;
2. Smeša je inkubirana u vodenom kupatilu na 30 °C 15min;
3. potom je stavljena u zamrzivač na –80 °C 15 min;

Korak 1–3 ponovljen je tri puta.

Dobijeni lizat centrifugiran je 30 min na 25 000 o/min. Supernatant je razblažen 20x u puferu F sa dodatkom 10% glicerola, i zamrznut na –80 °C u alikvotima od po 100 µL. Ovaj korak rađen je u ledenom kupatilu.

Aktivnost izolovanog FPG-a iz overprodukujućeg soja *E. coli* JM105 zahtevala je razblaženje od 30 000 puta, u cilju izbegavanja aktivnosti nespecifičnih nukleaza prisutnih u dobijenom preparatu.

Pufer za lizu ćelija

HEPES-KOH 50 mM

podesiti pH na 7,6 sa KOH

Na₂EDTA 1 mM

podesiti pH na 7,6

β-merkaptoetanol 5mM

Glicerol 5%

NaCl 250 mM

Pufer F

HEPES 40 mM

KCl 0.1 M

EDTA 0.5 mM

BSA 0.2 mg/mL

podesiti pH na 8,0 sa KOH.

**Pripremljeno kao 10x osnovni rastvor, zamrznuto na –20 °C.*

4.12.1.4 Određivanje aktivnosti FPG

FPG pripremljen je u vidu sirovog ekstrakta overprodukujućeg soja *E. coli* JM105. Aktivnost FPG određena je titracijom nukleoida koji sadrže 8-oksoguanin u DNA (ćelije tretirane Ro 19-022 u prisustvu svetla). Kontrolne ćelije su inkubirane u PBS-u. Određena je koncentracija FPG pri kojima je nivo DNA oštećenja nepromenjen; iznad tog nivoa dolazi do nespecifičnih DNA oštećenja. Razblaženje pri kojima je utvrđena nespecifična nukleazna aktivnost je 30 000x.

4.12.2 Gajenje BEAS-2B ćelijske kulture

Za potrebe ispitivanja endogene genotoksičnosti boja pre i posle obezbojavanja nakon polaganja ćelija u gel korišćena je komercijalno dostupna ćelijska linija BEAS-2B. Ćelije su gajene u sudovima i medijumima u skladu sa specifičnim zahtevima upotrebljene ćelijske linije, a prema uputstvu proizvođača. Kulture ćelija uzgajene su u

potrebnoj količini za svaki pojedinačni test. Eksperimentalne i kontrolne grupe sejane su u duplikatu.

Hemikalije i medijumi upotrebljene za gajenje ćelijske kulture su komercijalnog tipa i *pro analysi*, osim ukoliko nije drugačije navedeno.

4.12.2.1 Sejanje i uzgajanje ćelija

Ćelijska linija BEAS-2B (ATCC® CRL-9609, normalne bronhijalne epitelne ćelije) koje rastu u jednom sloju zalepljene za podlogu (adherentne ćelije) kultivisane su u kompletnom medijumu BEBM sa BEGM komercijalnim kitom. Ćelijska kultura gajena je u flakonima površine 25 cm² sa 5 mL kompletnog hranljivog medijuma. Kultura je inkubirana u mraku na 37 °C u atmosferi 5% CO₂. Ćelije su pažljivo praćene svetlosnim mikroskopom i pasažirane po dostizanju 80% kofluentnosti.

4.12.2.2 Sakupljanje i priprema ćelija za testiranje

Suspenzija adherentnih ćelija dobijana je na sledeći način. Ćelije su isprane od ostatka medijuma dodatkom PBS-a (5 mL) i kolektovane enzimski pomoću rastvora tripsina (0,25% tripsin–EDTA 0,53 mM sa 0,5% polivinilpirolidonom, Gibco). Ćelije su inkubirane 2-3 min an 37 °C radi lakšeg i bržeg odvajanja od podloge. Enzimska reakcija zaustavljena je dodavanjem svežeg medijuma (5 mL) i centrifugiranjem 5 min na 125 x g. Talog ćelija resuspendovan je u 5 mL svežeg medijuma. Ćelije su sakupljane u logaritamskoj fazi rasta, medijum je menjan na svaka 2–3 dana, dok su ćelije pasažirane 3 puta nedeljno (1500–3000 ćelija/cm²).

4.12.2.3 Određivanje vijabilnosti i broja ćelija

Vijabilnost i broj ćelija proveravana je pomoću DET testa (*eng.* DET - trypan blue Dye Exclusion Test) i Countess™ automatskog brojača (Invitrogen). U svim eksperimentima korišćene su ćelije vijabilnosti veće od 90%.

4.12.3 Obezbojavanje AB i OR2

Boje u prahu, AB i OR2, rastvorene su dejonizovanoj vodi a potom razblažene u 20 mM bikarbonatnom puferu pH 9 ili 20 mM fosfatnom puferu pH 7. Rastvor boje (300 µg/mL) inkubiran je sa 20 µL 3 U/mL HRP-A i 170 µM H₂O₂. Reakciona smeša inkubirana je 1h na 25 °C u mraku. Pre tretiranja ćelija i analize komet testom, proizvodi obezbojavanja tretirani su sa 3 U/mL katalaze u cilju uklanjanja zaostalog vodonik peroksida.

4.12.4 Tretman ćelija bojama i proizvodima obezbojavanja i komet test

1% NMP agaroza

Agaroza,	1 g	
destilovana voda		99 mL

1% LMP agaroza

Agaroza	0,1 g
1x PBS	9,9 mL

Rastvor za lizu

NaCl	146,6 g
EDTA	37,2 g
Tris	1,21 g
Triton X-100*	1%

*Dopuniti do 1000 mL dejonizovanom vodom, podesiti pH na 10,0.
Neposredno pre svake upotrebe dodati Triton X-100.*

Alkalni rastvor za denaturaciju i elektroforezu

NaOH	12 g
EDTA	0,37 g

Dopuniti do 1000 mL dejonizovanom vodom. Ne podešavati pH.

PBS za neutralizaciju (10x)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g

Dopuniti do 1000 mL sterilnom dejonizovanom vodom, podesiti pH na 7,4.

PBS za neutralizaciju (1x)

10x PBS	100 mL
---------	--------

destilovana voda (sterilna) 900 mL

Rastvor vodonik-peroksida

Rastvor vodonik-peroksida, 100 μ M, za tretman pozitivne kontrole pripreman je razblaživanjem u 1x PBS od početnog 4,4M rastvora vodonik-peroksida neposredno pre upotrebe.

Tretman ćelija i komet test rađen je u komorici za „medium-throughput“ komet test. Primjenjen je format of 12 mini gelova (u formatu 2 x 6 mini gelova) na jednoj mikroskopskoj pločici. Mikroskopske pločice prethodno su pripremljene za komet test presvlačenjem sa 1% NMP agarozom (*eng.* normal melting agarose). Koncentracija ćelija podešena je PBS na 2.5×10^5 ćelija/mL i pomešana sa 1% LMP agarozom (*eng.* low melting-point agarose) (Invitrogen). Finalna koncentracija agaroze bila je 0.8%. Dvanaest kapljica (5 μ L) suspenzije agaroze i ćelija iskapano je na mikroskopsku pločicu koristeći templat na metalnoj bazi komorice za komet test. Nakon očvršćavanja gelova mikroskopska pločica pokrivena je silikonskim kalupom i pričvršćena za metalnu bazu. Svaki od 12 bunar u komorici inkubiran je sa po 30 μ l rastvora boje/proizvoda obezbojavanja u koncentracijama od 0, 3, 10, 30, 100 ili 300 μ g/mL nakon čega je komorica zatvorena parafilmom. Ista procedura ponovljena je i za proizvode obezbojavanja. Kontrolne ćelije tretirane su sa PBS (negativna kontrola) i 100 μ M H₂O₂ (pozitivna kontrola). Nakon 30 min gelovi su isprani 2x sa PBS po 5 min i stavljeni u rastvor za lizu 1h na 4° C. Uzorci su denaturisani potapanjem u rastvor za elektroforezu 20 min na 4° u horizontalnoj kadici za elektroforezu specijalno dizajniranoj za komet test. Elektroforeza je trajala 30 min pri voltažnom gradijentu od 1V/cm temperaturi od 4° C. Uzorci su neutralizovani inkubiranjem u PBS (10 min), fiksirani potapanjem u 70% etanol (10 min) i potapanjem u apsolutni etanol (10 min). Uzorci su potom ostavljeni preko noći da se osuše na vazduhu i skladišteni u mikroskopske kutije do dalje upotrebe.

