

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Katarina M. Banjanac

IMOBILIZACIJA ENZIMA NA
NANOČESTICE SiO_2 MODIFIKOVANE
ORGANOSILANIMA

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Katarina M. Banjanac

IMMOBILIZATION OF ENZYMES ON
MODIFIED SiO₂ NANOPARTICLES WITH
ORGANOSILANES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI:

Dr Dejan Bezbradica
vanredni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Aleksandar Marinković
docent
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Zorica Knežević-Jugović
redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Nevena Prlainović
naučni saradnik
Inovacioni centar
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Milica Rančić
docent
Šumarskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je realizovana na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju i Katedri za organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Najveću zahvalnost na pomoći i angažovanju u toku izrade ove disertacije dugujem svojim mentorima prof. dr Dejanu Bezbradici i docentu dr Aleksandru Marinkoviću. Moram da istaknem posebnu zahvalnost prof. Dejanu na savetima koji su mi pomogli u istraživanju, kao i na pomoći pri pisanju disertacije.

Zahvalnost dugujem i dr Neveni Prlainović na korisnim sugestijama i odličnoj saradnji. Iskreno zahvaljujem i ostalim članovima komisije, prof. dr Zorici Knežević-Jugović i docentu dr Milici Rančić na ukazanom poverenju.

Najtoplije zahvaljujem kolegi i prijatelju Mladenu Mihailoviću na nesebičnoj pomoći u toku eksperimentalnog rada, kao i kolegincima Ani Milivojević na pruženoj prijateljskoj podršci da istrajem i prevaziđem sve probleme nastale u toku rada na ovoj disertaciji. Takođe, kolegincima dr Milici Carević i dr Mariji Ćorvić zahvaljujem se na pruženim savetima, pomoći i prijatnoj radnoj atmosferi.

Od srca hvala mojim kumovima, prijateljima i rodbini na svemu što su za mene učinili. Posebnu zahvalnost želim da izrazim mojim roditeljima, mami Jeleni i tati Mišku, na bezgraničnoj ljubavi i stalnoj podršci kako finansijskoj tako i psihološkoj da istrajem u svojim zamislima.

Na kraju, želim da naglasim neizrecivu ljubav prema mom bratu Đorđu, koji nije više sa nama, a u čiju čast je od srca posvećena ova doktorska disertacija.

IMOBILIZACIJA ENZIMA NA NANOČESTICE SiO₂ MODIFIKOVANE ORGANOSILANIMA

REZIME

U okviru ove teze, razvijeno je nekoliko procedura za hemijsku modifikaciju površine pirogenih, neporoznih nanočestica silike (FNS) kako bi se na njihovu površinu uvele različite funkcionalne grupe. Prva procedura se sastojala od modifikacije površine nanočestica silike 3-aminopropiltrimetoksisilanom (APTMS-om) radi uvođenja primarnih amino grupa na njihovu površinu. Dobijene amino-modifikovane nanočestice silike (AFNS) su potom tretirane aktivirajućim agensom cijanuril-hloridom, što je rezultiralo da se dobiju nanočestice silike (CCAFNS) sa reaktivnim atomima hlora na površini koji mogu da formiraju kovalentnu vezu sa nukleofilnim grupama molekula enzima. Druga primenjena procedura modifikacije površine nanočestica silike se sastojala u primeni (3-glicidiloksipropil)trimetoksisilan (GOPTMS-a), pri čemu je dobijen nosač (GFNS) sa velikom koncentracijom epoksi grupa (440-520 $\mu\text{mol/g}$ nanočestica) koje omogućavaju kovalentnu imobilizaciju enzima.

Nakon toga, uticaj koji primenjena modifikacija ima na ključne osobine imobilisanih enzima (koncentracija imobilisanih proteina i aktivnosti, prinos imobilizacije proteina i aktivnosti, vrste interakcija formiranih između enzima i nanočestica, termička i operativna stabilnost) analiziran je u slučajevima imobilizacije lipaze iz *Candida rugosa*, β -galaktozidaze iz *Aspergillus oryzae* i komercijalnih preparata proteaza (alkalaza i Flavourzyme).

U slučaju imobilizacije lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice, koncentracija imobilisanih proteina je rasla sa porastom koncentracije "ponuđenih" proteina i dostigla je maksimalne vrednosti od 108, 102, i 60 mg proteina po g nanočestica na FNS, CCAFNS i AFNS, redom. Međutim, u zavisnosti od primenjenog nosača različite interakcije se uspostavljaju tokom imobilizacije. Na FNS i AFNS imobilizacija se odigrava isključivo adsorpcijom, dok na CCAFNS nakon inicijalne adsorpcije molekuli lipase se reorjentišu kako bi došlo do formiranja kovalentnih veza između amino grupa enzima i hloridnih grupa CCAFNS nanočestica. Imobilisana lipaza na CCAFNS u 0,1 M fosfatnom puferu ispoljila je najveću koncentraciju imobilisane aktivnosti od 1320 IU/g.

Sa druge strane, lipaza kovalentno imobilisana na GFNS nanočestice u 1 M puferu imala je koncentraciju imobilisane aktivnosti od 1500 IU/g i koncentraciju imobilisanih proteina od 320 mg/g. Radi procene uticaja primenjene hemijske modifikacije površine nanočestica silike, upoređene su termička stabilnost i esterifikaciona aktivnost lipase kovalentno imobilisane na GFNS i CCAFNS. Dobijeni rezultati su pokazali da ova dva imobilisana preparata imaju sličnu termičku stabilnost, ali da u reakciji sinteze aroma estera lipaza imobilisana na GFNS ima 2 puta veću esterifikacionu aktivnost nego lipaza imobilisana na CCAFNS.

Između tri korišćena nosača nano-dimenzija (FNS, AFNS i CCAFNS), nosač sa amino grupama (AFNS) se pokazao kao najbolji za imobilizaciju β -galaktozidaze sa koncentracijom imobilisanih proteina od 214 mg/g i koncentracijom imobilisane aktivnosti od 2087 IU/g, iako je enzim imobilisan adsorpcijom. Kako se pokazalo da β -galaktozidaza imobilisana na AFNS ima najveću aktivnost i termičku stabilnost primenjena je u reakcijama sinteze galakto-oligosaharida (GOS) i galaktitol galaktozida. Sa imobilisanom β -galaktozidazom na AFNS postignuta je produktivnost GOS-a od 90 g/l/h, ako se uporedi sa produktivnošću od 30 g/l/h koju je ostvario slobodni enzim može se zaključiti da je imobilizacijom ovog enzima na AFNS povećana selektivnost β -galaktozidaze ka reakciji transgalaktozilacije što je ključni faktor za njenu primenu u sintezi GOS-a. Slični rezultati su dobijeni i tokom sinteze galaktitol galaktozida.

U finalnom delu ove teze, ispitivana je mogućnost korišćenja FNS, AFNS, CCAFNS i GFNS nanočestica kao nosača za imobilizaciju komercijalnih preparata proteaza (alkalaza i Flavourzyme). Pokazano je da se maksimalna koncentracija imobilisanih proteina od 22 mg/g dobija prilikom imobilizacije alkalaze na CCAFNS nanočestice, dok je Flavourzyme manifestovao isti afinitet ka vezivanju na CCAFNS i AFNS nanočestice (23,46 i 24,15 mg/g redom). Sa druge strane, maksimalna koncentracija imobilisane aktivnosti (25 IU/g) je ostvarena prilikom kovalentne imobilizacije alkalaze na GFNS nanočestice u 1 M acetatnom puferu. Flavourzyme je maksimum koncentracije imobilisane aktivnosti u reakciji hidrolize azokazeina (2,96 IU/g) i koncentracije imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti (22,84 IU/g) ispoljio prilikom imobilizacije na CCAFNS. Pošto su se alkalaza imobilisana na GFNS i Flavourzyme imobilisana na CCAFNS pokazali kao nanobiokatalizatori sa najvećom aktivnošću, primenjeni su u reakciji hidrolize proteinskog izolata suncokretove sačme. Ispostavilo se da se

sukcesivnim korišćenjem imobilisane alkalaze na GFNS i Flavourzyme-a na CCAFNS dolazi do najobimnije hidrolize.

Ključne reči: nanočestice, silanizacija, imobilizacija, lipaze, β -galaktozidaze, proteaze, esterifikacija, transgalaktozilacija, proteinski hidrolizati

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj: 615.355:620.3:666.19

IMMOBILIZATION OF ENZYMES ON MODIFIED SiO₂ NANOPARTICLES WITH ORGANOSILANES

ABSTRACT

In this thesis, different procedures for fumed nonporous silica nanoparticles (FNS) chemical modification, in terms of introducing different functional groups on the support surface, were developed. The first procedure consisted of FNS surface modification with 3-aminopropyltrimethylsilane (APTMS) with purpose of introducing amino groups. The obtained amino modified support (AFNS) was further subjected to modification with cyanuric chloride (CC), and the obtained support (CCAFNS) resulted with reactive aromatic chlorine group on the surface, which can easily form covalent bond with nucleophilic groups of enzyme side chains. In the second procedure, FNS was chemically modified with (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GOPTMS), producing support (GFNS) with great number of epoxy groups (440-520 $\mu\text{mol/g}$ support) on the surface which are responsible for easy covalent bond formation during the enzyme immobilization.

Afterwards, the effects of modification on properties important for immobilized enzymes utilization (immobilized protein and activity concentration, protein and activity immobilization yield, type of established interactions, thermal and operational stability) were analyzed for several enzymes, namely lipase from *Candida rugosa*, β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* and commercial protease preparations Alcalase and Flavourzyme.

In case of immobilization of lipase on FNS, AFNS and CCAFNS, the amount of the immobilized enzyme increased with increasing enzyme concentration achieving loadings of 108, 60 and 102 mg per g support, respectively. However, the immobilization was governed by different interactions. On FNS and AFNS immobilization was achieved exclusively by adsorption, while on CCAFNS after the initial adsorption, lipase molecules reoriented and covalent bonds were formed. The highest immobilized activity concentration of 1320 IU/g was expressed when lipase was immobilized on CCAFNS in 0.1 M phosphate buffer.

On the other hand, lipase immobilized on the GFNS in 1 M buffer yielded the highest immobilized activity concentration of 1500 IU/g and the immobilized protein concentration of 320 mg/g. To evaluate the prospects of introduced chemical modifications, thermal stability and esterification activities of lipase immobilized on GFNS and CCAFNS were compared. The results showed that preparations displayed similar thermal stability, however, lipase immobilized on GFNS exhibited 2-folds higher esterification activity in synthesis of aroma esters than CCAFNS preparations.

Among three used supports (FNS, AFNS and CCAFNS), the one with amino groups (AFNS) exhibited the best β -galactosidase immobilized protein concentration of 214 mg/g support and the highest immobilized activity concentration of 2087 IU/g, although achieved through adsorption. Since β -galactosidase immobilized on AFNS proved to possess the highest activity and stability, it was applied in galacto-oligosaccharides (GOS) and galactitol-galactoside synthesis. With AFNS- β -galactosidase GOS production of 90 g/l/h was achieved as compared to 30 g/l/h by free β -galactosidase, meaning that AFNS enhanced selectivity of β -galactosidase for transgalactosylation, which is crucial advantage for its application in GOS production. Similar results were obtained in galactitol galactoside synthesis.

Finally, possibility of utilization FNS, AFNS, CCAFNS and GFNS for immobilization of commercial protease preparations (Alcalase and Flavourzyme) was examined. It is demonstrated that Alcalase immobilized on CCAFNS exhibited maximum immobilized protein concentration of 22.75 mg/g, while Flavourzyme manifested the same affinity towards attachment on CCAFNS and AFNS (23.46 and 24.15 mg/g). On the other hand, the highest immobilized activity concentration (25 IU/g) Alcalase expressed on GFNS in 1 M acetate buffer. The maximum immobilized activity concentration in hydrolysis of azocaseine (2.96 IU/g) and exo-peptidase activity concentration (22.84 IU/g) Flavourzyme demonstrated on CCAFNS. Since Alcalase immobilized on GFNS and Flavourzyme immobilized on CCAFNS were nanobiocatalysts with highest activity, they were applied in hydrolysis of sunflower protein isolate. It turned out that using sequentially an Alcalase immobilized on GFNS and Flavourzyme immobilized on CCAFNS provided the highest sunflower protein isolate hydrolysis yield.