4.12.5 Enzimski tretman uzoraka sa FPG-om

Nakon inkubiranja ćelija (30 μ L 2.5×10^5 ćelija/mL) u mini gelu sa reakcionim smešama boja pre i posle obezbojavanja, mikroskopske pločice isprane su 3 puta po 5 min u puferu F na 4°C. U međuvremenu pripremljeno je potrebno razblaženje FPG. Po

jednom uzorku pripremljene su tri identične mikroskopske pločice: kontrola za pufer F, kontrola za FPG i uzorak tretiran FPG. Enzimski tretman rađen je u komorici sa 12 gelova dodavanjem 30 μL hladnog pufera F ili rastvora enzima (FPG). Uzorci su inkubirani 30 min na 37 °C. Enzimska reakcija zaustavljena je potapanjem pločica u alkalni rastvor za elektroforezu.

4.12.6 Bojenje i analiza kometa

Rastvor SYBR Gold

SYBR Gold 10 000x	50 μL
DMSO	450 μL

Alikvotirati po 20 μL , zamrznuti na -20 °C. Rastvoriti 1 alikvot u 25 mL TE pufera.

TE pufer

Tris	0,121 g
EDTA	0,037 g

Dopuniti do 100 mL dejonizovanom vodom, podesiti pH na 8,0.

DNA je vizuelizovana potapanjem pločica u rastvor boje SYBR Gold pripremljenim prema upustu proizvođača (Invitrogen). Obojene mikroskopske pločice su nakon 30 min isprane dva puta sa dejonizovanom vodom i ostavljene u mraku da se osuše. Pre analize kometa mini gelovi su rehidratirani sa kapljicom dejonizovane vode i stavljeno je pokrovno staklo (24x60 mm). Pod invertnim fluorescentnim mikroskopom (Nikon, Eclipse 1000) analizirane su komete uz pomoć Comet Assay IV softvera (Perceptive Instruments). Rezultati su prikazani u vidu % oštećenja DNA (izraženog kao % DNA u repu komete). Po svakom minigelu analizirano je minimalno 50 kometa.

4.12.7 Statistička analiza rezultata komet testa

Svi eksperimenti genotoksičnosti ponovljeni su u triplikatu. Procenat DNA u repu komete za svaki minigel predstavljen je medianom. Potom je izračunata srednja vrednost dve medijane po jednom uzorku. Finalni rezultati dobijeni komet testom analizirani su pomoću Microsoft Excell softvera primenom One-way ili two-way analize varijanse (ANOVA) praćene Tukey-Kramer testom. Statistička analiza rađena je prema negativnoj kontroli.

4.13. Interakcije boja i proizvoda obezbojavanja sa CT-DNA UV-Vis spektrometrijom

UV-vidljivi apsorpcioni spektri boje i boje u prisustvu DNA iz telećeg timusa (CT-DNA) snimljeni su u prisustvu i odustvu HRP i H₂O₂. Spektri su snimani na UV-1800 Shimadzu spektrometru u opsegu od 200 do 800 nm u 1,0 cm kvarcnoj kiveti. Apsorpciona titracija pripremljena je pri fiksnoj koncentraciji boje pre i posle obezbojavanja pri različitim finalnim koncentracijama CT-DNA (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 i 160 µM). Reakciona smeša inkubirana je 90 min na 37 °C nakon čega su snimani apsorpcioni spektri prema odgovarajućoj slepoj probi.

4.14 Interakcije boja i proizvoda obezbojavanja sa CT-DNA fluorescentnom spektrometrijom

40mM bikarbonatni pufer pH 8,4

Na₂CO₃ 0,336g

Dopuniti do 100 mL dejonizovanom vodom.

Rastvor etidijum bromida

1% Etidijum Bromid u destilovanoj vodi.

Testom kompetitivne izmene fluorescentne probe (etidijum bromid, EB) iz kompleksa formiranog sa lineranom visokomolekulskom DNA (CT-DNA) praćena je interakcija boja i proizvoda obezbojavanja sa DNA. Etidijum bromid (25 µM) inkubiran je sa CT-DNA (100 µM) u 40 mM bikarbonatnom puferu pH 8,4 15 min u mraku na 25 °C u cilju formiranja kompleksa EB—DNA. Promene u fluorescentnim spektrima kompleksa EB-DNA praćene su nakon postepenog dodavanja boje ili proizvoda degradacije od po 2 µL.

Sva merenja urađena su na fluorescentnom spektrometru Lumina (Thermo Scientific, Finska) opremljenim sa 150 W ksenonskom lampom pri fiksnim otvorom proreza ekscitacionog i emisionog zraka od 10 nm. Ekscitacija je postignuta pri 500 nm a emisioni spektri snimani su od 520-700 nm.

Podaci dobijeni nakon snimanja fluorescentnih spektara analizirani su primenom jednačina (1), (2), (3), (4) i (5) opisanih u poglavlju 2.4.1.2.

4.15 Ispitivanje interakcija boja i proizvoda obezbojavanja sa plazmidnom DNA

4.15.1 Gajenje i izolovanje plazmida pUC19 iz *XLI blue* soja *E. coli*

Potrebni rastvori:

LB medijum

Tripton	10 g
NaCl	5 g
Ekstrakta kvasca	5 g

Dopuniti do 1000 mL dejonizovanom vodom, podesiti pH na 7,2 sa 1M NaOH.

Bakterije iz pojedinačne kolonije *E.coli* soja *XLI blue* zasejane su u 5 mL tečnog LB-a sa tetraciklinom (12,5 µg mL⁻¹). Inkubirano je na 37°C i 150 rpm 1h u termostatiranoj mućkalici.

4.15.1.1 Priprema hemijski kompetentnih ćelija pomoću CaCl₂¹³⁹

Potreban rastvor:

CaCl ₂	6,6g
Tris	1,21g
Glicerol	150g

Dopuniti do 1000 mL dejonizovanom vodom, podesiti pH na 7,2 sa 1 M NaOH

1. Inokulisano je 150 mL LB podloge sa 5 mL kulture *E. coli* soj *XLI blue*. Inkubirano je na 37°C i 150 rpm do optičke gustine, OD₆₀₀=0,45 u termostatiranoj mućkalici.
2. Fermentaciona tečnost je centrifugirana 10 minuta na 3000 rpm. Odbačen je supernatant i pelet je resuspendovan u 10 mL ledeno hladnog rastvora CaCl₂. Postupci

centrifugiranja, odbacivanja supernatanta i resuspendovanja peleta su ponovljeni i sve vreme pelet je inkubiran na ledu;

3. Nakon poslednjeg ispiranja u CaCl_2 , pelet je inkubiran 30 minuta na ledu;
4. Pelet je centrifugiran 10 min na 3000 rpm. Odbačen je supernatant i talog je resuspendovan u 2 mL ledeno hladnog rastvora CaCl_2 ;
5. Alikvoti od 50 μL su otpipetirani u prethodno ohlađene i sterilne ependorfe i odmah zamrznuti na -70°C .

4.15.1.2 Hemijska transformacija kompetentnih *E. coli* XL1 blue ćelija sa plazmidom pUC19

1. U 50 μL pripremljenih kompetentnih ćelija na ledu dodato je 1 μL pUC19 10 ng/ μL .
2. Smeša je inkubirana 10 minuta na ledu;
3. Smeša je inkubirana u vodenom kupatilu na 42°C u trajanju od 1 minut;
4. a zatim u ledenom kupatilu 5 minuta;
5. Dodato je 1 mL LB medijuma, prethodno zagrejanog na 37°C . Transformaciona smeša je inkubirana 45 min na 37°C u termostatu;
6. Fermentaciona tečnost je centrifugirana 5 minuta na 3000 rpm;
7. Uklonjeno je 900 μL supernatanta i ostatak medijuma sa resuspendovanim ćelijama je nanet na sredinu Petrijeve šolje sa LB podlogom sa tetraciklinom ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) i ampicilinom ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) i pomoću staklene eze utrljan u podlogu;
8. Inkubiranje Petrijeve šolje sa transformatima preko noći na 37°C u termostatu do pojave kolonija.