Keywords: nanoparticles, silanization, immobilization, lipases, β -galactosidase, protease, esterification, transgalactosylation, protein hydrolysates

Academic expertise: Engineering Technology

Major in: Biochemical Engineering and Biotechnology

UDC number: 615.355:620.3:666.19

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski deo	3
2.1. Imobilizacija enzima	3
2.1.1. Definisanje pojma „imobilizacija enzima“	3
2.1.2. Metode imobilizacije enzima	4
2.1.2.1. Izbor nosača	5
2.1.2.2. Podela metoda imobilizacije enzima	6
2.1.2.2.1. Kovalentna imobilizacija enzima	7
2.1.2.2.2. Adsorpcija enzima na čvrste nosače	8
2.1.3. Osobine imobilisanih enzima	9
2.2. Imobilizacija enzima na nosače nano-dimenzija	12
2.2.1. Prednosti i nedostaci upotrebe nosača nano-dimenzija	12
2.2.2. Vrste nanočestica koje se koriste za imobilizaciju enzima	12
2.2.2.1. Nanočestice oksida metala	13
2.2.2.1.1. Magnetne nanočestice i superparamagnetne nanočestice	13
2.2.2.1.2. Nanočestice titanijum(IV)-oksida	15
2.2.2.1.3. Nanočestice cink(II)-oksida	16
2.2.2.1.4. Ostali oksidi metala	17
2.2.2.2. Nanočestice silicijum-dioksida	17
2.2.2.3. Nanočestice zlata	18
2.2.2.4. Cirkon nanočestice	19
2.2.2.5. Nanodijamant	19
2.2.2.6. Nanografrit	20
2.2.2.7. Hitozan nanočestice	20
2.2.3. Uticaj nanostrukture čestica na aktivnost i stabilnost imobilisanog enzima	21
2.3. Neporozne nanočestice silike	23
2.3.1. Industrijski postupci sinteze nanočestica silike	23
2.3.1.1. Vlažan postupak sinteze nanočestica silike	23
2.3.1.1.1. Sol-gel proces	23
2.3.1.1.2. Sinteza taloženjem	25

2.3.1.2. Termički postupak sinteze nanočestica silike -----	25
2.3.1.2.1. Piro-hidrogenizacija-----	25
2.3.1.2.2. Plazma postupak -----	27
2.3.2. Poređenje fizičkih karakteristika nanočestica silike -----	28
2.3.3. Piroгене nanočestice silike -----	28
2.3.3.1. Struktura -----	28
2.3.3.2. Karakterizacija -----	30
2.3.3.2.1. TEM analiza nanočestica silike-----	30
2.3.3.2.2. BET merenja nanočestica silike -----	31
2.3.3.2.3. TGA analiza nanočestica silike -----	33
2.3.3.2.4. FTIR analiza nanočestica silike -----	33
2.3.3.3. Svojstva i primena pirogenih nanočestica silike-----	34
2.3.4. Svojstva pirogenih komercijalnih nanočestica silike-Aerosil 380-----	34
2.4. Hemijska modifikacija nanočestica silike -----	36
2.4.1. Modifikacija fizičkom adsorpcijom modifikatora na površinu nanočestica	37
2.4.2. Modifikacija kovalentnim vezivanjem organskih polimera na površinu	
 nanočestica -----	38
2.4.2.1. Modifikacija nanočestica „grafting“ metodom -----	38
2.4.2.1.1. Mehanizam reakcije silanizacije-----	40
2.4.2.1.2. Faktori koji utiču na reakciju silanizacije-----	43
2.4.2.2. „In situ“ polimerizacija nanočestica -----	44
2.4.2.2.1. Modifikacija nanočestica konvencionalnom slobodno-radikalskom	
polimerizacijom -----	45
2.4.2.2.2. Modifikacija nanočestica kontrolisanom slobodno-radikalskom	
polimerizacijom -----	47
2.4.2.2.3. UV-indukovana polimerizacija -----	52
2.4.3. Modifikacija nanočestica modifikujućim reagensima-----	52
2.5. Imobilizacija enzima adsorpcijom na neporozne nanočestice silike -----	53
2.5.1. Uticaj strukture nanočestica silike na adsorpciju enzima -----	53
2.5.2. Uticaj odnosa nanočestica silike /enzima na adsorpciju enzima -----	54
2.5.3. Uticaj pH i jonske jačine rastvora na adsorpciju enzima na nanočestice silike	
 -----	56

2.5.4. Uticaj strukture enzima na adsorpciju na nanočestice silike	57
2.6. Imobilizacija enzima na modifikovane neporozne nanočestice silike	59
2.6.1. Adsorpcija enzima na nanočestice silike modifikovane silanizacijom	59
2.6.2. Kovalentna imobilizacija enzima na nanočestice silike modifikovane silanizacijom	60
2.6.2.1. Aktiviranje nanočestica silike modifikovanih silanizacijom	61
2.6.2.1.1. Aktivacija amino-modifikovanih nanočestica silike cijanuril-hloridom	63
2.6.2.1.2. Aktivacija amino modifikovanih nanočestica silike uvođenjem aldehidne grupe	65
2.6.2.1.3. Aktiviranje amino modifikovanih nanočestica silike uvođenjem karboksilne grupe	68
2.6.3. Kovalentna imobilizacija enzima na nanočestice silike modifikovane „in situ“ polimerizacijom	69
2.6.4. Kovalentna imobilizacija enzima na nanočestice silike tretirane modifikujućim reagensima	69
3. Materijali i metode	71
3.1. Materijali	71
3.2. Metode	73
3.2.1. Modifikacija nanočestica silike	73
3.2.1.1. Modifikacija nanočestica silike APTMS-om	73
3.2.1.1.1. Određivanje koncentracije amino grupa na površini modifikovanih nanočestica silike	73
3.2.1.2. Aktivacija cijanuril-hloridom amino-modifikovanih nanočestica silike	74
3.2.1.3. Modifikacija nanočestica silike PAPMS-om	75
3.2.1.4. Modifikacija nanočestica silike GOPTMS-om	75
3.2.1.4.1. Određivanje koncentracije epoksi grupa na površini modifikovanih nanočestica silike	75
3.2.2. Karakterizacija modifikovanih nanočestica silike	76
3.2.2.1. FTIR analiza	76
3.2.2.2. TGA analiza	77
3.2.3. Imobilizacija enzima	77

3.2.3.1. Imobilizacija lipaza na nanočestice silike -----	77
3.2.3.2. Imobilizacija β -galaktozidaza na nanočestice silike -----	77
3.2.3.3. Imobilizacija proteaza na nanočestice silike -----	78
3.2.4. Određivanje aktivnosti enzima-----	78
3.2.4.1. Određivanje aktivnosti lipaze u hidrolizi <i>p</i> -nitrofenil palmitata -----	78
3.2.4.2. Određivanje hidrolitičke aktivnosti β -galaktozidaze u hidrolizi <i>o</i> -nitrofenil- β -galaktozida -----	80
3.2.4.3. Određivanje hidrolitičke aktivnosti proteaza u reakciji hidrolize azokazeina --	81
3.2.4.4. Određivanje hidrolitičke aktivnosti proteaza u reakciji hidrolize L-leucin- <i>p</i> -nitroanilida -----	82
3.2.5. Određivanje sadržaja proteina-----	83
3.2.5.1. Metoda po Loriju -----	83
3.2.5.2. Metoda po Bredfordu -----	84
3.2.6. Određivanje termostabilnosti imobilisanih enzima-----	85
3.2.7. Određivanje operativne stabilnosti imobilisanih enzima-----	85
3.2.7.1. Određivanje operativne stabilnosti imobilisanih lipaza-----	85
3.2.7.2. Određivanje operativne stabilnosti imobilisanih β -galaktozidaza-----	86
3.2.8. Sinteza aroma estara pomoću imobilisanih lipaza -----	86
3.2.9. Sinteza galakto-oligosaharida pomoću imobilisanih β-galaktozidaza -----	86
3.2.9.1. HPLC analiza -----	87
3.2.10. Sinteza galaktozida laktitola pomoću imobilisanih β-galaktozidaza -----	87
3.2.11. Elektroforeza -----	87
3.2.11.1. Postupak rada-----	88
3.2.11.2. Detekcija proteinskih traka bojenjem srebrom -----	89
3.2.12. Hidroliza proteinskog izolata suncokretove sačme pomoću imobilisanih proteaza-----	90
3.2.12.1. Frakcionisanje suncokretove sačme-----	90
3.2.12.2. Hidroliza proteinskog izolata pomoću imobilisanih proteaza -----	91
3.2.12.2.1. <i>Ninhidrińska metoda</i> -----	91
3.2.12.2.2. <i>HPLC metoda</i> -----	92
4. Rezultati i diskusija -----	93
4.1. Hemijska funkcionalizacija nanočestica silike -----	93

4.1.1. Vrste i ciljevi hemijskih modifikacija	93
4.1.2. Optimizacija hemijske modifikacije nanočestica silike	95
4.1.2.1. Optimizacija uslova reakcije silanizacije amino-organosilanom i aktivacije nanočestica silike	95
4.1.2.1.1. <i>Optimizacija uslova reakcije modifikacije nanočestica silike amino-organosilanom</i>	96
4.1.2.1.2. <i>Optimizacija uslova aktivacije amino-modifikovanih nanočestica silike</i>	98
4.1.2.2. Optimizacija uslova reakcije silanizacije nanočestica silike epoksi-organosilanom	100
4.1.2.3. Optimizacija uslova modifikacije nanočestica silike fenilamino-organosilanom	102
4.1.3. Karakterizacija funkcionalizovanih nanočestica silike	104
4.1.3.1. Karakterizacija amino-modifikovanih nanočestica silike	104
4.1.3.1.1. <i>FTIR analiza modifikovanih nanočestica</i>	104
4.1.3.1.2. <i>TGA analiza modifikovanih nanočestica</i>	106
4.1.3.2. Karakterizacija epoksi-modifikovanih nanočestica silike	107
4.1.3.2.1. <i>FTIR analiza epoksi-modifikovanih nanočestica silike</i>	107
4.1.3.3. Karakterizacija nanočestica silike modifikovanih fenilamino-organosilanom	109
4.1.3.3.1. <i>FTIR analiza fenilamino-modifikovanih nanočestica silike</i>	109
4.2. Imobilizacija lipaze na funkcionalizovane nanočestice silike	110
4.2.1. Imobilizacija lipaze na amino-modifikovane nanočestice silike	110
4.2.1.1. Adsorpcija lipaze na nanočestice silike	110
4.2.1.1.1. <i>Adsorpcija lipaze na FNS</i>	112
4.2.1.1.2. <i>Adsorpcija lipaze na AFNS</i>	116
4.2.1.1.3. <i>Adsorpcija lipaze na CCAFNS nanočestice</i>	119
4.2.1.1.4. <i>Poređenje efikasnosti imobilizacije proteina na FNS, AFNS i CCAFNS</i>	122
4.2.1.2. Efikasnost imobilizacije enzimske aktivnosti lipaze na nanočestice silike	124
4.2.1.2.1. <i>Uticaj hemijske modifikacije nanosilike na imobilizaciju enzimske aktivnosti</i>	124
4.2.1.2.2. <i>Diskusija o mehanizmu imobilizacije lipaze na nanočestice silike</i>	126
4.2.1.2.3. <i>Desorpcija lipaze imobilisane na CCAFNS</i>	130
4.2.1.2.4. <i>Uticaj jonske jačine pufera na imobilizaciju lipaze na nanočestice silike</i>	130

4.2.1.2.5. Poređenje karakteristika dobijenih nano-biokatalizatora -----	132
4.2.1.3. Stabilnost dobijenih nano-biokatalizatora -----	133
4.2.1.3.1. Ispitivanje termičke stabilnosti lipaze imobilisane na nanočestice silike----	133
4.2.1.3.2. Ispitivanje operativne stabilnosti lipaze imobilisane na nanočestice silike -	135
4.2.2. Imobilizacija lipaze na epoksi-modifikovane nanočestice silike -----	136
4.2.2.1. Uticaj jonske jačine pufera na proces imobilizacije lipaze-----	136
4.2.2.2. Uticaj koncentracije epoksi grupa na proces imobilizacije lipaze-----	139
4.2.2.3. Desorpcija lipaza imobilisanih na epoksi-modifikovane nanočestice -----	144
4.2.3. Poređenje aktivnosti i stabilnosti lipaza imobilisanih na funkcionalizovane nanosilike -----	144
4.2.3.1. Poređenje aktivnosti imobilisane lipaze na različite nanočestice silike -----	145
4.2.3.2. Poređenje termičke stabilnosti kovalentno imobilisane lipaze na CCAFNS i GFNS -----	147
4.2.3.3. Poređenje operativne stabilnosti kovalentno imobilisane lipaze na CCAFNS i GFNS -----	148
4.2.4. Primena lipaza imobilisanih na funkcionalizovane nanočestice silike u reakcijama sinteze estara -----	149
4.2.4.1. Primena imobilisane CRL u sintezi amil-kaproata -----	149
4.2.4.2. Primena imobilisane CALB u sintezi estara vitamina C -----	151
4.3. Imobilizacija β-galaktozidaze iz <i>A. oryzae</i> na funkcionalizovane nanočestice silike -----	156
4.3.1. Imobilizacija β-galaktozidaze na nanočestice silike modifikovane amino-organosilanom -----	156
4.3.1.1. Efikasnost imobilizacije proteina β -galaktozidaze -----	157
4.3.1.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti β -galaktozidaze na nanočestice silike ----	159
4.3.1.3. Poređenje katalitičke aktivnosti dobijenih nano-biokatalizatora -----	163
4.3.1.4. Mehanizam imobilizacije β -galaktozidaze na nanočestice silike-----	164
4.3.1.5. Termička stabilnost imobilisane β -galaktozidaze na nanočestice silike -----	167
4.3.2. Primena imobilisanih β-galaktozidaza u sintezi biaktivnih galaktozida ----	169
4.3.2.1. Sintaza galakto-oligosaharida katalizovana β -galaktozidazom imobilisanom na AFNS nanočestice -----	169

4.3.2.2. Sinteza galaktitol-galaktozida katalizovana β -galaktozidazom imobilisanom na AFNS nanočestice -----	174
4.4. Imobilizacija proteaza na funkcionalizovane nanočestice silike -----	178
4.4.1. Imobilizacija proteaza na nanočestice silike modifikovane amino-organosilanom -----	180
4.4.1.1. Imobilizacija alkalaza na nanočestice silike-----	181
4.4.1.1.1. Kinetika imobilizacije alkalaza na nanočestice silike -----	182
4.4.1.1.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti alkalaze na nanočestice silike-----	183
4.4.1.2. Imobilizacija Flavourzyme-a na nanočestice silike -----	187
4.4.1.2.1. Kinetika imobilizacije Flavourzyme-a na nanočestice silike -----	188
4.4.1.2.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti Flavourzyme-a na nanočestice silike ---	191
4.4.1.3. Poređenje efikasnosti imobilizacije proteaza na nanočestice silike-----	195
4.4.2. Imobilizacija proteaza na epoksi-modifikovane nanočestice silike-----	196
4.4.2.1. Imobilizacija alkalaza na epoksi-modifikovane nanočestice silike -----	196
4.4.2.1.1. Uticaj jonske jačine pufera na imobilizaciju alkalaza-----	196
4.4.2.1.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti alkalaza na epoksi-modifikovane nanočestice-----	199
4.4.2.1.3. Poređenje efikasnosti imobilizacije alkalaza na epoksi- i amino-modifikovane nanočestice silike-----	201
4.4.2.2. Imobilizacija Flavourzyme-a na epoksi-modifikovane nanočestice silike-----	203
4.4.2.2.1. Kinetika adsorpcije Flavourzyme-a na epoksi-modifikovane nanočestice silike -----	203
4.4.2.2.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti Flavourzyme-a na epoksi-modifikovane nanočestice silike-----	204
4.4.2.2.3. Poređenje efikasnosti imobilizacije Flavourzyme-a na epoksi- i amino-modifikovane nanočestice silike -----	206
4.4.3. Primena imobilisanih proteaza u hidrolizi suncokretove sačme-----	208
5. Zaključak-----	214
6. Literatura -----	216

1. Uvod

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je hemijska modifikacija SiO₂ nanočestica reakcijom silanizacije kako bi se dobili pogodni nosači za imobilizaciju industrijski važnih enzima. Nanočestice SiO₂ su atraktivni nosači za imobilizaciju enzima jer, pored velike specifične površine karakteristične za sve nanočestice, imaju površinu koja se lako može modifikovati uvođenjem različitih funkcionalnih grupa. Višedecenijsko istraživanje u oblasti imobilizacije enzima pokazalo da je efikasnost imobilizacije rezultat složene interakcije uticaja površine nosača za imobilizaciju, funkcionalnih grupa na površini nosača, uslova imobilizacije i strukture enzima. Pošto se industrijski enzimi značajno razlikuju prema raspodeli funkcionalnih grupa na površini, izbor optimalnog nosača za imobilizaciju enzima nikako ne može biti opštevažeći, već je vrlo specifičan proces koji se optimizuje za svaki pojedinačni enzim. Osnovni cilj ove disertacije je da se izborom optimalne metode modifikacije i uslova imobilizacije dobiju novi imobilisani enzimski preparati koji će u odnosu na postojeće preparate imati povećanu katalitičku aktivnost, operativnu i termičku stabilnost i izmenjenu selektivnost, a efekti različitih metoda modifikacije i imobilizacije biće analizirani u imobilizaciji vrednih industrijskih enzima - lipaza, β -galaktozidaza i proteaza.

U ovoj disertaciji će biti optimizovana hemijska modifikacija reakcijom silanizacije neporozne pirogene nanosilike radi primene različito modifikovanih silika nanočestica kao nosača za imobilizaciju enzima sa idejom da se dobiju imobilisani enzimi povećane aktivnosti i/ili stabilnosti. U početnim fazama istraživanja biće primenjena metoda hemijske modifikacije (reakcija silanizacije) radi uvođenja novih funkcionalnih grupa na površinu SiO₂ nanočestica. Ove čestice imaju silanolne grupe (-SiOH) na svojoj površini što daje mogućnost za korišćenje organosilana kao modifikujućih agenasa. Odigravanjem hemijske reakcije između silanolnih grupa na površini nanočestica i metoksi ili etoksi grupa organosilana, koje su podložne hidrolizi, dolazi do stvaranja -Si-O-Si- mostova što za rezultat ima uvođenje terminalnih funkcionalnih grupa na površinu nanočestica. Organosilani mogu imati različite funkcionalne grupe kao što su hloridna, tiolna, karboksilna, cijano ili amino, pri čemu će u ovoj disertaciji biti korišćeni organosilani sa amino i epoksi funkcionalnim grupama. Proces modifikacije će biti optimizovan sa aspekta postignute koncentracije amino-grupa i epoksi-grupa na površini nanočestica u zavisnosti od dužine trajanja tretmana i korišćenog masenog odnosa nanočestica i

odgovarajućeg organosilana. Nanočestice silike modifikovane amino-organosilanom biće primenjene kao nosač pogodan za imobilizaciju enzima adsorpcijom, ali će takođe biti dodatno modifikovane cijanuril-hloridom da bi se omogućila kovalentna imobilizacija enzima. FTIR i TGA spektroskopijom će biti proučavane strukturalne promene SiO₂ nanočestica izazvane modifikacijom.

Nakon toga će biti optimizovana imobilizacija različitih industrijskih enzima (lipaze, β -galaktozidaze i proteaze) kako na modifikovane tako i na nemodifikovane SiO₂ nanočestice. Rezultati ovog dela disertacije će dati doprinos u rasvetljavanju mehanizma imobilizacije enzima i omogućiti izbor optimalnog nosača za imobilizaciju svakog od ispitanih enzima. U sklopu ovih ispitivanja biće posmatrana operativna i termička stabilnost enzima imobilisanih na nemodifikovane i modifikovane SiO₂ nanočestice i upoređene sa stabilnošću slobodnog enzima. Nakon završene optimizacije imobilizacije i određivanja operativne i termičke stabilnosti, imobilisane lipaze najboljih karakteristika će biti korišćene u reakciji sinteze aroma estara i estara vitamina C, imobilisane β -galaktozidaze u reakciji sinteze bioaktivnih galaktozida, dok će imobilisane proteaze biti korišćene u hidrolizi proteinsog izolata suncokretove sačme.

2. Teorijski deo

2.1. Imobilizacija enzima

Enzimi imaju sposobnost da katališu kompleksne hemijske reakcije sa velikim stepenom specifičnosti prema supstratu i malim prinosom nus-produkata što je doprinelo njihovoj širokoj primeni u hemijskoj industriji, i to pre svega u proizvodnji finih hemikalija (hemijska i farmaceutska industrija), prehrambenoj industriji kao i u analitici.^{1, 2} Međutim, iako imaju izvrsne katalitičke osobine oni poseduju i osobine koje ograničavaju njihovu široku primenu u industrijskim procesima kao što su nestabilnost, rastvorljivost, mogućnost da dođe do inhibicije supstratom ili proizvodima, njihova primena ponekad zahteva fiziološke uslove tokom industrijskog procesa kao i prisustvo prirodnih supstrata čime je sužen izbor postupaka u kojima mogu biti primenjeni.³⁻⁵ Pa tako u većini slučajeva kako bi se omogućila njihova šira primena na industrijskom nivou najpre njihove mehaničke i fizičke osobine moraju biti poboljšane.

Postoji više načina da se poboljšaju osobine enzima:

1. primenom tehnika molekularne biologije,
2. primenom različitih imobilizacionih ili post-imobilizacionih tehnika,
3. i razvijanjem novih vrsta reaktora koji su u skladu sa potrebama enzimskog procesa.

Kao rezultat primene ovih tehnika dobijaju se efikasniji industrijski procesi sa biokatalizatorima koji se odigravaju u umerenim uslovima, dobijeni proizvodi su „prirodni“, a sam industrijski proces je ekonomski opravdan.^{3, 6}

Pored primene u industriji, enzimi se mogu koristiti i u dijagnostici, bioafinitetnoj hromatografiji i pri konstrukciji biosenzora.^{2, 7, 8}

U daljem tekstu će biti razmatrana mogućnost poboljšanja osobina enzima primenom različitih tehnika imobilizacije enzima kako bi se dobili biokatalizatori koje je moguće koristiti u industrijskim procesima.

2.1.1. Definisanje pojma „imobilizacija enzima“

Imobilizacija enzima podrazumeva vezivanje enzima fizičkim ili hemijskim putem na površinu nosača ili „zarobljavanje“ unutar strukture nosača.⁹ Imobilizacijom se često dobija enzim povećane katalitičke aktivnosti i/ili stabilnosti u odnosu na slobodni enzim, a omogućava se i olakšano izolovanje enzima iz reakcione smeše i upotreba u više reakcionih ciklusa čime se direktno smanjuje cena enzimskih procesa na industrijskom

nivou.¹⁰ Na svojoj površini molekuli enzima imaju različite funkcionalne grupe kao što su nukleofilni aminokiselinski ostaci, hidrofobne oblasti, karboksilne grupe, oblasti sa pozitivnim ili negativnim naelektrisanjem koje mogu da reaguju sa funkcionalnim grupama različitih materijala pri čemu ostvarene interakcije ili formirane hemijske veze dovode do vezivanja enzima.¹¹ Uopšteno gledano reklo bi se da je imobilizacija jednostavan proces i da su svi mogući problemi već rešeni. Međutim pokazalo se da se iako postoji puno opisanih metoda imobilizacije još uvek određeni fenomeni koji se pri samom procesu dešavaju nisu do kraja razjašnjeni. Zbog svega toga je imobilizacija i dalje izazov i aktuelna tema u mnogim istraživanjima. Poboljšanje postojećih metoda i rešavanje problema koji se javljaju tokom imobilizacije moguće je udruživanjem više naučnih disciplina kao što su molekularna biologija, hemija proteina, nauka o materijalima i hemijsko inženjerstvo.

U dosadašnjoj praksi za imobilizaciju enzima upotrebljavani su prvenstveno različiti konvencionalni nosači čije su dimenzije veće od 300 μm . Poslednjih godina sve više se kao nosači za imobilizaciju enzima koriste prirodni ili sintetski nanomaterijali.

2.1.2. Metode imobilizacije enzima

Na stotine protokola o imobilizaciji enzima je razvijeno u poslednjih 30 godina. Sa industrijske tačke gledišta, kako bi imobilisan enzim bio uspešno primenjen u nekom industrijskom procesu primenjena metoda imobilizacije enzima mora imati sledeće osobine¹²:

1. pre svega mora omogućiti da enzim postane stabilniji i otporniji prema ekstremnim uslovima, kao što su pH, temperatura i organski rastvarači,
2. mora omogućiti da enzim može biti upotrebljen u više ciklusa,
3. mora biti jednostavna i ekonomski opravdana,
4. ne sme dovesti do značajno smanjene aktivnosti i selektivnosti imobilisanog enzima u odnosu na slobodni enzim.

Radi boljeg razumevanja problematike imobilizacije enzima u Tabeli 2.1. su sumirane prednosti i mane samog postupka imobilizacije.

Prilikom odabira metode imobilizacije treba obratiti pažnju na tri najvažnije komponente „imobilisanog sistema“ a to su enzim, nosač i interakcije formirane između nosača i enzima. Ključni koraci u dizajniranju imobilisanog enzima su izbor nosača za imobilizaciju i metode imobilizacije, koja zavisi od karakteristika i nosača i enzima. Ova

dva koraka su uvek isprepletana, a složena interakcija nosača, enzima i metode se evaluira praćenjem različitih karakteristika imobilisanih enzima definisanih u poglavlju 2.1.2.3.

Tabela 2.1. Prednosti i mane imobilizacije enzima.

<i>Prednosti</i>	<i>Mane</i>
<i>1. Mogućnost višestruke upotrebe biokatalizatora</i>	1. Gubitak ili smanjenje aktivnosti enzima
<i>2. Lakše odvajanje proizvoda</i>	2. Pojava difuzionih limitacija
<i>3. Lakša manipulacija tokom procesa</i>	3. Dodatni troškovi
<i>4. Veći izbor reaktora koji mogu biti korišćeni</i>	

2.1.2.1. Izbor nosača

Na osnovu strukture molekula enzima potrebno je prvo izabrati odgovarajući nosač. Idealan nosač treba da ima osobine kao što su mehanička otpornost, hidrofobnost, biokompatibilnost, otpornost prema mikrobiološkoj kontaminaciji, dostupnost i nisku cenu.^{13, 14}

Nosače možemo klasifikovati kao neorganske (bentonit, silika, staklo, oksidi metala i metali) i organske na osnovu njihovog prirode. Organske nosače možemo podeliti na prirodne, kao što su polisaharidi (celuloza, dekstran, agar, agaroz, hitin i alginat), proteini (kolagen, albumin, kazein) i ugljenik i sintetske polimere (polistiren, polimetilakrilat, poliakrilamid, poliamidi, vinil- i alil-polimeri).¹⁵

Nosači mogu biti sintetisani u obliku zrna, membrana, vlakana, cevi ili kapsula različitih veličina.

Fizičke osobine nosača kao što su prečnik čestica, prečnik pora, sposobnost bubrenja, mehanička jačina i otpornost prema visokim pritiscima će odrediti uslove pod kojima se imobilisan sistem može primeniti, tj. diktiraće izbor reaktora kao i operativne uslove samog procesa.

Konkretno veličina čestica i pora određuju ukupnu površinu koja je dostupna enzimu za vezivanje. Neporozni nosači imaju manju površinu za vezivanje enzima, ali je zato smanjena mogućnost pojave difuzionih limitacija. Porozni nosači imaju daleko veću površinu za vezivanje enzima, pored toga pore štite enzim od spoljašnjih uticaja, međutim mora se imati na umu da to ostavlja mogućnost pojave difuzionih limitacija. Kako bi se

svela na minimum mogućnost pojave difuzionih limitacija nosač mora imati kontrolisanu raspodelu veličine pora.¹⁶

Iz svega navedenog može se zaključiti da ne postoji univerzalni nosač koji će odgovarati svim enzimima i reaktorskim sistemima.

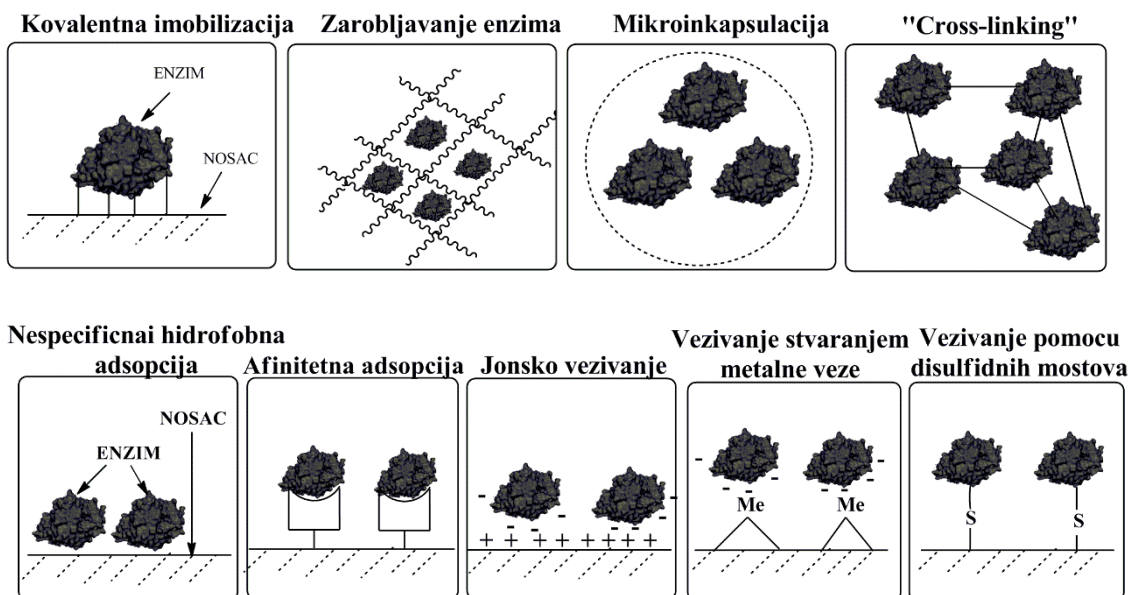
2.1.2.2. Podela metoda imobilizacije enzima

Izbor metode će pre svega zavisiti od strukture samog enzima i njegove primene, ali i od karakteristika nosača kao što su inertnost i biokompatibilnost, tj. nosač ne sme uticati na nativnu strukturu enzima. Na osnovu tipa veza koje se javljaju između nosača i enzima metode za imobilizaciju enzima možemo poseliti u dve kategorije: hemijske i fizičke metode. Hemijske metode se zasnivaju na stvaranju bar jedne hemijske veze između molekula enzima i nosača. U najvećem broju slučajeva one su irevezibilne. Irevezibilno vezivanje enzima na nosač znači da on ne može da se „skine“ sa nosača a da ne dođe do narušavanja njegove strukture a samim tim i njegove biološke aktivnosti. Fizičke metode se zasnivaju na nekovalentnim interakcijama između molekula enzima i nosača ili na mehaničkom smeštanju enzima u određeni deo prostora. Za ove metode imobilizacije je karakteristično da enzimi nakon vezivanja na nosače mogu da se veoma jednostavno uklone sa nosača i ponovo koriste. Atraktivnost ovih metoda je u tome što se, kada opadne aktivnost imobilisanih enzima, na nosač mogu ponovo imobilisati „sveži“ enzimi nakon uklanjanja enzima koji je izgubio aktivnost. Sa ekonomskog stanovišta ovo je jako povoljno jer se često dešava da u ukupnoj ceni imobilisanog sistema najveću stavku predstavlja upravo nosač. Takođe, ove metode su pogodne za vezivanje enzima koji su veoma nestabilni i osetljivi, čime se proširuje njihova primena kao biokatalizatora.