Ezom je zagrebana pojedinačna kolonija i bakterije su prebačene sa Petrijeve šolje u epruvetu sa 5 mL tečnog LB-a sa tetraciklinom ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) i ampicilinom ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), prethodno zagrejanim na 37°C . Inkubirano je na 37°C i 200 rpm u termostatiranoj mućkalici do postizanja $\text{OD}_{600}=0,603$. Zatim je 100 μL inokuluma, prebačeno u 100 mL tečne LB podloge sa tetraciklinom ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) i ampicilinom ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Bakterijske kulture su gajene na 37°C i 200 rpm u termostatiranoj mućkalici do postizanja $\text{OD}_{600}=0,538$. Fermentacione tečnosti su centrifugirane su 30 min na 11 000 o/min, nakon čega je pelet zamrznut na -20°C .

4.15.1.3 Izolovanje plazmida pUC19

Plazmid pUC19 je izolovan i i prečišćen pomoću komercijalnog kita (Qiagene Plasmid plus Maxi Kit) na sledeći način:

1. Resuspendovati pelet u 8 mL pufera P1;
2. Dodato je 8 mL pufera P2, promešano dok lizat nije postano viskozan. Inkubirano na sobnoj temperaturi 3 minuta;
3. Dodato je 8 mL pufera S3 lizatu i promešano 4-6 puta. Inkubirano je na ST 10 minuta bez mešanja;
4. Precipitat je odvojen od bistrog rastvora filtriranjem kroz u QIA filter;
5. Bistrom lizatu dodato je 5 mL BB pufera i promešano je 4- 6 puta;
6. Lizat je propušten kroz Qiagene Plasmid Plus kolonu pod vakuumom;
7. Kolonica je isprana sa 0,7 mL ETR rastvora, a potom i sa 0,7 mL pufera PE;
8. DNA je eluirana sa 0,4 mL pufera EB;

4.15.2 Agarozna gel elektroforeza plazmidne DNA

Priprema pufera

20 mM Tris pufer pH 7,9

Tris 2,42 g

Dopuniti do 1000 mL dejonizovanom vodom, podesiti pH na 7,9 sa 1 M HCl.

25 X TAE pufer

Glacijalna sirćetna kiselina 7,13 mL

Tris 30,25 g

0,5 M EDTA pH 8,0 12,5 mL

Dopuniti do 250 mL dejonizovanom vodom.

1 X TAE pufer

25 X TAE 4 mL

Dopuniti do 100 mL dejonizovanom vodom.

Rastvor boje

Bromfenol plavo 10 mg

Ksilen-cijanol 10 mg

Glicerol (88%) 10 mL

Rastvor etidijum-bromida

Etidijum-bromid (10 %) 3 μ L
1x TAE do 30 mL

Priprema gela

Agarozna (agarozna za analizu fragmenata DNA molekulske mase manje od 1000 bp “low melting/geling agarose” temperature očvršćavanja 35,5 °C) je pripremljena kuvanjem u 1xTAE do potpunog rastvaranja u mikrotalasnoj rerni (25 mL 1 X TAE i 0,25 g agarozna). Kada je rastvor ohlađen na oko 60 °C naliven je u kalup sa prethodno postavljenim češljevima i ostavljen da očvrstne. Kada je gel očvrstnuo, kalup je postavljen u kadicu za horizontalnu elektroforezu (Sub-Cell GTDNA Electrophoresis Cell, Bio Rad, USA). Kada je kalup sa gelom za elektroforezu postavljen u kadicu za elektroforezu je naliven 1xTAE pufer i uzorci kojima je dodato 5 μ L rastvora boje su naneti ispod pufera.

4.15.3 Priprema uzoraka nakon prethodne termalne denaturacije i renaturacije plazmidne DNA

Reakcione smeše ukupne zapremina 20 μ L sastojale su se od 460 ng μ L⁻¹ plazmida pUC19. Uzorci su pripremani prema dole prikazanim shemama i inkubirani su 90 min na 37 °C sa povremenim vorteksovanjem. Reakcione smeše su analizirane elektroforetski na 1% agaroznom gelu. Elektroforeza u trajanju od 40 min pri struji od 80 V praćena je 20 minutnim inkubiranjem gela u 10% rastvoru etidijum-bromida u cilju vizuelizacije DNA. Nakon ispiranja gela 3 x dejonizovanom vodom u trajanju od 5 min trake na gelu su vizuelizovane izlaganjem UV svetlu od 312 nm.

Za eksperimente korišćen je rastvor boje 1 mg mL⁻¹. Boje su tretirane sa HRP-A u prisustvu H₂O₂ prema protokolu opisanim u poglavlju 4.13.5. Postignuto je 95% obezbojavanje.

Koncentracije boje, proizvoda obezbojavanja i plazmida varirani su prema sledećoj šemi:

Plazmid	Boja	Proizvod obezbojavanja	Bikarbonatni pufer
5 μ L	-	-	15 μ L
5 μ L	2 μ L 1 mg mL ⁻¹	-	13 μ L
5 μ L	6 μ L 1 mg mL ⁻¹	-	9 μ L
5 μ L	-	2 μ L 1 mg mL ⁻¹	13 μ L
5 μ L	-	6 μ L 1 mg mL ⁻¹	9 μ L

5.Literatura

1. Hiner, A. N. P., Hernández-Ruiz, J., Rodríguez-López, J. N., Arnao, M. B., Varón, R., García-Cánovas, F. & Acosta, M. The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: An example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 504–516 (2001).
2. Regalado, C., García-Almendárez, B. E. & Duarte-Vázquez, M. a. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* **3**, 243–256 (2004).
3. Ghaly, A., Ananthashankar, R., Alhattab, M. & Ramakrishnan, V. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. *J. Chem. Eng. Process Technol.* **05**, 1–18 (2013).
4. Husain, Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: A review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **9**, 117–140 (2010).
5. Doerge, D. R., Divi, R. L. & Churchwell, M. I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Anal. Biochem.* **250**, 10–17 (1997).
6. Azevedo, A. M., Martins, V. C., Prazeres, D. M. F., Vojinovic, V., Cabral, J. M. S. & Fonseca, L. P. Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* **9**, 199–247 (2003).
7. Veitch, N. C. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**, 249–259 (2004).
8. Zamocky, M. & Obinger, C. Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. in *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts* 7–35 (2010). doi:10.1007/978-3-642-12627-7
9. Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L. & Dunand, C. PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry* **68**, 1605–1611 (2007).
10. Krainer, F. W. & Glieder, A. An updated view on horseradish peroxidases:

-
- recombinant production and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1611–1625 (2015).
11. Shannon, M. L., Kay, E. & Lew, Y. J. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. *J. Biol. Chem.* **241**, 2166–2172 (1966).
 12. Aibara, S., Kobayashi, T. & Morita, Y. Isolation and Properties Peroxidase of Basic Isoenzymes of Horseradish. *J. Biochem.* **90**, 489–496 (1981).
 13. Nicell, J. A. & Wright, H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 302–310 (1997).
 14. Strickland, E. H., Kay, E., Shannon, M. L. & Horwitz, J. Peroxidase Isozyme from Horseradish roots III. 3560–3565 (1968).
 15. Shih, H. J., Shannon, M. L., Key, E. & Lew, J. Y. Peroxidase Isoenzyme from Horseradish roots IV. **246**, 4546–4551 (1971).
 16. Hoyle, M. C. High Resolution of Peroxidase-Indoleacetic Acid Oxidase Isoenzymes from Horseradish by Isoelectric Focusing. *Plant Physiol* **60**, 787–793 (1977).
 17. Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, a, Smith, a T. & Poulos, T. L. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 1032–1038 (1997).
 18. Chattopadhyay, K. & Mazumdar, S. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: Effect of temperature and pH. *Biochemistry* **39**, 263–270 (2000).
 19. Krainer, F. W. & Glieder, A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1611–1625 (2015).
 20. Dunford, H. B. *Heme Peroxidases*. (John Wiley and Sons, 1999).
 21. Guzik, U., Hupert-Kocurek, K. & Wojcieszynska, D. Immobilization as a Strategy for Improving Enzyme Properties-Application to Oxidoreductases. *Molecules* **19**, 8995–9018 (2014).
 22. Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A. & Hajdu, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* **417**, 463–468 (2002).
 23. Marklund, S., Ohlsson, P., Opara, A. & Paul, K. The substrate profiles of the
-

- acidic and slightly basic horseradish peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **350**, 304–313 (1974).
24. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451–1463 (2007).
 25. Brady, D. & Jordaan, J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1639–1650 (2009).
 26. Sheldon, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1289–1307 (2007).
 27. Spahn, C. & Minteer, S. D. Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents Eng.* **2**, 195–200 (2008).
 28. Hanefeld, U., Gardossi, L. & Magner, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 453–468 (2009).
 29. Pramparo, L., Stüber, 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**, 990–1000 (2010).
 30. Eş, I., Vieira, J. D. G. & Amaral, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2065–82 (2015).
 31. Datta, S., Christena, L. R. & Rajaram, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 1–9 (2012). doi:10.1007/s13205-012-0071-7
 32. Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1289–1307 (2007).
 33. Nigam, S. C., Tsao, I. F., Sakoda, A. & Wang, H. Y. Techniques for preparing hydrogel membrane capsules. *Biotechnol. Tech.* **2**, 271–276 (1988).
 34. Shukla, S. P., Modi, K., Ghosh, P. K. & Devi, S. Immobilization of horseradish peroxidase by entrapment in natural polysaccharide. *J. Appl. Polym. Sci.* **91**, 2063–2071 (2004).
 35. Koyama, K. & Seki, M. Cultivation of yeast and plant cells entrapped in the low-viscous liquid-core of an alginate membrane capsule prepared using polyethylene glycol. *J. Biosci. Bioeng.* **97**, 111–118 (2004).