Uža podela metoda imobilizacije bi bila sledeća (slika 2.1.):

1. kovalentna imobilizacija enzima,
2. adsorpcija enzima na čvrste nosače,
3. zarobljavanje enzima,
4. mikroinkapsulacija,
5. „Cross-linking“.

Detaljnije će biti opisane kovalentna imobilizacija enzima i adsorpcija enzima na čvrste nosače jer će samo ove dve grupe metoda biti primenjene u eksperimentalnom delu ove disertacije.



Slika 2.1. Šematski prikaz metoda imobilizacije enzima.

2.1.2.2.1. Kovalentna imobilizacija enzima

Imobilizacija enzima ovom metodom zasniva se na stvaranju kovalentnih veza između funkcionalnih grupa prisutnih na površini molekula enzima i funkcionalnih grupa prisutnih na površini nosača. Ovo je jedna od najviše korišćenih metoda za imobilizaciju enzima. Njena prednost je u činjenici da su kovalentne veze koje se formiraju stabilne i jake čime je onemogućeno „spiranje“ enzima sa površine nosača. Prilikom imobilizacije enzima ovom metodom mora se voditi računa da u stvaranju kovalentnih veza ne učestvuju aminokiselinski ostaci koji se nalaze u sklopu aktivnog centra enzima jer time može doći do smanjene aktivnosti enzima. Postoje dva načina da se pospeši stvaranje kovalentnih veza između nosača i enzima. Prvi način je da se površina nosača modifikuje kako bi se uvele funkcionalne grupe koje mogu da grade kovalentnu vezu sa aminokiselinskim ostacima enzima. Proces modifikacije površine nosača sastoji se najčešće od uvođenja elektrofilnih grupa na površinu nosača koje onda mogu da reaguju sa jakim nukleofilnim grupama enzima. Najčešće korišćeni agensi za modifikaciju površine nosača su: epihlorhidrin, glutaraldehyd, cijanogen-bromid, sulfonil-hlorid, epoksidi i dr.^{17, 18} Aminokiselinski ostaci enzima koji najčešće učestvuju u građenju kovalentnih veza su ostaci lizina (ϵ -amino grupe), cisteina (tiole grupe), asparaginske i glutaminske kiseline (karboksilna grupa). Kovalentne veze koje mogu da nastanu između enzima i nosača su amidne, etarske, tioetarske i karbamidne.³

Drugi način je da se modifikuje površina enzima kako bi se odgovarajuće grupe aktivirale pri čemu bi bilo omogućeno stvaranje kovalentnih veza sa nosačem. Često se primenjuje oksidacija ugljenohidratne frakcije perjodatom kojom se stvaraju karbonilne grupe ili aktivacija amino grupa lizina karbodiimidom.

Za enzime koji u svojoj strukturi sadrže puno cisteina, a samim tim i tiolnih grupa u bočnim ostacima, karakteristično je da se mogu imobilisati na nosače bogate tiolnim ili tiosulfatnim grupama obrazujući takozvane disulfidne mostove.¹³ Iako je formirana veza između enzima i nosača stabilna i kovalentna ona se može lako raskinuti tretiranjem imobilisanog enzima sa ditiotreitolum (DTT) ili nekim drugim kompetitivnim agensom male molekulske mase koji poseduje tiolnu grupu.

2.1.2.2.2. Adsorpcija enzima na čvrste nosače

- 1. Nespecifična adsorpcija**-je najjednostavniji način vezivanja enzima koji se bazira na stvaranju slabih veza i to vodoničnih veza, van der Waals-ovih sila i hidrofobnih interakcija. Ovako vezan enzim se lako može desorbovati sa nosača promenom uslova imobilizacije kao što su jonska jačina ili polarnost rastvora, pH ili temperatura.
- 2. Stvaranje jonskih veza**-enzim se vezuje za nosač stvaranjem jonskih veza. Najčešće se dešava u uslovima kada su enzim i nosač suprotno naelektrisani. Problem se može javiti u slučajevima kada su supstrat ili proizvod naelektrisani usled interakcija sa naelektrisanim nosačem.
- 3. Hidrofobna adsorpcija**-je vezivanje enzima stvaranjem hidrofobnih interakcija između hidrofobnih oblasti molekula enzima i hidrofobnog nosača. Zavisi od stepena hidrofobnosti kako enzima tako i nosača. Na formiranje hidrofobnih interakcija može se uticati podešavanjem pH, jonske jačine i temperature.
- 4. Afinitetna adsorpcija**-zasniva se na vezivanju molekula na osnovu biokompatibilnosti. Ovo je veoma selektivna metoda koja se prvenstveno koristi u bioseparacionom inženjerstvu za izolovanje proteina. Međutim, ona je jako skupa jer se na nosač prvo mora vezati afinitetni ligand (kao što su npr. antitela, koenzim, analog supstrata ili lektin) za koji se specifično može vezati odgovarajući enzim.

2.1.3. Osobine imobilisanih enzima

Osnovne osobine koje karakterišu enzime su aktivnost, specifičnost (selektivnost) i stabilnost.¹⁹

Određivanje efikasnosti i relativne količina enzima u enzimskim preparatima vrši se merenjem aktivnosti enzima, odnosno brzine reakcije koju katalizuju. Katalitička aktivnost ustvari obezbeđuje efikasan način da se dati enzim kvantitativno i kvalitativno odredi.¹⁹ Kako bi rezultati bili validni moraju se ispoštovati određena pravila i obezbediti odgovarajući uslovi tj. da se održavaju konstantni uslovi izvođenja reakcije kao što su pH i temperatura. Pod tim uslovima izmerena aktivnost je proporcionalna količini datog enzima. Za određivanje aktivnosti enzima koriste se različite metode: spektrofotometrijske, hemijske, polarimetrijske, gasometrijske, viskozimetrijske, radiohemijske, fluorimetrijske i dr. Koja će metoda za određivanje aktivnosti enzima biti primenjena direktno zavisi od fizičko-hemijske promene koja se odigrava u toku izvođenja reakcije. Vrednosti za aktivnost enzima se izražavaju u enzimskim jedinicama (na engl. Unit (U)). Pod jednom internacionalnom jedinicom podrazumeva se ona količina enzima koja pod određenim uslovima (pH i temperatura) za vreme od jednog minuta katalizuje transformaciju jednog mikromola supstrata. Aktivnost enzima se može izražavati kao ukupna aktivnost (U), aktivnost po jedinici mase enzimskog preparata (U/mg) ili aktivnost po jedinici zapremine (U/ml). Često se u praksi određuje i specifična aktivnost koja predstavlja broj jedinica aktivnosti po jednom miligramu proteina u enzimskom preparatu.¹⁹

Specifičnost enzima se ogleda u činjenici da od velikog broja mogućih reakcija katalizuju samo jednu od njih. Pa tako jedan enzim može da deluje na više različitih supstrata ali je neophodno da se u njima nalaze ili odgovarajuće atomske grupe ili veze. Neki enzimi katališu određene tipove reakcija bez obzira na strukturu supstrata. Primer takvih enzima su lipaze koje katalizuju hidrolizu estarskih veza u velikom broju supstrata čija se struktura razlikuje. Takođe, postoje i enzimi čija se specifičnost ogleda u činjenici da isključivo deluju samo na jedan od dva moguća stereohemijska oblika supstrata. U industriji se susreću i osobine enzima kao što su regiospecifičnost i enantiospecifičnost koje se odnose se na sposobnost enzima da deluje na samo u jednom regionu supstrata odnosno da deluje samo na jedan optički izomer supstrata. Postoji više teorija koje objašnjavaju specifičnost enzima. Po Fišeru specifičnost enzima ka određenom supstratu

se može objasniti geometrijskom komplementarnošću koja postoji između molekula enzima i molekula supstrata. Košland je dopunio Fišerovu teoriju tvrdeći da komplementarnost između aktivnog mesta enzima i supstrata nije maksimalna, već da pri vezivanju supstrata dolazi do konformacionih promena unutar molekula enzima nakon čega njihova komplementarnost postaje potpuna. Košlandova teorija objašnjava specifičnost dejstva enzima ali ne i sam mehanizam enzimske reakcije. Savremene teorije koje se bave objašnjavanjem mehanizma reakcije počivaju na činjenici da pored konformacionih promena u molekulu enzima dolazi i do konformacionih promena i u molekulu supstrata.^{19, 20} Pošto često prilikom imobilizacije dolazi do promene konformacije enzima ili promene uslova u okolini aktivnog centra, imobilizacija enzima se ponekad koristi kao efikasno sredstvo za promenu specifičnosti enzima, naročito kada se radi o sintezi željenog optičkog izomera sa fiziološkim dejstvom.

Stabilnost enzima je veoma važna osobina i odnosi se na činjenicu da enzim ispoljava svoju optimalnu aktivnost samo kada se nalazi u svojoj nativnoj konformaciji odnosno onda kada se nalazi u svom prirodnom okruženju. Delovanjem nekih rastvarača ili denaturanata kao i promenom fizičkih uslova može da dođe do denaturacije enzima što direktno dovodi do gubitka aktivnosti enzima. Denaturacija podrazumeva promenu konformacije molekula enzima usled raskidanja veza koje određuju njegovu sekundarnu i tercijarnu strukturu. Nativna konformacija enzima pri kojoj on ispoljava svoju aktivnost je jedinstvena, dok denaturisan enzim koji pored toga što je neaktivan može zauzimati više različitih konformacija. Pod ograničenim uslovima (uzan interval pH i temperature) favorizovana je nativna konformacija.¹⁹

U industrijskim procesima enzim je podložan dejstvu povišenog pritiska, mehaničkih sila smicanja i hemijskih faktora (organski rastvarači, deterdženti i dr.) koje mogu dovesti do njegove denaturacije, a time i do gubitka aktivnosti. Imobilizacijom enzima navedene ključne osobine molekula enzima mogu biti promenjene što u većini slučajeva dovodi do povećanja katalitičke aktivnosti i stabilnosti (temperaturni i pH profil).^{21, 22} Kao i slučaju slobodnog enzima i imobilisan enzim karakterišu aktivnost, stabilnost i specifičnost (selektivnost).

Dakle, neophodno je definisati parametre na osnovu kojih se može proceniti uspešnost primenjene tehnike imobilizacije. U okviru ove disertacije biće praćeni sledeći parametri koji će se koristiti za procenjivanje kvaliteta imobilisanih enzima:

1. Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g). Aktivnost i stabilnost imobilisanog enzima zavise od količine imobilisanog enzima, naročito ako je koncentracija imobilisanog enzima manja od one koja je potrebna za formiranje monosloja na površini nosača. Dokazano je da se maksimalna aktivnost imobilisanog enzima adsorpcijom postiže pri onoj koncentraciji imobilisanog enzima koja odgovara monosloju. Treba napomenuti i da je koncentracija imobilisanog enzima proporcionalna specifičnoj površini neporoznih nosača.
2. Prinos imobilizacije proteina (%) - parametar koji predstavlja odnos mase imobilisanog enzima i mase slobodnog enzima na početku imobilizacije. Koncentracija enzima u rastvoru na početku imobilizacije ima veliki uticaj na obim imobilizacije enzima pa samim tim i na aktivnost imobilisanog enzima.
3. Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) - ukupna aktivnost imobilisanog enzima po jedinici mase suvog nosača unetog u imobilizaciju.
4. Prinos imobilizacije aktivnosti (%) - predstavlja odnos imobilisane aktivnosti i aktivnosti slobodnog enzima na početku imobilizacije. Ovaj parametar kvantitativno pokazuje koliko je aktivnosti enzim zadržao od početne aktivnosti u toku samog postupka imobilizacije.
5. Produktivnost procesa (kg/IU) - predstavlja količinu proizvedenog proizvoda po jedinici aktivnosti enzima dajući sveukupnu ocenu imobilisanog sistema. Produktivnost procesa direktno zavisi od broja ciklusa u šaržnom sistemu ili operativne stabilnosti imobilisanog enzima u kontinualnom sistemu.
6. Operativna stabilnost imobilisanih enzima se može odrediti primenom imobilisanih preparata u više reakcionih ciklusa. Za svaki ciklus se određuje aktivnost imobilisanog enzima (IU/g) koja se poredi sa aktivnošću imobilisanog enzima u nultom ciklusu. Pad aktivnosti tokom višestruke upotrebe omogućava da se proceni stabilnost dobijenog imobilisanog enzima.

2.2. Imobilizacija enzima na nosače nano-dimenzija

Nanomaterijali su proizvodi nanotehnologija, sastoje se od čestica čije su dimenzije manje od 100 nm. Veliki je interes za primenu nanomaterijala u biomedicini kao biosenzora, nosača za lekove, DNK i enzime.²³

U poslednje vreme se za imobilizaciju enzima koriste materijali nano-dimenzija, što je posledica činjenice da se nauka o nanomaterijalima sve više razvija i da je u svetu najveći deo istraživanja fokusiran upravo na sintezu ovog tipa materijala. Trenutno se u literaturi može pronaći nekoliko tipova nanomaterijala koji se koriste kao nosači za imobilizaciju enzima kao što su npr. nanocevi, nanovlakna, nanočestice (porozne i neporozne), nanokompozitni materijali, materijali dobijeni sol-gel transformacijama koji sadrže čestice nano-dimenzija i “single-enzyme” nanočestice.

2.2.1. Prednosti i nedostaci upotrebe nosača nano-dimenzija

Upotreba nanomaterijala nudi mnoge prednosti zahvaljujući pre svega njihovom malom prečniku i fizičkim karakteristikama (provodljivost i magnetne osobine). Prednost primene nanomaterijala kao nosača za imobilizaciju enzima u poređenju sa imobilizacijom enzima na konvencionalne nosače su:

1. lako se mogu sintetisati iz suspenzija koje imaju visok sadržaj čvrste faze bez primene toksičnih agenasa ili surfaktanata,
2. površina sintetisanih nanomaterijala je homogena strukture i tokom sinteze može se podešavati njihova veličina,
3. manji uticaj difuzionih limitacija pri prenosu supstrata,
4. veliki kapacitet površine za vezivanje enzima.²⁴

Pokazalo se da primena nanomaterijala omogućava dobijanje imobilisanih enzima veće aktivnosti, modifikovane selektivnosti i neuporedivo bolju stabilnost u poređenju sa enzimima imobilisanim na konvencionalne nosače. Zbog svojih dobrih karakteristika nanobiokatalizatori su našli primenu u medicini, farmaciji, tekstilnoj industriji i dr.^{24, 25} Međutim, veliki troškovi, kompleksna procedura sinteze nanomaterijala kao i problem separacije iz reakcionog medijuma su glavne prepreke za njihovu širu primenu u procesima na industrijskom nivou.

2.2.2. Vrste nanočestica koje se koriste za imobilizaciju enzima

Od svih navedenih tipova nanomaterijala, nanočestice imaju prednost jer su hemijski stabilne, uniformne veličine, dobro se disperguju u tečnostima i jako su korisne u

procesima većih razmera.²³ Zbog svojih hemijskih, fizičkih i bioloških osobina imaju prednost u odnosu na konvencionalne nosače. Na osnovu vrste materijala od koji su napravljene možemo ih klasifikovati u dve grupe:

1. Nanočestice koje sadrže neorganske elemente kao što su metali ili oksidi metala (npr. srebro, zlato, cirkonijum, poluprovodnici, Fe_3O_4 , SiO_2 , TiO_2),
2. Nanočestice koje u svojoj strukturi sadrže organske molekule kao što su ugljenične nanocevi, lipozomi ili razgranati organski polimerni molekuli (dendrimeri).

Najčešće se nalaze u obliku sfere, cevi, vlakna, roga ili kaveza.²⁶

U daljem tekstu će biti navedene i objašnjene one nanočestice koje su se dosad pokazale kao značajne u kontekstu imobilizacije enzima.

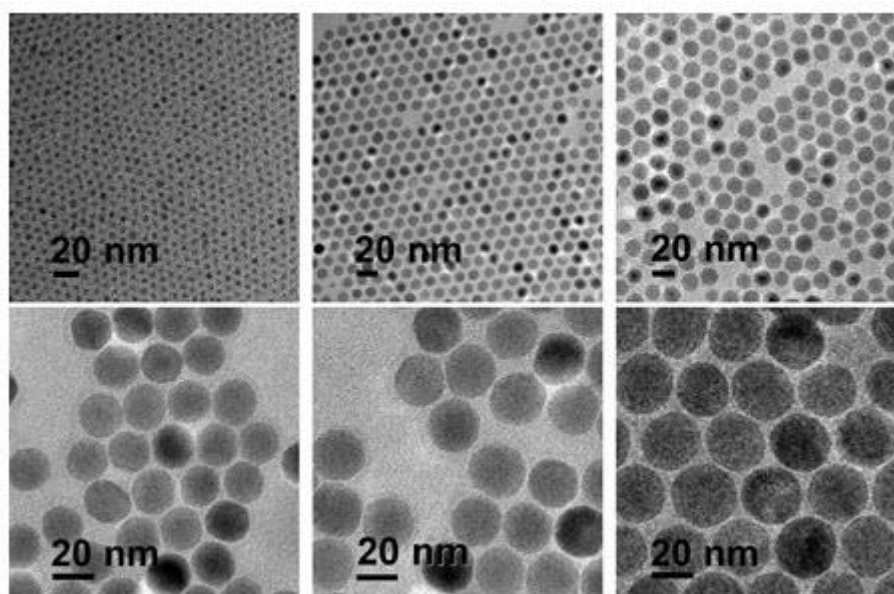
2.2.2.1. Nanočestice oksida metala

Nanočestice oksida metala su privukle jako veliku pažnju zbog svojih optičkih, magnetnih i elektronskih osobina. Fizičko-hemijske osobine koje poseduju ove nanočestice direktno zavise od njihove veličine i oblika. Ova vrsta nanočestica je pogodna za primenu u katalizi kao nosači za enzime, za pravljenje organskih dioda koje emituju svetlost i uređaja koji služe za skladištenje elektrohemijske energije, u konstrukciji biosenzora i dr. Imobilizacija enzima na nanočestice oksida metala može biti dobra platforma za konstrukciju biosenzora sa više različitih strategija za čitanje signala kao što su elektrohemijska, kolorimetrijska, fluorometrijska i dr.²⁷

2.2.2.1.1. Magnetne nanočestice i superparamagnetne nanočestice

Magnetne nanočestice i superparamagnetne nanočestice magnetita (Fe_3O_4), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), vustita (FeO) i sintetičkog maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) su u skorije vreme počele da se koriste kao nosači za imobilizaciju enzima zahvaljujući svojim karakteristikama kao što je biokompatibilnost, velika specifična površina, pokretljivost i male difuzione limitacije pri prenosu mase. TEM karakterizacija sfernih magnetnih nanočestica je prikazana na slici 2.2. Korišćenjem ovog tipa nanomaterijala mogu se smanjiti kapitalni i operativni troškovi procesa proizvodnje jer se one lako odvajaju od reakcionog medijuma korišćenjem magnetnog polja pri čemu ne dolazi do njihove aglomeracije.²⁶ Takođe, one mogu biti stabilizovane u reaktorima sa fluidizovanim slojem primenom spoljašnjeg magnetnog polja.²⁸ Imobilizacijom enzima na magnetne nanočestice omogućava se njihovo brzo izdvajanje iz reakcione smeše i upotreba u više ciklusa.²⁹

Do sada su na superparamagnetne nanočestice uspešno imobilisani: enzimi (aminopeptidaze, lipaze, pektinaze, fosfataze, glukozo-oksidge, glukozidaze, celulaze, esteraze, laktat-dehidrogenaze i RNK polimeraze), antitela i lizozimi.³⁰ FeO nanočestice su se pokazale kao dobar nosač za imobilizaciju lipaza.³¹ Dodatno zbog osobina koje poseduju, kao što su pre svega biokompatibilnost i velika specifična površina, ove nanočestice su se pokazale i kao jako dobre za koncentrovanje, odvajanje, prečišćavanje i identifikaciju određenih molekula i ćelija.²⁶



Slika 2.2. TEM slika magnetnih nanočestica.³²

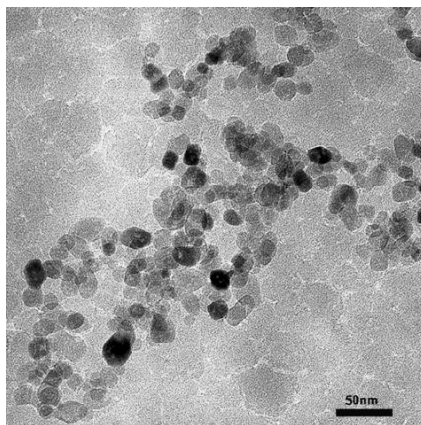
Superparamagnetne nanočestice su našle primenu i u medicini kako u dijagnostici tako i u terapiji.³³

Sa druge strane treba napomenuti da nemodifikovane magnetne nanočestice imaju sklonost ka formiranju agregata, promeni magnetnih osobina usled oksidacije pri kontaktu sa vazduhom i biodegradaciji kada su direktno izložene uticaju bioloških materijala zbog čega je modifikacija površine neophodna. Ovi problemi se mogu prevazići oblaganjem površine ovih čestica pomoću malih organskih molekula, polimera, surfaktanata i biomolekula ili stvaranjem tankog neorganskog filma na površini pomoću oksida ili sulfida metala. Dokazano je da se korišćenjem inertne silike za stvaranje tankog filma na površini superparamagnetnih čestica poboljšava njihova hemijska stabilnost. Dobijeni tanak film je bogat silanol grupama koje dalje mogu biti modifikovane u cilju uvođenja grupa za kovalentno vezivanje različitih bioloških struktura na površinu superparamagnetnih nanočestica. Ovakav način modifikacije površine

superparamagnetnih nanočestica su primenili Cui i sar.³⁴ u svojim istraživanjima pa su tako Fe₃O₄ nanočestice prvo modifikovali sa tetraetilortosilanom (TEOS) kako bi uveli silanol grupe na njihovu površinu, a potom su modifikovane nanočestice tretirali sa γ -aminopropiltrioksisilanom (APTES). Kao rezultat dvostepene modifikacije dobijene su čestice sa amino grupama na površini. Ovako pripremljene magnetne nanočestice su koristili za imobilizaciju lipaze.

2.2.2.1.2. Nanočestice titanijum(IV)-oksida

Nanočestice titanijum(IV)-oksida (TiO₂) (slika 2.3.) su poznate po svojim fotokatalitičkim karakteristikama što ih preporučuje za primenu u fotoelektrohemiji. Ova njihova osobina je uspešno iskorišćena za konstrukciju imunosenzora za α -fetoprotein.³⁵ TiO₂ nanočestice pored dobrih mehaničkih karakteristika i biokompatibilnosti izdvaja sposobnost provodljivosti kiseoničnog jona. Ideja da se ove nanočestice koriste za imobilizaciju enzima javila se kada su Kosnier i sar.³⁶ imobilisali glukoza-oksidadu i tako napravili biosenzor za glukozu. Imobilizacijom askorbat-oksidade na nanočestice TiO₂ dobijen je biosenzor koji omogućava elektrohemijsko praćenje koncentracije vitamina C u hrani i namirnicama na veoma jednostavan način koji se upravo zasniva na osobini ovih čestica da prenose jon kiseonika.³⁷



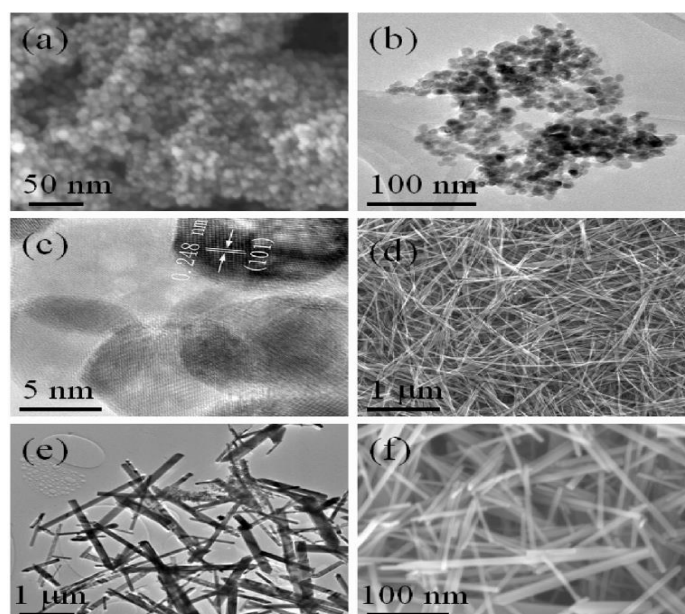
Slika 2.3. TEM karakterizacija TiO₂ nanočestica.³⁸

Bang i sar.³⁹ su imobilisali lizozim izolovan iz jajeta na nanočestice TiO₂ i pokazali da se time povećava i stabilizuje antimikrobna aktivnost ovog enzima prema bakteriji *Escherihia coli*. Imobilizacijom alkalne proteaze na TiO₂ nanočestice dolazi do značajnog povećanja pH i temperaturnog optimuma ovog enzima u odnosu na slobodni enzim.⁴⁰ Takođe, alkalna proteaza imobilisana na TiO₂ se može iz reakcione smeše lako izdvojiti sedimentacijom ili blagim centrifugiranjem i uspešno koristiti tokom 4 ciklusa.

Dokazano je da TiO_2 nanočestice mogu da pomognu u regeneraciji enzima (konkretno na ribonukleazi A i papapinu) koji su denaturisani usled tretmana visokim temperaturama.⁴¹ Denaturisani enzimi (koji su pozitivno naelektrisani tokom regeneracije) se elektrostatičkim interakcijama vežu za TiO_2 nanočestice i nakon tretmana rastvorom soli tokom 1 h dolazi do regeneracije strukture enzima i njihovog eluiranja sa površine nosača. Regenerisani enzimi su povratili skoro 100 % od svoje aktivnosti pre termičkog tretmana. Ova saznanja mogu biti značajna u razvijanju nanobiokatalizatora kao i nanotoksikologije jer u ovim disciplinama dominantnu ulogu imaju interakcije stvorene između nanočestica i proteina.

2.2.2.1.3. Nanočestice cink(II)-oksida

Kao poluprovodnici nanočestice cink(II)-oksida (ZnO) imaju veoma važnu ulogu u optici, optoelektronici i konstrukciji senzora zbog svojih poluprovodnih, piezoelektričnih i piroelektričnih osobina. TEM, SEM i HRTEM karakterizacija sfernih i cevastih TiO_2 nanočestica u rastvoru NaOH u metanolu je prikazana na slici 2.4.