-
36. Paul, W. & Sharma, C. P. Chitosan, a drug carrier for the 21st century: A review. *S.T.P. Pharma Sci.* **10**, 5–22 (2000).
 37. Uzun, I. Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitosan. *Dye Pigm.* **70**, 76–83 (2006).
 38. Dzionek, A., Wojcieszynska, D. & Guzik, U. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electron. J. Biotechnol.* **23**, 28–36 (2016).
 39. Zucca, P. & Sanjust, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules* **19**, 14139–14194 (2014).
 40. Vallés, D., Furtado, S., Villadóniga, C. & Cantera, A. M. B. Adsorption onto alumina and stabilization of cysteine proteinases from crude extract of *Solanum granulosum-leprosum* fruits. *Process Biochem.* **46**, 592–598 (2011).
 41. Gómez, J. L., Bódalo, A., Gómez, E., Bastida, J., Hidalgo, A. M. & Gómez, M. Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 1016–1022 (2006).
 42. Cheng, J., Ming Yu, S. & Zuo, P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Res.* **40**, 283–290 (2006).
 43. Pradeep, N. V & Hampannavar, U. S. Polymerization of Phenol using Free and Immobilized Horseradish Peroxidase. *J. Environ. Earth Sci.* **2**, 31–37 (2012).
 44. Akhtar, S., Khan, A. A. & 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**, 291–301 (2005).
 45. Mohan, S. V., Prasad, K. K., Rao, N. C. & Sarma, P. N. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere* **58**, 1097–1105 (2005).
 46. Gholami-Borujeni, F., Mahvi, A. H., Naseri, S., Faramarzi, M. A., Nabizadeh, R. & Alimohammadi, M. Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution. *Res. J. Chem. Environ.* **15**, 217–222 (2011).
 47. Karim, Z., Adnan, R. & Husain, Q. A β -cyclodextrin-chitosan complex as the immobilization matrix for horseradish peroxidase and its application for the
-

- removal of azo dyes from textile effluent. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **72**, 10–17 (2012).
48. Arslan, M. Immobilization horseradish peroxidase on amine-functionalized glycidyl methacrylate-g-poly(ethylene terephthalate) fibers for use in azo dye decolorization. *Polym. Bull.* **66**, 865–879 (2011).
49. Celebi, M., Kaya, M. A., Altikatoglu, M. & Yildirim, H. Enzymatic decolorization of anthraquinone and diazo dyes using horseradish peroxidase enzyme immobilized onto various polysulfone supports. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**, 716–730 (2013).
50. Shaffiqu, T. S., Roy, J., Nair, R. A. & Abraham, T. E. Degradation of Textile Dyes Mediated by Plant Peroxidases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **102–103**, 315–326 (2002).
51. Travis, A. S. Perkin's Mauve : Ancestor of the Organic Chemical Industry Technology Stable. *Technol. Cult.* **31**, 51–82 (1990).
52. Broadbent, A. D. *Basic principles of textile coloration. Society of Dyers and Colourists* (2001). doi:10.1002/col.10152
53. Rivlin, J. *The dyeing of textile fibers: theory and practice.* (Joseph Rivlin, Philadelphia, Pennsylvania, United States, 1992).
54. Gürses, A., Açıkyıldız, M., Güneş, K. & Gürses, M. S. *Dyes and Pigments. SpringerBriefs in Molecular Science* (2016). doi:10.1007/978-3-319-33892-7
55. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans* **93**, 9–38 (2010).
56. Hunger, K. *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications. Wiley-VCH* (2003). doi:10.1021/ja0335418
57. Zaharia, C. & Suteu, D. Textile Organic Dyes – Characteristics , Polluting Effects and Separation / Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview. *Org. Pollut. ten years after Stock. Conv. - Environ. Anal. Updat.* 55–86 (2010). doi:10.5772/32373
58. Chinta, S. K. & Vijaykumar, S. Technical Facts & Figures of Reactive Dyes Used in Textiles. *Int. J. Eng. Manag. Sci.* **4**, 308–312 (2013).
59. Society of Dyers and Colourists. Introduction to the Colour Index : Classification

-
- System and Terminology. 1–8 (2013).
60. Donner, E., Eriksson, E., Holten-Lutzhoft, H.-C., Scholes, L., Revitt, M. & Ledin, A. Xenobiotics in the Urban Water Cycle. **16**, 213–226 (2010).
 61. Khandare, R. V. & Govindwar, S. P. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1697–1714 (2015).
 62. Rawat, D., Mishra, V. & Sharma, R. S. Detoxification of azo dyes in the context of environmental processes. *Chemosphere* **155**, 591–605 (2016).
 63. Jamal, F. Functional Suitability of Soluble Peroxidases from Easily Available Plant Sources in Decolorization of Synthetic Dyes. in *Advances in Treating Textile effluent* (ed. Prof. Hauser, P.) 154 (InTech, 2011). doi:10.5772/1039
 64. Slokar, Y. M. & Majcen Le Marechal, A. Methods of decoloration of textile wastewaters. *Dye Pigm.* **37**, 335–356 (1998).
 65. Forgacs, E., Cserhti, T. & Oros, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environ. Int.* **30**, 953–971 (2004).
 66. Pinheiro, H. M., Touraud, E. & Thomas, O. Aromatic amines from azo dye reduction: Status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dye Pigm.* **61**, 121–139 (2004).
 67. Telke, A. A., Kalyani, D. C., Dawkar, V. V. & Govindwar, S. P. Influence of organic and inorganic compounds on oxidoreductive decolorization of sulfonated azo dye C.I. Reactive Orange 16. *J. Hazard. Mater.* **172**, 298–309 (2009).
 68. Maria, F., Chequer, D., Dorta, D. J. & Oliveira, D. P. De. Azo Dyes and Their Metabolites : Does the Discharge of the Azo Dye into Water Bodies Represent Human and Ecological Risks ? *Adv. Treat. Text. Effl.* 27–48 (2011). doi:10.5772/19872
 69. Ben Mansour, H., Barillier, D., Corroler, D., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. & Mosrati, R. In vitro study of DNA damage induced by acid orange 52 and its biodegradation derivatives. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**, 489–495 (2009).
 70. Schneider, K., Hafner, C. & Jäger, I. Mutagenicity of textile dye products. *J. Appl. Toxicol.* **24**, 83–91 (2004).
 71. Phugare, S. S., Kalyani, D. C., Surwase, S. N. & Jadhav, J. P. Ecofriendly degradation, decolorization and detoxification of textile effluent by a developed
-

- bacterial consortium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 1288–1296 (2011).
72. Leme, D. M., de Oliveira, G. A. R., Meireles, G., dos Santos, T. C., Zanoni, M. V. B. & de Oliveira, D. P. Genotoxicological assessment of two reactive dyes extracted from cotton fibres using artificial sweat. *Toxicol In Vitro.* **28**, 31–38 (2014).
73. Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M. & Pinelli, E. Heavy-Metal-Induced Reactive Oxygen Species: Phytotoxicity and Physicochemical Changes in Plants. in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 232* (ed. Whitacre, D. M.) 144 (Springer International Publishing, 2014). doi:10.1007/978-3-319-06746-9
74. Sangeetha Gowda, K. R., Mathew, B. B., Sudhamani, C. N. & Naik, H. S. B. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomed. Biotechnol.* **2**, 1–9 (2014).
75. Gates, K. S. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: Spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1747–1760 (2009).
76. Cadet, J., Douki, T. & Ravanat, J. L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 9–21 (2010).
77. Azqueta, A. & Collins, A. R. The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* **87**, 949–968 (2013).
78. Azqueta, A., Arbillaga, L., Lopez De Cerain, A. & Collins, A. Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis* **28**, 271–277 (2013).
79. Hurley, L. H. & Boyd, F. L. DNA as a target for drug action. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 402–407 (1988).
80. Watson, J. . *Molecular biology of the gene*. (New York: W. A. Benjamin, Inc., 2004).
81. Mpountoukas, P., Pantazaki, A., Kostareli, E., Christodoulou, P., Kareli, D., Poliliou, S., Mourelatos, C., Lambropoulou, V. & Lialiaris, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2934–2944 (2010).
82. Long, E. C. *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*. (Oxford University Press, New York, 1996).