Slika 2.4. TEM, SEM i HRTEM analiza ZnO nanočestica u obliku sfera (a, b,c) i nanocevi (d,e,f).⁴²

Ove nanočestice ne samo da poseduju veliku specifičnu površinu, dobru biokompatibilnost i hemijsku stabilnost, već su i netoksične, pokazuju dobru biomimetiku i sposobnost razmene elektrona što ih preporučuju kao izvanredan materijal za konstrukciju biosenzora. Kao biokompatibilan materijal nanočestice ZnO imaju visoku izoelektričnu tačku koja iznosi 9,5 što ih čini pogodnim za adsorpciju proteina sa niskim

vrednostima za pI.⁴³ Do sada su uspešno imobilisani pretežno elektrostatičkim interakcijama na ove nanočestice sledeći enzimi: glukoza-oksidaza, holin-oksidaza, peroksidaza, tirozinaza, ksantin-oksidaza, laktat-oksidaza, urikaza i acetilholin-esteraza, a kao rezultat imobilizacije ovih enzima konstruisani su biosenzori za glukozu, holesterol, vodonik peroksid, fenolna jedinjenja, hemoglobin, ureu i uronsku kiselinu.²⁷

2.2.2.1.4. Ostali oksidi metala

Pored pomenutih oksida metala u literaturi se kao potencijalni nosači za imobilizaciju enzima još pominju i nikel(II)-oksid, mangan(II)- i (III)-oksid, aluminijum(III)-oksid i dr. Značajno je napomenuti da su Ansari i sar.⁴⁴ imobilisali β -galaktozidazu iz *Kluyveromyces lactis* na konkavalinom A obložene nanočestice Al_2O_3 čime su povećali njen pH i temperaturni optimum, kao i operativnu stabilnost pošto je ovako imobilisana β -galaktozidaza zadržala 85 % od početne aktivnosti nakon 4 ciklusa. Gunčeva i sar.⁴⁵ su kao nosač za imobilizaciju lipase izolovane iz kvasca *C. rugosa* koristili kalaj(IV)-oksid. Njihovi rezultati su pokazali da se ovom imobilizacijom dobija za 45 % aktivnija lipaza u odnosu na slobodnu lipazu.

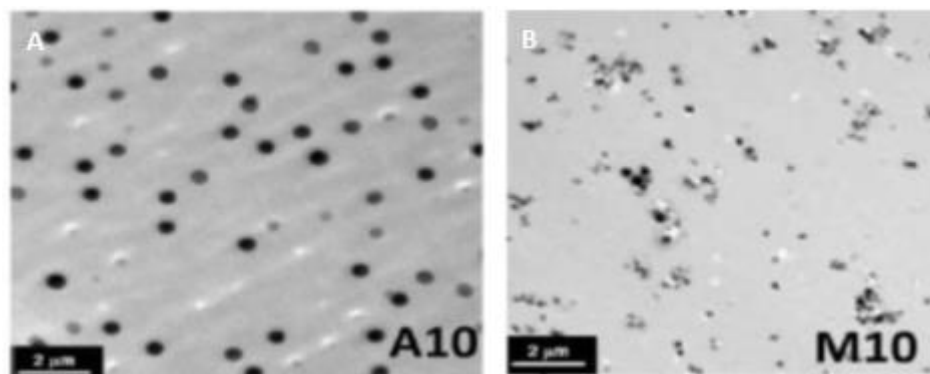
2.2.2.2. Nanočestice silicijum-dioksida

Silika (SiO_2) nanočestice su privukle pažnju zbog svoje strukture tj. zbog postojanja Si-OH grupa na njihovoj površini. Silanol grupe omogućavaju laku modifikaciju površine čestica različitim bifunkcionalnim agensima. Nakon završene modifikacije na površinu silike mogu biti uvedene različite funkcionalne grupe kao što su amino, karboksilne, aldehidne, tiolne i dr.

Nanočestice silike različite morfologije su komercijalno dostupne, ali se mogu sintetisati i u laboratoriji. Koloidna silika se može lako sintetisati po metodi koju su razvili Šteber i sar.⁴⁶ Po ovoj metodi sferne monodispergovane nanočestice silike različitih dimenzija se sintetisu jednostavno i brzo hidrolizom tetraetilortosilana (TEOS), koji potom kondenzuje sa silikatnom kiselinom u prisustvu amonijaka (katalizator).

Komercijalno dostupne nanočestice silike mogu biti u obliku agregata ili kao pojedinačne čestice različitih veličina (slika 2.5.). Najrasprostranjeniji industrijski postupak sinteze ovih čestica je piro-hidrogenizacija. Nanočestice dobijene ovim postupkom su amorfne i nalaze se u obliku agregata. Takođe, amorfne nanočestice silike mogu biti neporozne, porozne i mezoporozne. Veličina pora zavisice od uslova i načina sinteze. Porozna nanosilika ima tačno definisan raspored i veličinu pora, veliku specifičnu površinu po

jedinici mase i dobru stabilnost. Mezoporozna silika ima pore veličine od 2 do 15 nm heksagonalne ili kubne geometrije.



Slika 2.5. TEM slika: monodispergovanih silika nanočestica (levo) i agregata silika nanočestica (desno).⁴⁷

Neporozne, amorfne SiO₂ nanočestice se mogu koristiti za inkapsulaciju enzima, bakterija i malignih ćelija.⁴⁸ Za imobilizaciju enzima koriste se još porozne⁴⁹ i mezoporozne nanočestice silike⁵⁰.

Silika je veoma često korišćen materijal za imobilizaciju enzima,^{51, 52} međutim još uvek nije došlo do njene primene na industrijskom nivou. Upravo njihova veličina onemogućava njihovu upotrebu u protočnim reaktorima, a ograničava njihovu upotrebu u šaržnom sistemu.⁴⁸

2.2.2.3. Nanočestice zlata

Primena nanočestica zlata se zasniva na njihovim jedinstvenim osobinama, a posebno na visokoj relativnoj gustini 6s orbitala u veoma malom atomskom radijusu. Upravo jedinstvene osobine (male dimenzije, elektrohemijske osobine koje zavise od veličine čestica, biokompatibilnost i velika hemijska stabilnost) omogućavaju primenu ovih nanočestica u medicini i molekularnoj biologiji (one su netoksične i biokompatibilne kako u *in vivo* tako i u *in vitro* uslovima) kao biosenzori, tumor markeri i “nosači” lekova.⁵³ Jedna od najznačajnijih primena ovih nanočestica je u detektovanju prisustva HIV virusa u krvi ljudi.⁵⁴ Nanočestice zlata su zbog svojih osobina pogodne za imobilizaciju enzima.^{55, 56} Većina tehnika imobilizacije enzima na ove nanočestice se zasniva na formiranju Au-S kovalentne veze.^{25, 57, 58} Kako bi se dodatno povećala biokompatibilnost ovih čestica i sprečilo stvaranje agregata njihova površina se može modifikovati organosilanima čime je proširena njihova primena kao nosača za imobilizaciju enzima.⁵⁹

2.2.2.4. Cirkon nanočestice

Cirkon (ZrO_2) je polimorfni materijal koji postoji u tri od temperature zavisne forme: prizmatičnoj, tetragonalnoj i kupastoj. ZrO_2 je bioinertan, hemijski inertan i ima dobre optičke i mehaničke karakteristike. Velika termička i pH stabilnost cirkona preporučuje ga za korišćenje kao nosača za imobilizaciju enzima, konstrukciju biosenzora i u enzimskim reaktorskim sistemima. Samo nekoliko radova je objavljeno o upotrebi cirkona kao nosača za imobilizaciju enzima.⁶⁰ U cilju konstrukcije biosenzora na ZrO_2 nanočestice su imobilisane bilirubin-oksidaza, acetilholin-esteraza i glukoza-oksidaza.⁶¹ Konkretno nanočestice ZrO_2 presvučene slojem hitozana na koje je imobilisana acetilholin-esteraza koriste se kao biosenzori za određivanje koncentracije pesticida u uzorcima povrća.⁶¹ Lipaze proizvedene *C. rugosa* i *Pseudomonas cepacia* su uspešno imobilisane na ove nanočestice.⁶³

2.2.2.5. Nanodijamant

Nanodijamant su najstabilnije nanočestice ugljenika sfernog oblika čiji prečnik ide do najviše 5 nm. Jedna čestica ima supermolekularnu strukturu i sastoji se od jednog kristalnog dijamantskog jezgra koje je obavijeno funkcionalnim grupama (hidroksilne, etarske, karbonilne grupe kao i amidne, cijano i nitro grupe) u vidu „omotača“. Funkcionalne grupe su hemijski vezane za dijamantsko jezgro i one određuju osobine površine nanodijamantne čestice. Atomi ugljenika su pravilno raspoređeni u jezgru dok je u omotaču njihov raspored nepravilan. U zavisnosti od načina proizvodnje pored atoma ugljenika u strukturi nanodijamanta mogu se naći i neki drugi atomi kao što su Fe, K, Ca, Ti, Zn, Pb i dr. Površina nanodijamanta je pogodna za adsorpciju gasova kao što su CO_2 , NO, CO i time se dodatno narušava struktura površine nanodijamanta. Ove nanočestice teže da stvaraju agregate veličine i do 200 μm . Agregacija se može sprečiti modifikacijom površine ovih nanočestica organosilanima ili tretmanom ultrazvukom.⁶⁴ Nanodijamant poseduje fizičke osobine kao što su tvrdoća i dobra termička provodljivost koje omogućavaju njegovu široku primenu. Površina nanodijamanta predstavlja jedinstvenu platformu za vezivanje biomaterijala. Dosada su na modifikovanu površinu nanodijamanta uspešno imobilisani DNK, antigeni, citohrom c i hormoni.⁶⁰ Kruger i sar.⁶⁵ su objavili studiju u kojoj je nanodijamant korišćen kao nosač za kovalentnu imobilizaciju enzima.

2.2.2.6. Nanografit

Pored primene u elektronici i za proizvodnju poluprovodnika, grafit sa svojom velikom specifičnom površinom po jedinici mase, izuzetnom hemijskom i termičkom stabilnošću i dobrom električnom provodljivošću može se koristiti i kao nosač za biološki materijal. U skorije vreme pokrenuta su istraživanja sa ciljem korišćenja grafita kao nosača biomolekula i lekova za lečenje tumora sa mogućnošću da dolazi do njihovog otpuštanja na odgovarajućem mestu u organizmu. Treba napomenuti da za razliku od običnog grafita koji je hidrofoban, nanografit je hidrofilan jer na svojoj površini ima hidroksilne i karboksilne grupe što daje mogućnost njegove dobre disperzije u vodenim rastvorima. Prisutne hidroksilne i karboksilne grupe, iako u malom procentu (maksimalno do 8 %), su dovoljne da bi se enzimi vezali za površinu ovih čestica elektrostatičkim interakcijama ili stvaranjem vodoničnih veza.⁶⁶ Na nanografit do sada su uspešno imobilisane tirozinaza,⁶⁷ celulaza²⁸ i β -galaktozidaza.^{28, 68}

2.2.2.7. Hitozan nanočestice

Hitozan je organski polimer koji u svojoj strukturi sadrži terminalne hidroksilne i amino grupe. Upravo zbog prisustva ovih grupa veoma se često koristi za imobilizaciju enzima.⁶⁹ Za imobilizaciju se koriste različite geometrijske strukture hitozana kao što su prahovi, hidrogelovi, membrane, vlakna i dr.¹⁰ Tretiranjem hitozana razblaženim kiselinama dobija se polimer sa NH_3^+ jonima na površini. Ovako formiran katjonski polimer ima fizičke i hemijske osobine koje ga razlikuju od prirodnih biljnih vlakana. Zahvaljujući osobinama kao što su biodegradabilnost, biokompatibilnost i obnovljivost ima široku primenu. Hemijskim i mehaničkim modifikacijama moguće je izmeniti njegovu strukturu. Pored svega toga, hitozan je komercijalno interesantan jer je jeftin, dobija se deacetilovanjem hitina izolovanog iz ljuštura raznih morskih životinja (kao što su školjke, rakovi i dr.) i kao nus-produkt pri preradi morskih plodova.¹⁰

Upotreba hitozana u obliku sfernih nanočestica prečnika do 20 nm ima prednost u odnosu na prirodni hitozan zbog njegove velike specifične površine po jedinici mase, veće poroznosti i provodljivosti, boljih fotohemijskih i mehaničkih osobina. Klajn i sar.⁷⁰ i Biro i sar.⁷¹ su koristili hitozanske nanočestice za imobilizaciju β -galaktozidaze pri čemu su dobili biokatalizator izvrsne aktivnosti i stabilnosti u poređenju sa slobodnim enzimom. Biro i sar. su čak poredili aktivnost dobijenog imobilisanog enzima na makro i nanočestice hitozana i zaključili da je imobilizacija na nanočestice mnogo efikasnija.

Tang i sar.⁷² su imobilisali neutralnu proteazu na hitozanske nanočestice pri čemu je imobilisani preparat pokazao prinos aktivnosti od 84 %. Hitozan može biti korišćen u obliku membrane sastavljene od nanovlakana za imobilizaciju lipaza.⁷³ Procesom koagulacije magnetnih nanočestica u vodenom rastvoru hitozana dobijaju se hitozan-magnetne nanočestice koje se takođe mogu koristiti za imobilizaciju enzima. Dokazano je da nanočestice hitozana poseduju antibakterijsku aktivnost prema *E. coli*, *Saccharomyces choleraesuis*, *Saccharomyces typhimurium* i *Saccharomyces aureus*.⁷⁴ Nanočestice hitozana presvučene polietilenglikolom su se pokazale kao izvrstan nosač za lekove i njihovo kontrolisano otpuštanje.⁷⁵

2.2.3. Uticaj nanostrukture čestica na aktivnost i stabilnost imobilisanog enzima

Enzimi su proteini koji se sastoje od lanaca amino kiselina poređanih po određenoj sekvenci što direktno određuje njihov oblik, strukturu i biološku funkciju. Osnovne jedinice sekundarne strukture enzima su α -heliks i β -ploče čiji trodimenzionalni raspored predstavlja terciarnu strukturu enzima.⁷⁶ Nativna konformacija enzima direktno zavisi od rasporeda i komplementarnosti hidrofobnih regiona kao i elektrostatičkih interakcija koje se formiraju, sa osnovnim termodinamičkim uslovom da enzim teži da zauzme konformaciju sa najmanjim sadržajem energije. U prisustvu čestica dolazi do interakcija između površine čestice i aminokiselinskih ostataka molekula enzima pri čemu se nativna konformacija enzima narušava, u nekim slučajevima to može da dovede do gubitka biološke funkcije, a u nekim slučajevima dolazi do stabilizacije molekula enzima. Kao što važi za čestice milimetarskih prečnika, važi i za nanočestice da faktori kao što su interakcije stvorene između nosača i enzima i uslovi imobilizacije (jonska jačina rastvora, pH, temperatura) imaju presudan uticaj kakvu će konformaciju zauzeti enzim prilikom vezivanja za nosač.⁷⁷ Imobilizacijom se stabilizuje enzim, tj. vezivanjem za površinu čestica onemogućava se spontana promena konformacije enzima karakteristična za vodene rastvore. Smanjenjem veličine čestica nosača generalno se povećava efikasnost imobilizacije. Što su čestice manje to je veća površina za vezivanje enzima dovodeći do povećane mase vezanih enzima po jedinici površine čestica, a što je opet u najvećem broju slučajeva u vezi sa povećanjem aktivnosti.