-
83. Ihmels, H. & Otto, D. Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA -- General Principles and Recent Developments. in *Supramolecular Dye Chemistry* **258**, 161–204 (2005).
84. Husain, S., Jafri, F. & Saleemuddin, M. Shahid Husain', Farahd~ha Jafri and M. Saleemuddin Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University, Aligarh-202 002, India. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **40**, 1–11 (1996).
85. Shahabadi, N. & Maghsudi, M. Gel electrophoresis and DNA interaction studies of the food colorant quinoline yellow. *Dye Pigm.* **96**, 377–382 (2013).
86. Vijayalakshmi, R., Kanthimathi, M., Subramanian, V. & Nair, B. U. DNA cleavage by a chromium(III) complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 731–734 (2000).
87. Braslavsky, S. E. *Glossary of Terms Used in Photochemistry 3 rd Edition. Physics* (2006).
88. Vardevanyan, P. O., Élbakyan, V. L., Shahinyan, M. A., Minasyants, M. V., Parsadanyan, M. A. & Sahakyan, N. S. Determination of the Isosbestic Point in the Absorption Spectra of DNA–Ethidium Bromide Complexes. *J. Appl. Spectrosc.* **81**, 1060–1063 (2015).
89. Sovenyazy, K. M., Bordelon, J. A. & Petty, J. T. Spectroscopic studies of the multiple binding modes of a trimethine-bridged cyanine dye with DNA. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2561–2569 (2003).
90. Nafisi, S., Saboury, A. A., Keramat, N., Neault, J. F. & Tajmir-Riahi, H. A. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *J. Mol. Struct.* **827**, 35–43 (2007).
91. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, 2010).
92. Wang, Q., Wang, X., Yu, Z., Yuan, X. & Jiao, K. Spectroscopic and electrochemical studies on the binding mechanism of DNA with an anthraquinone biological dye, nuclear fast red. *Int. J. Electrochem. Sci.* **6**, 5470–5481 (2011).
93. Qiao, C., Bi, S., Sun, Y., Song, D., Zhang, H. & Zhou, W. Study of interactions of anthraquinones with DNA using ethidium bromide as a fluorescence probe. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **70**, 136–143 (2008).
-

-
94. Nelson, D. L., Lehninger, A. L. & Cox, M. . *Lehninger's Principles of Biochemistry*. (W. H. Freeman, 2008).
 95. Irobalieva, R. N., Fogg, J. M., Catanese, D. J., Sutthibutpong, T., Chen, M., Barker, A. K., Ludtke, S. J., Harris, S. A., Schmid, M. F., Chiu, W. & Zechiedrich, L. Structural diversity of supercoiled DNA. *Nat. Commun.* **6**, 8440 (2015).
 96. Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M. & Manfra, L. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecol. Indic.* **69**, 35–49 (2016).
 97. Blomqvist, A. *Food and Fashion: Water Management and Collective Action Among Irrigation Farmers and Textile Industrialists in South India*. (Linköping University, 1996).
 98. Kant, R. Textile dyeing industry an environmental hazard. *Nat. Sci.* **4**, 22–26 (2012).
 99. Rahman, M. M., Khan, M. M. R., Uddin, M. T. & Islam, M. A. Textile Effluent Treatment Plant Sludge: Characterization and Utilization in Building Materials. *Arab. J. Sci. Eng.* **42**, 1435–1442 (2017).
 100. Joshi, M., Bansal, R. & Purwar, R. Colour removal from textile effluents. *Indian J. Fibre Text. Res.* **29**, 239–259 (2004).
 101. Koprivanac, N. & Kusic, H. *Hazardous Organic Pollutants in Colored Wastewaters*. (Nova Science Publisher, 2009).
 102. Anjaneyulu, Y., Sreedhara Chary, N. & Samuel Suman Raj, D. Decolorization of industrial effluents - Available methods and emerging technologies - A review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **4**, 245–273 (2005).
 103. Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Martínez, A. T. & Martínez, M. J. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 141–148 (2006).
 104. da Silva, M. R., de Sá, L. R. V., Russo, C., Scio, E. & Ferreira-Leitão, V. S. The Use of HRP in Decolorization of Reactive Dyes and Toxicological Evaluation of Their Products. *Enzyme Res.* **2010**, 1–7 (2010).
 105. Torres, E., Bustos-Jaimes, I. & Le Borgne, S. Potential use of oxidative enzymes
-

- for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B Environ.* **46**, 1–15 (2003).
106. Zhang, X. & Laursen, R. A. Development of mild extraction methods for the analysis of natural dyes in textiles of historical interest using LC-diode array detector-MS. *Anal. Chem.* **77**, 2022–2025 (2005).
107. Zhang, X. & Laursen, R. Application of LC-MS to the analysis of dyes in objects of historical interest. *Int. J. Mass Spectrom.* **284**, 108–114 (2009).
108. Holčapek, M., Volná, K. & Vaněrková, D. Effects of functional groups on the fragmentation of dyes in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectra. *Dye Pigm.* **75**, 156–165 (2007).
109. Liu, J. Z., Wang, T. L. & Ji, L. N. Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **41**, 81–86 (2006).
110. Onder, S., Celebi, M., Altikatoglu, M., Hatipoglu, A. & Kuzu, H. Decolorization of naphthol blue black using the horseradish peroxidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **163**, 433–443 (2011).
111. Jović, M., Stanković, D., Manojlović, D., Anđelković, I., Milić, A., Dojčinović, B. & Roglič, G. Study of the Electrochemical Oxidation of Reactive Textile Dyes Using Platinum Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 168–183 (2013).
112. Permpornsakul, P., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Eveleigh, D., Kobayashi, D., Imai, T. & Punnapayak, H. Biological Treatment of Reactive Black 5 by Resupinate White Rot Fungus *Phanerochaete sordida* PBU 0057. *Polish J. Environ. Stud.* **25**, 1167–1176 (2016).
113. Tauber, M. M., Guebitz, G. M. & Rehorek, A. Degradation of Azo Dyes by Laccase and Ultrasound Treatment Degradation of Azo Dyes by Laccase and Ultrasound Treatment. *Society* **71**, 2600–2607 (2005).
114. Amala Infant Joice, J., Sivakumar, T., Ramakrishnan, R., Ramya, G., Shanmuga Prasad, K. P. & Arul Selvan, D. Visible active metal decorated titania catalysts for the photocatalytic degradation of Amidoblack-10B. *Chem. Eng. J.* **210**, 385–397 (2012).
115. Zhao, X., Lu, Y. & Hardin, I. Determination of biodegradation products from sulfonated dyes by *Pleurotus ostreatus* using capillary electrophoresis coupled

- with mass spectrometry. *Biotechnol. Lett.* **27**, 69–72 (2005).
116. Zhang, A., Fang, L., Wang, J. & Liu, W. Enzymatic Decolorization of Orange II: Optimization by Response Surface Methodology and Pathway. *Environ. Prog. Sustain. Energy* **32**, 294–301 (2013).
 117. Lopez, C., Valade, A. G., Combourieu, B., Mielgo, I., Bouchon, B. & Lema, J. M. Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ ¹H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **335**, 135–149 (2004).
 118. Chivukula, M., Spadaro, J. T. & Renganathan, V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* **34**, 7765–72 (1995).
 119. Kim, G.-Y., Lee, K.-B., Cho, S.-H., Shim, J. & Moon, S.-H. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. *J. Hazard. Mater.* **126**, 183–188 (2005).
 120. Hiner, A. N. P., Hernández-Ruiz, J., Rodríguez-López, J. N., Arnao, M. B., Varón, R., García-Cánovas, F. & Acosta, M. The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: An example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 504–516 (2001).
 121. Gomez, C. G., Rinaudo, M. & Villar, M. A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydr. Polym.* **67**, 296–304 (2007).
 122. Balakrishnan, B., Lesieur, S., Labarre, D. & Jayakrishnan, a. Periodate oxidation of sodium alginate in water and in ethanol-water mixture: A comparative study. *Carbohydr. Res.* **340**, 1425–1429 (2005).
 123. Wang, P., Fan, X., Cui, L., Wang, Q. & Zhou, A. Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blent with PEG. *J. Environ. Sci.* **20**, 1519–1522 (2008).
 124. Baynton, K. J., Bewtra, J. K., Biswas, N. & Taylor, K. E. Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochim. Biophys. Acta* **1206**, 272–278 (1994).
 125. Nitheranont, T., Watanabe, A., Suzuki, T., Katayama, T. & Asada, Y.

- Decolorization of Synthetic Dyes and Biodegradation of Bisphenol A by Laccase from the Edible Mushroom, *Grifola frondosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1845–1847 (2011).
126. Chairin, T., Nitheranont, T., Watanabe, A., Asada, Y., Khanongnuch, C. & Lumyong, S. Biodegradation of bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus, *trametes polyzona*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**, 539–545 (2013).
127. Šekuljica, N., Prlainović, N., Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Djokić, V. R., Mijin, D. & Knezevic-Jugovic, Z. D. Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **39**, 461–472 (2016).
128. Silva, M. C., Torres, J. A., Vasconcelos De Sá, L. R., Chagas, P. M. B., Ferreira-Leitão, V. S. & Corrêa, A. D. The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **89**, 122–129 (2013).
129. Tafurt-Cardona, Y., Soares-Rocha, P., Fernandes, T. C. C. & Marin-Morales, M. A. Cytotoxic and genotoxic effects of two hair dyes used in the formulation of black color. *Food Chem. Toxicol.* **86**, 9–15 (2015).
130. Phugare, S. S., Kalyani, D. C., Patil, A. V. & Jadhav, J. P. Textile dye degradation by bacterial consortium and subsequent toxicological analysis of dye and dye metabolites using cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. *J. Hazard. Mater.* **186**, 713–723 (2011).
131. Renganathan, S., Thilagaraj, W. R., Miranda, L. R., Gautam, P. & Velan, M. Accumulation of Acid Orange 7, Acid Red 18 and Reactive Black 5 by growing *Schizophyllum commune*. *Bioresour. Technol.* **97**, 2189–2193 (2006).
132. Uliana, C. V., Garbellini, G. S. & Yamanaka, H. Spectrophotometric evaluation of the behavior of disperse red 1 dye in aqueous media and its interaction with calf thymus ds-DNA. *J. Braz. Chem. Soc.* **23**, 1469–1475 (2012).
133. Collins, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *BBA - Gen. Subj.* **1840**, 794–800 (2014).
134. Chaudhari, A. U., Tapase, S. R., Markad, V. L. & Kodam, K. M. Simultaneous decolorization of reactive Orange M2R dye and reduction of chromate by *Lysinibacillus* sp. KMK-A. *J. Hazard. Mater.* **262**, 580–588 (2013).

135. Smith, J. O., Olson, D. A. & Armitage, B. A. Molecular recognition of PNA-containing hybrids: Spontaneous assembly of helical cyanine dye aggregates on PNA templates. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2686–2695 (1999).
136. Shi, Y., Guo, C., Sun, Y., Liu, Z., Xu, F., Zhang, Y., Wen, Z. & Li, Z. Interaction between DNA and Microcystin-LR Studied by Spectra Analysis and Atomic Force Microscopy. 797–803 (2011).
137. Tong, C., Hu, Z. & Wu, J. Interaction between methylene blue and calfthymus deoxyribonucleic acid by spectroscopic technologies. *J. Fluoresc.* **20**, 261–267 (2010).
138. Gupta, A. K., Ahmad, I. & Ahmad, M. Genotoxicity of refinery waste assessed by some DNA damage tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **114**, 250–256 (2015).
139. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

Prilog 1

Najvažni hemijski i ekološki zakoni kao i regulative na svetskom nivou

Evropska Unija:

-Direktiva za klasifikaciju, pakovanje i označavanje opasnih supstanci (67/548/EEC), uključujući nekoliko amandmana I adaptacija, poslednji amandman direktivom 2001/59/EC.

-Direktiva za klasifikaciju, pakovanje i označavanje opasnih preparata (88/379/EEC),

-Ograničenja na tržištu i upotreba određenih opasnih supstanci i preparata

76/769/EEC, sa amandmanima, poslednji amandman direktiva 2002/61/EC.

-Direktiva kontrole glavnih opasnih akcidenata uključujući I opasne supstance (96/82/EC)

-Zaštita radnika od rizika izlaganju karcinogenima na radnom mestu (89/391/EEC, 90/394/EEC) Direktiva vezana za prevenciju integrisanja zagađivača (96/61/EC)
MSDS direktiva 91/155/EEC

Nemačka:

-Spisak supstanci koje ugrožavaju vode pod Federalnim zakonom o vodama (2011)

Švajcarska:

-Zakon o otrovima (1969)

-Zakon očuvanja životne okoline (1985)

SAD:

-Zakon o kontrolisanju toksičnih supstanci (1976)

-OSHA standard komunikacije opasnih materija (1985).

Kanada:

-Akt o zaštiti životne okoline Kanade (1994).

Japan:

-Zakon kontrolisanja hemijskih supstanci (1973).

-Zakon o zdravstvu i industrijskoj sigurnosti (1972).

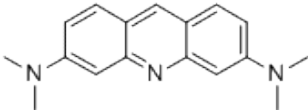
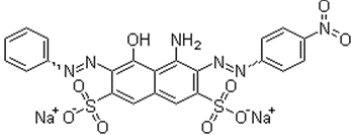
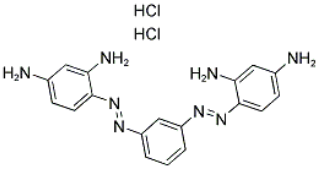
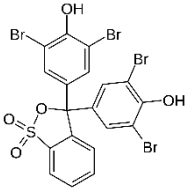
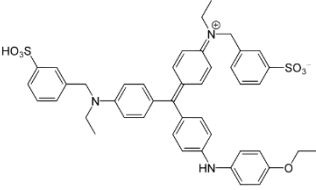
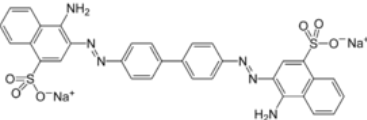
Australija:

-Nacionalni industrijsko hemijski i šema procene (1990)

U Srbiji je doneta uredba o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vodama i rokovi za njihovo dostizanje na osnovu člana 93. stav 2. tačka 1) Zakona o vodama ("Službeni glasnik RS", broj 30/10) i člana 42. stav 1. Zakona o Vladi ("Službeni glasnik RS", br. 55/05, 71/05 - ispravka 101/07, 65/08 i 16/11).

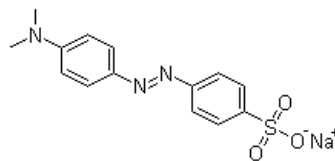
Prilog 2.

Strukture boja korišćenih u ovoj doktorskoj disertaciji

Boja	Klasa	Struktura
Akridin oranž (AO)	akridin	
Amido crna 10b (AB)	azo	
Bizmark braon (BB)	azo	
Brom fenol plava (BPB)	trifenilmetan	
Komasi brilijant plava R250 (CBB)	triarilmetan	
Kongo crvena (CR)	azo	

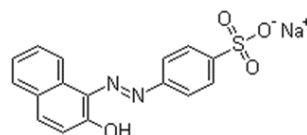
Metil oranž (MO)

azo



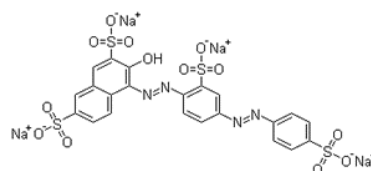
Oranž 2 (OR2)

azo



Ponso S (PS)

azo

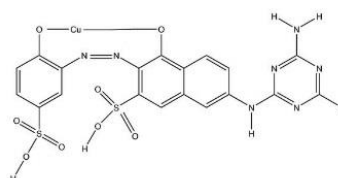


Procion® tamno plava (PDB)

azo

bifunkcionalna boja zaštićene
strukture sa dva
monohlortriazinske reaktivne
grupe