Neka istraživanja pretpostavljaju da se dobro dispergovane nanočestice pokazuju Braunovo kretanje.⁷⁸ Prema Anštajnovoj kinetičkoj teoriji pokretljivost i difuzivnost nanočestica mora da bude manja u odnosu na slobodan enzim zbog njihove relativno veće

veliĉine. U sluĉaju kada je enzim vezan za nanoĉesticu pretpostavlja se da tokom same katalize dolazi do spontanog pomeranja nanoĉestica i da je imobilisan enzim ustvari inicijator kretanja nanoĉestica.²⁵ Pa se na osnovu ovih teorija moŹe objasniti znaĉajno veća aktivnost imobilisanih enzima na nanoĉestice jer postoji direktna veza izmeĉu pokretljivosti i katalitiĉkog uĉinka enzima.

Uticaj prisustva nosaĉa nanometarskih dimenzija na stabilnost enzima je izuĉavana imobilizacijom enzima na više razliĉitih nanomaterijala. Praćen je uticaj zakrivljenosti površine nosaĉa na formirane interakcije izmeĉu enzima i nosaĉa što je presudno uticalo na stabilnost dobijenog imobilisanog sistema. Dokazano je da je uticaj koji zakrivljenost nanomaterijala ima na strukturu i vezivanje enzima iskljuĉivo zavisi od samog enzima. Pa je tako na primeru adsorpcije ribonukleaze A na nanoĉestice silike dokazano da sa povećanjem veliĉine ĉestica nanosilike dolazi do stabilizacije ovog enzima. Pretpostavlja se da je zakrivljenost površine nosaĉa u ovom sluĉaju presudan faktor, jer je imobilizacija ovog enzima na siliku u obliku ploĉe pokazala kao najbolja u kontekstu stabilnosti.²⁴ Suprotno ovom enzimu, imobilizacijom lipaze iz *C. rugosa* na magnetne nanoĉestice povećala se njena stabilnost jer je upravo zakrivljenost površine nanoĉestica omogućila formiranje većeg broja kovalentnih veza koje su doprinele stabilizaciji enzima.³¹ Treba napomenuti i da je recimo u sluĉaju peroksidaze izolovane iz soje tokom imobilizacije na ugljeniĉni nosaĉ nano-dimenzija u obliku šuplje sfere, u uslovima koji odgovaraju denaturaciji ovog enzima, povećana njena stabilnost za razliku od imobilizacije na grafitne nanoploĉe.⁷⁹

2.3. Neporozne nanočestice silike

Među neorganskim materijalima, silicijum-dioksid (silika) je materijal koji se već decenijama primenjuje u imobilizaciji industrijskih enzima zbog dobrih mehaničkih i termalnih karakteristika, biokompatibilnosti, velike otpornosti prema kontaminaciji i organskim rastvaračima, kao i velike hidrofилnosti ovog materijala time i mogućnosti efikasne modifikacije uvođenjem odgovarajućih supstituenata.^{80, 81} Uglavnom se ove imobilizacije izvode sol-gel transformacijama rastvora različitih silana. Imobilisani biokatalizator se dobija tako što u toku formiranja strukture gela enzim biva obuhvaćen novonastalom matricom. Tek u novije vreme razvijaju se postupci adsorpcije i kovalentne imobilizacije enzima na čestice silike nano-dimenzija čiji je osnovni cilj dobijanje imobilisanog biokatalizatora veće aktivnosti i stabilnosti.

2.3.1. Industrijski postupci sinteze nanočestica silike

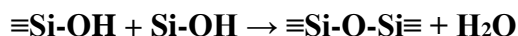
Nanočestice silike su danas dostupne iz komercijalnih izvora i one obično nalaze u obliku praha ili koloida. Postoji veliki broj industrijskih postupaka sinteze nanočestica silike:

1. vlažan postupak (sol-gel procesi, taloženje),
2. termički postupak (piro-hidrogenizacija, plazma).

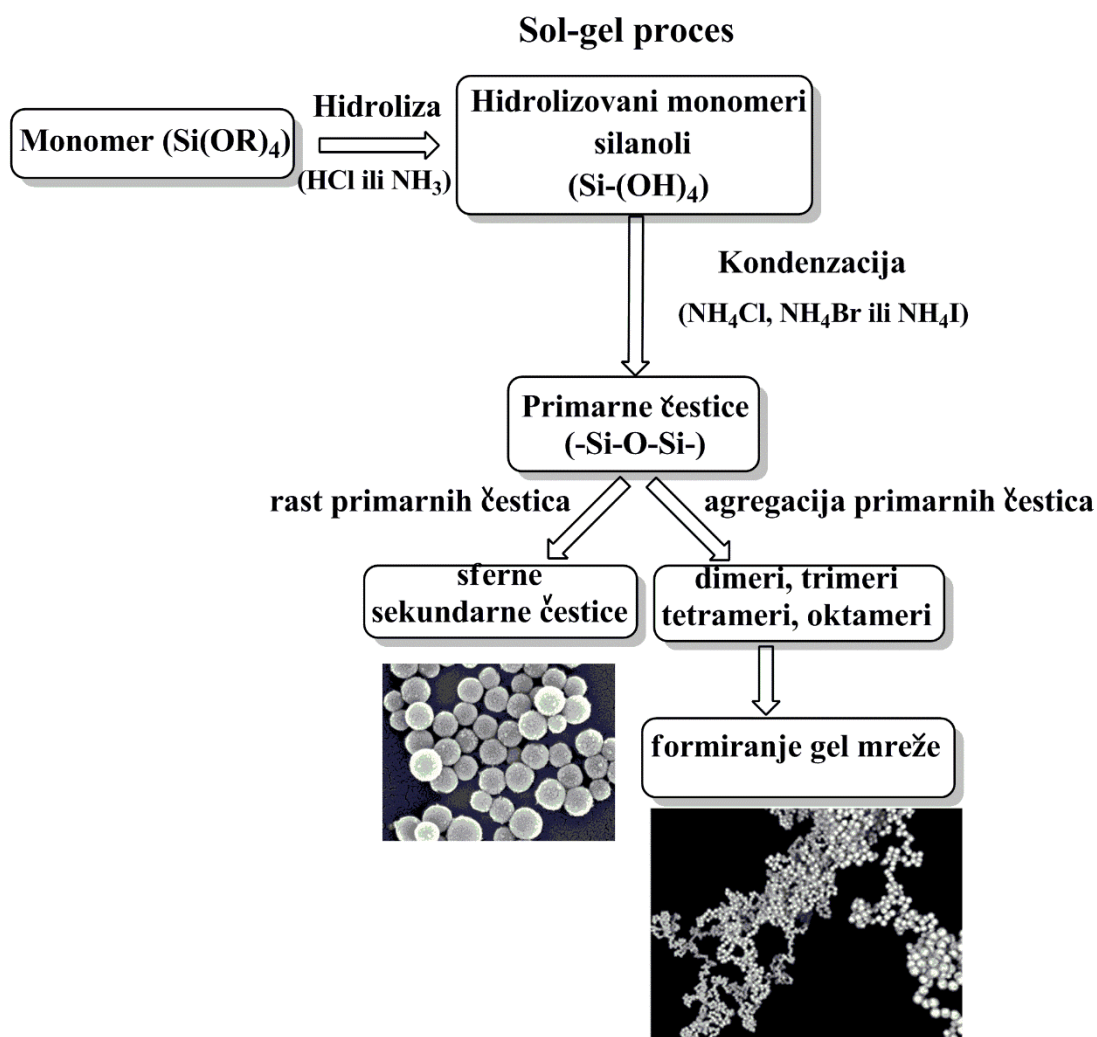
2.3.1.1. Vlažan postupak sinteze nanočestica silike

2.3.1.1.1. Sol-gel proces

Sol-gel proces je najviše korišćen industrijski postupak za dobijanje čistih nanočestica silike jer daje mogućnost kontrole veličine i morfologije dobijenih čestica kroz sistematski monitoring parametara procesa. Sol-gel proces se bazira se na kondenzaciji silanol grupa, pri čemu se formiraju siloksan mostovi (Si-O-Si) koji su osnova strukture silika nanočestica, što je prikazano reakcijom:



Alkoksidi (Si(OR)₄) kao što su tetrahidroksisilan, tetraetoksisilikat, natrijum-silikat hidrolizuju u prisustvu kiseline (HCl) ili baze (NH₃) i nastaju silanoli, hidroliza je praćena kondenzacijom koja se izaziva dodatkom elektrolita (soli amonijaka, Br, Cl ili I) ili promenom pH rastvora pri čemu se formiraju primarne čestice, daljim povezivanjem hidrolizovanih monomera sa primarnim česticama dolazi do njihovog rasta i nastanka većih čestica (slika 2.6.). Uporedo primarne čestice agregiraju stvarajući dimere, trimere tj. veće čestice (sekundarne čestice). Na kraju oba ova uporedna procesa ili dovode do nastanka sfernih čestica ili silika gel mreže.



Slika 2.6. Šematski prikaz sinteze nanočestica silike sol-gel procesom.

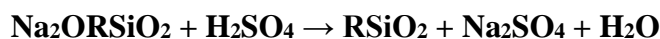
Podешavanjem uslova u kojima se odigrava sinteza utiče se na to da li će doći do formiranja sfernih čestica ili gela. Mešanje i tretiranje ultrazvukom takođe mogu da spreče stvaranje gela i dobijanje pojedinačnih sfernih čestica. Dokazano je da prisustvo Br^- i I^- jona smanjuje veličinu sintetisanih čestica za oko 70 %. Nakon sinteze dobijeni koloidni rastvor čestica ili gel se suši u cilju što bolje disperzije sintetisanih čestica, a kao rezultat nastaje fini beli prah. Različiti načini sušenja mogu biti primenjeni kao što su npr. sušenje nadkritičnim pritiscima, sušenje zamrzavanjem, sušenje raspršivanjem ili toplim vazduhom. Sušenje zamrzavanjem je pokazalo najbolje rezultate što se tiče kvaliteta i finoće dobijenog praha.

Sol-gel postupkom se mogu dobiti čestice dimenzija od 5 do 2000 nm. Analizom ovako sintetisanih čestica utvrđeno je da je kod nanočestica od 5 nm više od polovine atoma Si na površini što znači da one imaju više od dve silanol-grupe na svojoj površini. Fizičke i

hemijske osobine silika nanočestica direktno zavise od broja silanolnih grupa koje poseduju na svojoj površini. Sa smanjenjem površine silika nanočestica raste broj prisutnih silanolnih grupa što je direktno povezano sa specifičnom površinom čestica.⁸²

2.3.1.1.2. Sinteza taloženjem

Istaložena silika se dobija dejstvom sumporne kiseline na Na-silikat, što je prikazano reakcijom:



gde je R-organo grupa.

Dobijena silika je u formi pojedinačnih čestica, jer se tokom procesa izbegava geliranje.

Ovaj postupak se danas retko koristi u industrijskim uslovima.

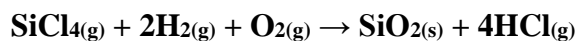
2.3.1.2. Termički postupak sinteze nanočestica silike

2.3.1.2.1. Piro-hidrogenizacija

Industijskim postupkom piro-hidrogenizacija dobijaju se pirogene nanočestice silike. Ovaj postupak je otkriven još 1940. godine, a dizajnirao ga je naučnik koji je tada radio za firmu koja je danas u sklopu kompanije Evonik⁸³, a danas je jedan od najvećih proizvođača pirogene silike. Pirogene nanočestice silike su u formi finog, amorfnog, rastresitog belog praha.