Reaktivno plava 52 (RB)

azo/formazan
metal kompleks

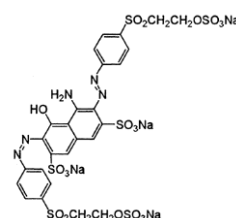
Reaktivno zelena 15 (RG)

nedostupno

nedostupno

Reaktivno crna 5 (RB5)

azo



Realan® plava (RLB)

nedostupno

nedostupno

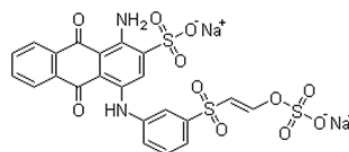
Realan® žuta (RLY)

nedostupno

nedostupno

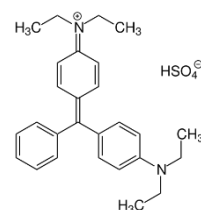
Remazol brilijant plava (RBBR)

antracenski derivat



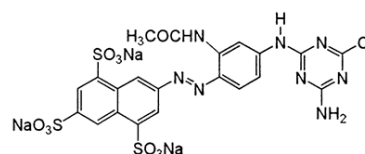
Brilijant zelena (BG)

triarilmetan



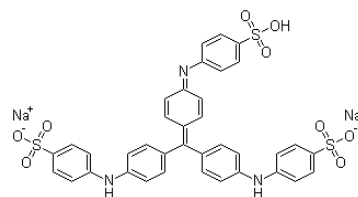
Drimaren zlatno žuta (DGY)

azo



Metilen plava (MB)

triazin



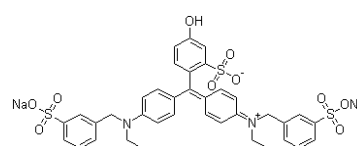
Realan® crvena (RR)

nedostupno

nedostupno

Fast zelena (FG)

triarilmetan

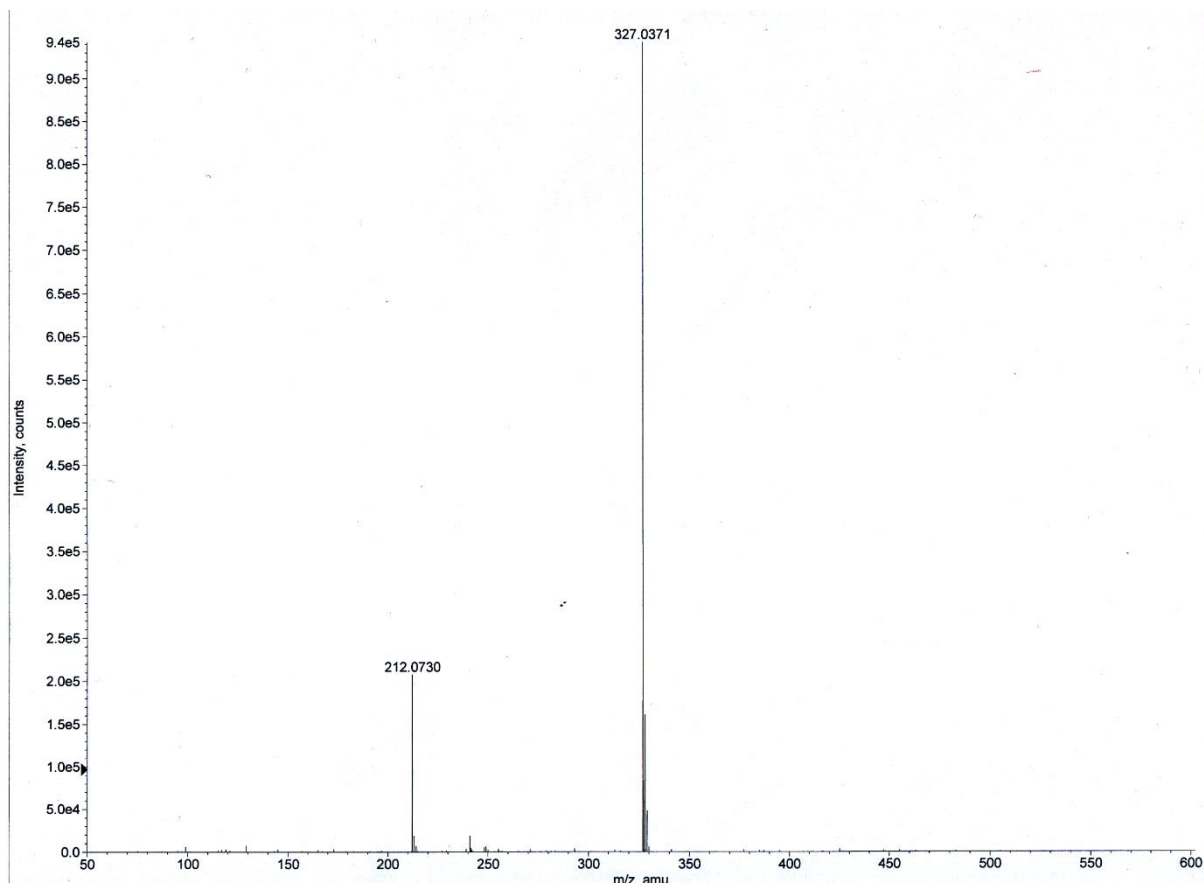


Procion® ćilibar (PRA)	nedostupno	nedostupno
Procion® crveno braon (PRB)	nedostupno	nedostupno
Procion® žuta (PRY)	azo	bifunkcionalna boja zaštićene strukture sa dva monohlortriazinske reaktivne grupe

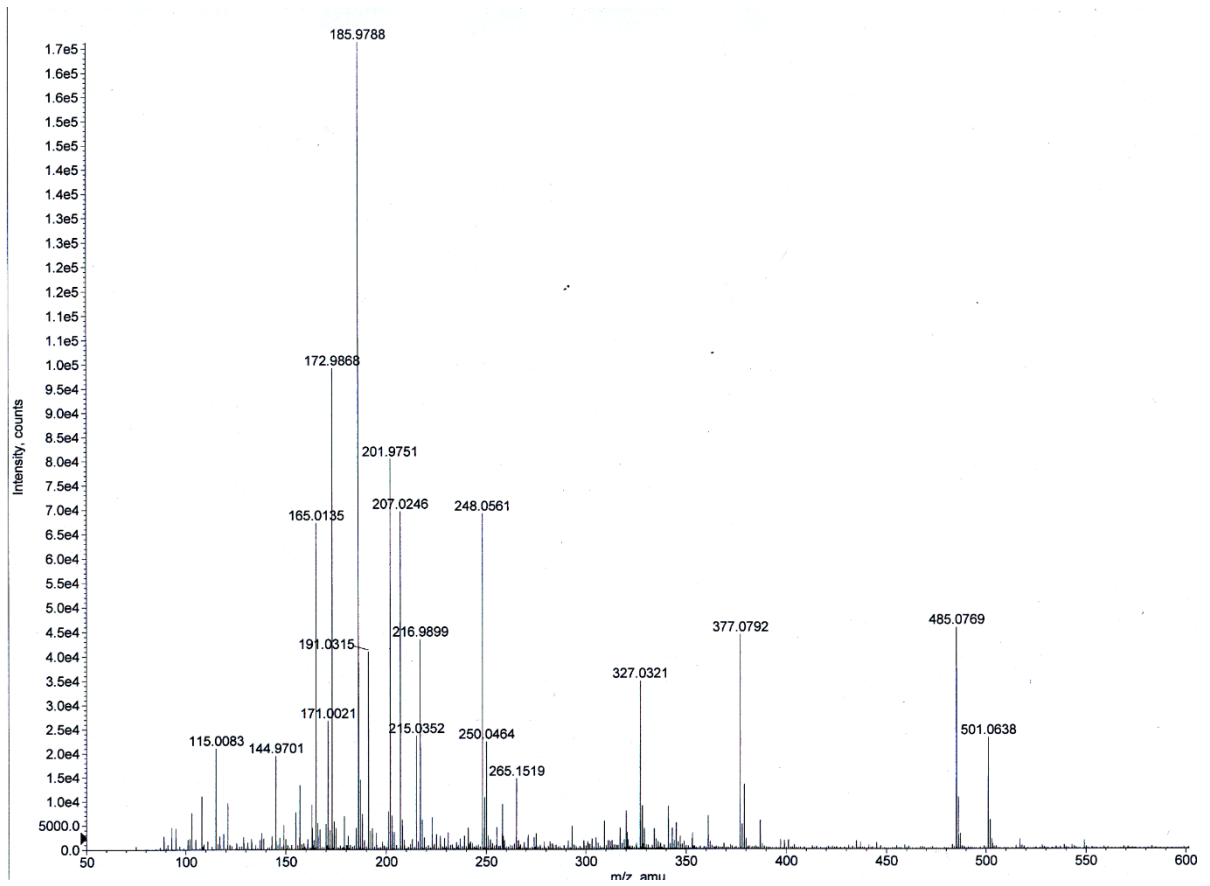
Prilog 3.

ESI-MS spektar OR2 pre (a) i nakon obezbojavanja sa HRP-A (b) 3 μ L, (c) 10 μ L.

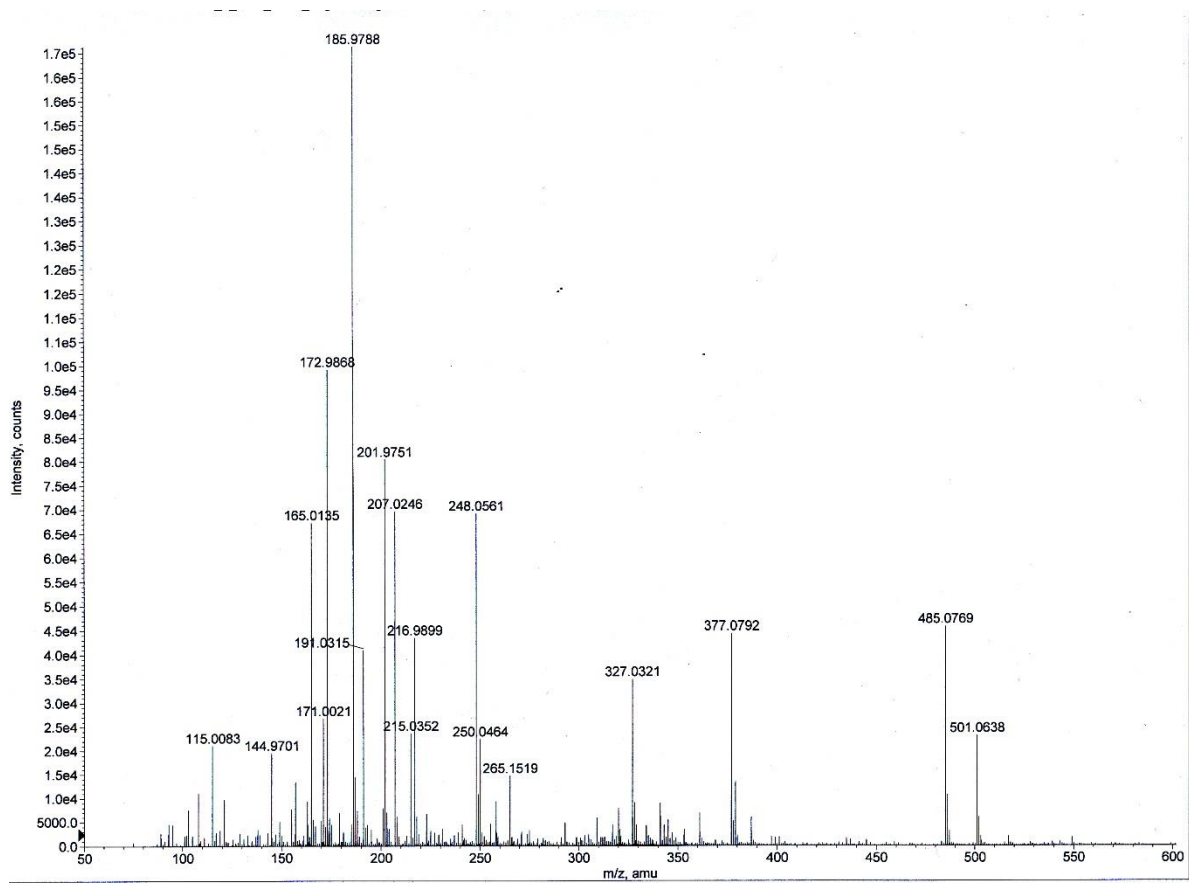
(a)



(b)

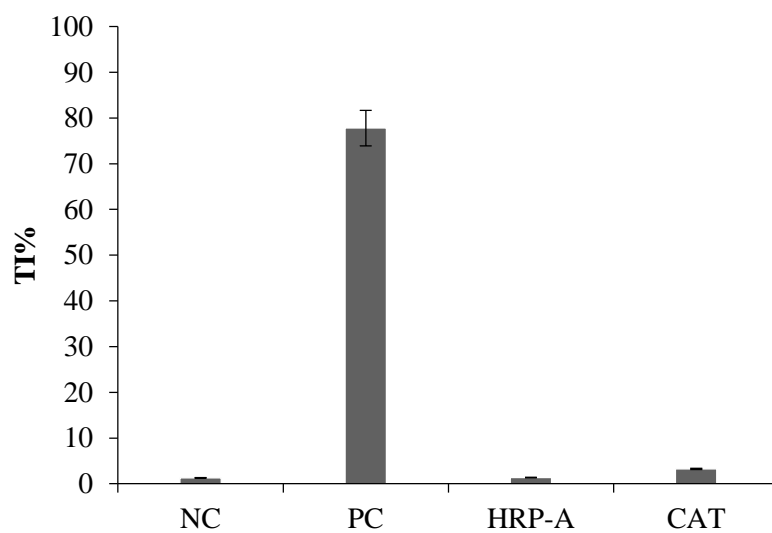


(c)



Prilog 4.

Detektovani nivo oštećenja DNA komet testom prilikom inkubiranja sa: PBS–negativna kontrola, PC–pozitivna kontrola (H_2O_2), HRP-A – kisela izoforma peroksidaze iz rena, CAT– katalaza.



Biografski podaci kandidata

Barbara Jožef, rođena Janović, rođena je 07. decembra 1987. godine u Somboru, Republika Srbija. Osnovu školu i gimnaziju završila je u Somboru. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar upisala je 2006. godine. Diplomirala je 28.06.2011. godine odbranom završnog rada pod nazivom „Obezbojavanje organskih boja peroksidazama iz rena“. Master studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program biohemija upisala je 2011. godine, a završila 20.09.2012. godine odbranom master rada pod nazivom „Izučavanje oštećenja DNA u reakcijama enzimskog obezbojavanja tekstilnih azo-boja“. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program biohemija upisala je 2012. godine.

U centru za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, zaposlila se kao istraživač-pripravnik u februaru 2014. godine, a od marta 2015. kao istraživač-saradnik, na projektu OI 172048 – „Proizvodnja, izolovanje i karakterizacija enzima u rastvornom i imobilizovanom obliku u biotehnologiji hrane, biogorivima i zaštiti životne sredine“ finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a čiji je rukovodilac dr Zoran Vujčić, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kandidatkinja je kao stipendista pohađala je sledeće kurseve: „12th European Short Course on Principles and Applications of Time-resolved Fluorescence Spectroscopy“, PicoQuant GmbH, u Berlinu, Nemačka (03-06. novembra 2014. godine), „Fluorescence Microscopy course in collaboration with Nikon“, International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Trst, Italija (02-04. maja 2016.), „Biocatalysis as Key Enabling Technology – CarbaZymes/Robox/Metafluidics“, Horizon 2020 Summer School 2017, Sijena, Italija (03-06. oktobra 2017. godine).

Kandidatkinja je držala vežbe iz obaveznog predmeta Eksperimentalna biohemija, kao i vežbe iz izbornog predmeta Biotehnologije u životnoj sredini na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Dobitnik je nagrade FEBS-a „Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe“ za naučno-istraživački boravak u laboratoriji “DNA: damage and repair” pod vodstvom prof. dr Andrew R. Collins, na Institutu za osnovne medicinske nauke u Oslu, Norveška (15. septembar-15. novembar 2015.).

Dobitnik je zlatne medalje za osvojeno prvo mesto na takmičenju „Najbolja tehnološka inovacija“, u okviru tima BBH sa inovacijom „*Super Vlakna*“, Beograd, Srbija, 2014.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Барбара Јожеф _____

Број индекса _____ ДБ06/2012 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена растворних и имобилизованих изоформи пероксидазе из рена у уклањању обојених ксенобиотика

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

Потпис аутора

У Београду, 14. мај 2018, године

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Барбара Јожеф

Број индекса ДБ06/2012

Студијски програм доктор биохемијских наука

Наслов рада **Примена растворних и имобилизованих изоформи пероксидазе
из рена у уклањању обојених ксенобиотика**

Ментор проф. Др Зоран Вујчић и виши научни сарадник др Мирослава Вујчић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 14. мај 2018. године

Изјава о коришћењу

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

Примена растворних и имобилизованих изоформи пероксидазе из рена у уклањању обојених ксенобиотика

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 14. мај 2018. године

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.