Proces dobijanja se izvodi na visokim temperaturama i sastoji se od više faza (slika 2.7.)⁸⁴:

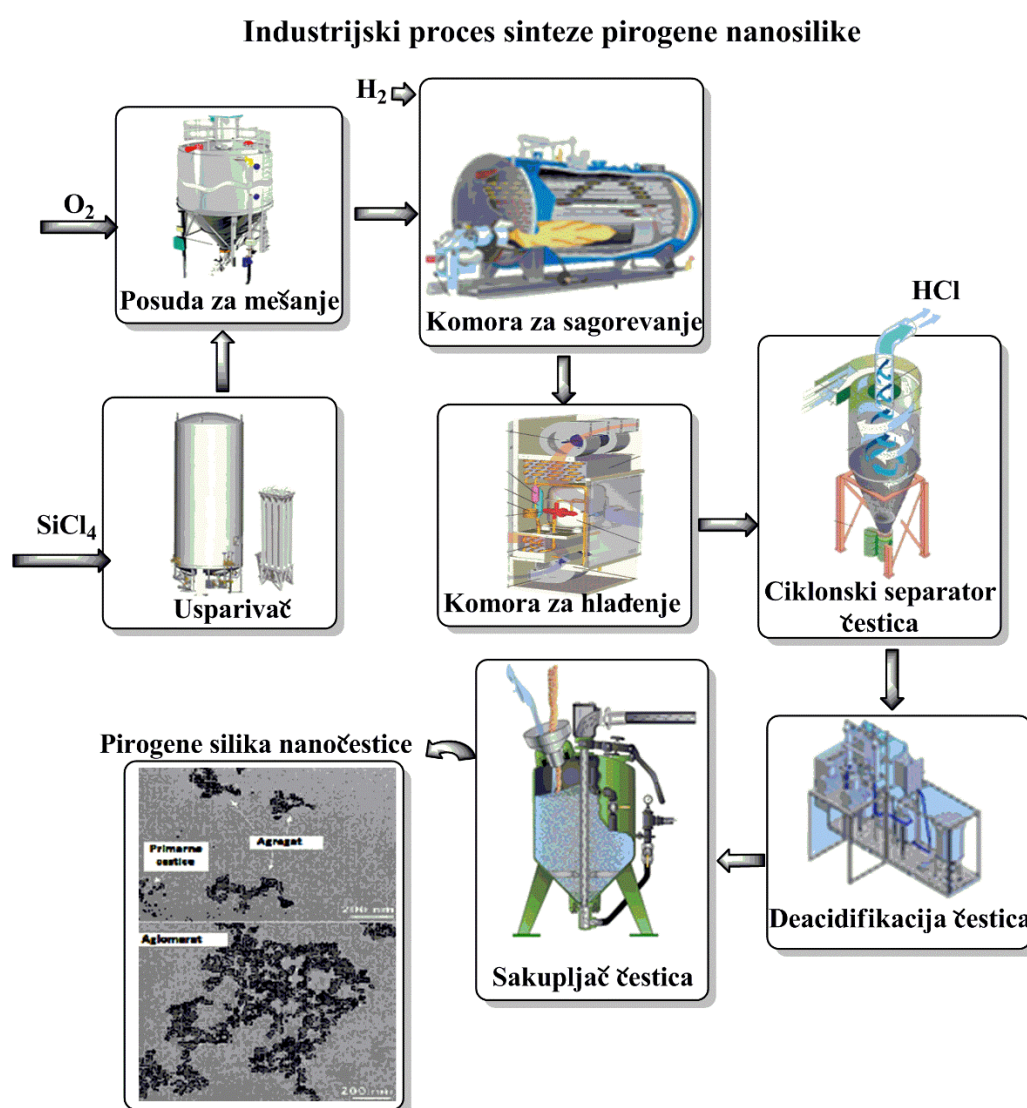
1. U prvoj fazi se vrši redukcija kvarca pri čemu se dobija silicijum.
2. Dobijeni silicijum tretira se hlorovodoničnom kiselinom ili elementarnim hlorom i dobija se silicijum-tetrahlorid (SiCl_4).
3. Hidrolizom silicijum-tetrahlorida u plamenu H_2 i O_2 , na temperaturama od 1200-1500 °C dobija se silika, što je prikazano reakcijom:



Deo HCl isparava, a deo se adsorbuje na površini silike, stvarajući tanak sloj, čime se i objašnjava njen blago kiseli karakter.

Paralelna oksidacija i hidroliza SiCl_4 u plamenu se odigravaju u takozvanoj komori za sagorevanje, tj. „flame“ reaktorima. Zadržavanje čestica u zoni reaktora gde je temperatura najviša je od 10 do 100 ms. Ovaj režim je krucijalan za formiranje primarnih sfernih čestica, čija veličina varira u zavisnosti od uslova procesa (7-60 nm). Veličina dobijenih primarnih čestica se može kontrolisati podešavanjem temperature procesa, vremena zadržavanja čestica u reaktoru, koncentracije prekursora i brzine hlađenja.⁸⁵

Treba napomenuti da je na nižim temperaturama u reaktoru dominantna hidroliza, dok se oksidacija prekursora dominantno dešava u oblastima gde temperatura dostiže svoj maksimum. Hidroliza je ta koja određuje prečnik sintetisanih nanočestica. Nakon formiranja primarnih čestica, one se dalje povezuju preko novostvorenih siloksan veza, obrazujući trodimenzionalni lanac (sinterovani agregati), veličine 100-500 nm. Hlađenjem, agregati se povezuju stabilnim fizičko-hemijskim vezama, obrazujući tetraedarsku strukturu sa makročesticama, tzv. aglomerate, veličine i do nekoliko mikrona.



Slika 2.7. Šematski prikaz industrijskog postupka sinteze pirogenih silika nanočestica.

Veličinu aglomerata je vrlo teško utvrditi, jer zavisi od stepena aglomeracije koja je uravnotežena disperzionim silama. Dobijeni agregati su stabilni, za razliku od aglomerata koji su nestabilni na spoljašnjim uslovima. Izolovane sferične čestice ne postoje kod pirogene silike.

Tokom industrijske sinteze pirogenih nanočestica silike veličina čestica i distribucija primarnih čestica, samim tim i specifična površina čestica, zavisi od temperature i temperaturnog gradijenta vazdušne struje u plamenu.^{86, 87}

Korišćenjem čistog kiseonika povećava se temperatura procesa, ubrzava se oksidacija prekursora (SiCl_4) i olakšava se sinterovanje čestica.⁸⁸ Kako je proces ograničen difuzijom i agregacijom, veličina čestica u nastalom agregatu je ista kao veličina prvobitnih čestica, dok se sam agregat dalje razlikuje od ostalih agregata (odnosno njihovih čestica), koji nastaju u procesu. Povećanjem specifične površine, sa jedne strane, smanjuje se prosečna veličina primarnih čestica, a sa druge strane, smanjuje se i raspodela agregata.

Dokazano je i da prisustvo Na^+ i K^+ jona dovodi do smanjenja veličine sintetisanih primarnih čestica ali ne i do smanjenja veličine dobijenih agregata.⁸⁷ Dodatkom ferocena ($\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$) se može smanjiti broj velikih agregata i povećati specifična površina primarnih silika čestica.⁸⁹

2.3.1.2.2. Plazma postupak

Plazma postupak sinteze silika nanočestica se sastoji u tome da se formiranje čestica vrši u termičkim plazma reaktorima. Termičke ili tople plazme se karakterišu velikom gustinom elektrona od 10^{21} do 10^{23} po m^3 i najčešće su napravljene od grafita. Kao gasovi u ovim reaktorima se koriste azot i argon.⁸⁵ Vreme zadržavanja čestica u plazma reaktoru je oko 1 s. Nakon izlaska iz plazma reaktora čestice se hlade i skupljaju u ciklonu.

Ovaj postupak sinteze silika nanočestica je još uvek u fazi istraživanja.

2.3.2. Poređenje fizičkih karakteristika nanočestica silike

Fizička svojstva različitih tipova nanočestica silike (poroznost, veličina i raspodela čestica), direktno zavise od načina sinteze, a sumirane i prikazane su u Tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Svojstva nanočestica silike dobijenih različitim postupcima.

<i>Karakteristike</i>	<i>Termički postupci</i>		<i>Vlažni postupci</i>	
	<i>Pirogena silika</i>	<i>Plazma silika</i>	<i>Sol-gel silika</i>	<i>Istaložena silika</i>
<i>Specifična površina (m²/g)</i>	50-400	150-200	300-1000	60-300
<i>Gustina kompaktnih delova (g/l)</i>	90-120	120-150	90-160	160-200
<i>pH (5% rastvor)</i>	3,6-4,3	3,5-4,2	4,0-7,5	6,5-7,5
<i>Vlažnost, %</i>	<1,5	<2,0	5,0	6,0
<i>Koncentracija silanol grupa (grupa/nm²)</i>	2-4	2-3	4-8	8-10
<i>Veličina primarnih čestica (nm)</i>	7-40	-	-	10-30
<i>Prosečna veličina čestica (μm)</i>	0,8	4-8	4-10	1,5-10

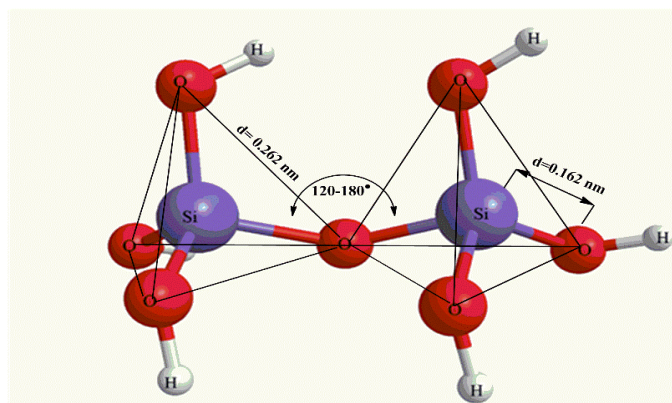
2.3.3. Pirogene nanočestice silike

Ovaj tip silika nanočestica biće primenjen u eksperimentalnom delu doktorske disertacije pa će njegove karakteristike biti detaljnije analizirane u ovom delu rada.

2.3.3.1. Struktura

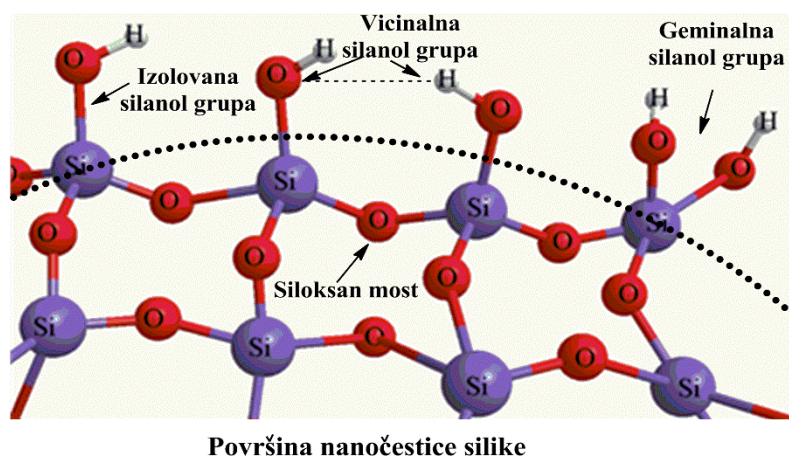
Pirogene nanočestice silike se sastoje od nepravilno grupisanih tetraedara SiO₄, rastresite su i amorfne (slika 2.8.). Jedan atom silicijuma je okružen sa 4 atoma kiseonika formirajući tako tetraedar u čijem centru je atom silicijuma, dok se kiseonici nalaze u uglovima tetraedra. Svaki od 4 atoma kiseonika daje po jedan elektron atomu silicijuma čime on zaokružuje svoju energetska ljusku i postaje veoma stabilan. Međutim, po još jedan elektron od svakog od 4 atoma kiseonika ostaje slobodan i oni mogu da ga daju još jednom atomu silicijuma i da se tako formiraju još četiri tetraedara. Grupisani tetraedri su povezani atomima kiseonika. Čitava mreža povezanih tetraedara čini strukturu nanočestica silike. Energija Si-O veze je dva puta veća od energije Si-Si veze i većinom

je kovalentne prirode pa je iz tog razloga favorizovano njeno stvaranje. Ugao Si-O-Si mosta (veze) varira od 120 do 180° , a rastojanje između Si i O atoma je oko 162 nm. Nepopunjene $3d$ orbitale Si atoma omogućavaju stvaranje veze sa atomima kiseonika jer su u stanju da prihvate elektrone koje sa sobom donose atomi kiseonika. Ovo ima za posledicu da je Si-O veza nešto kraća nego što je očekivano i može se primetiti da je $p\pi-d\pi$ karakter dvostruke veze prisutan. Drugim rečima izostaje očekivana sp^3 hibridizacija O-atoma jer su O-atomi u većoj meri sp^2 hibridizovani, što je osnovni razlog postojanja širokog spektra uglova između atoma u Si-O-Si vezi.⁹⁰ Na osnovu već navedenih razloga može se objasniti i činjenica da je Si-O veza kraća od očekivanog (162 nm). Može se reći da je SiO_4 tetraedar ustvari jedna veoma rigidna i stabilna jedinica koja se može povezivati međusobno i tako stvarati sfere, prstenove, lance ili ploče.⁹¹



Slika 2.8. 3D šematski prikaz Si-O-Si mostova.

U strukturi silike nanočestica može doći do raskidanja Si-O-Si veza pri čemu je moguće da se kiseonik veže za H-atom prisutne vode u toku procesa sinteze i da se tako nagradi siloksan veza (Si-OH) (slika 2.9.).



Slika 2.9. 3D prikaz površine nanočestice silike i vrste prisutnih silanol grupa.

Uprkos činjenici da atomi kiseonika imaju manju elektronsku gustinu, jer su elektroni privučeni od strane Si-atoma, oni mogu biti protonovani tj. mogu vezati atom vodonika. O-atom u Si-O-Si vezi se ponaša kao slaba Lewis-ova baza.⁹² Silanolne grupe koje se nalaze na površini silika nanočestica su kiselije od odgovarajućih komplementarnih alkohola, i u širokom pH opsegu se nalaze deprotonovane. Silanolne grupe imaju tendenciju da se ponašaju kao donori protona prilikom građenja vodoničnih veza. Teorijski bi bilo moguće i da se kiseonik iz prekinute Si-O-Si veze (Si-O·) veže za kiseonikov atom drugog tetraedra pri čemu bi se nagradila Si-O-O veza, ali je dokazano analizom strukture da se to ne dešava, kao i što je stvaranje Si-Si-Si veza jako retko.⁹¹

Od koncentracije silanol grupa prisutnih na površini zavisi reaktivnost silike. Postoje tri vrste silanol grupa⁹³: izolovane silanol grupe (85% od ukupnog broja silanol grupa), geminalne silanol grupe (dve silanol grupe na jednom atomu Si) i vicinalne silanol grupe (dve susedne silanol grupe, povezane vodoničnim vezama) (slika 2.9.).

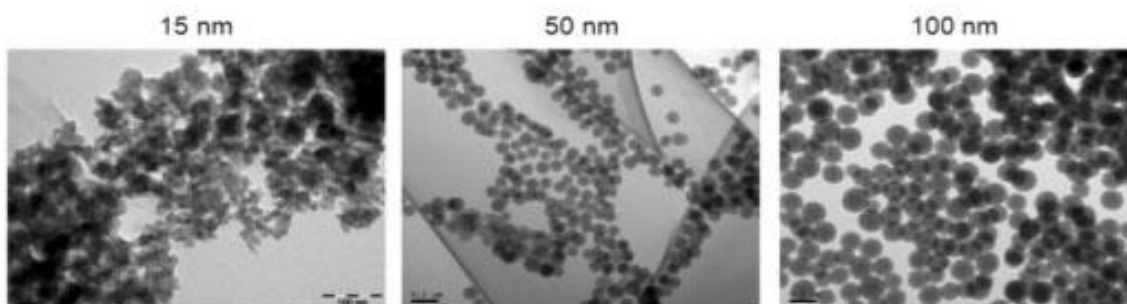
Kao što je već naznačeno veliki je izazov da se postupkom piro-hidrogenizacije dobiju neaglomerisane nanočestice silike, tj. sintetisati ih tako da se dobiju pojedinačne sferne čestice čiji je prečnik manji od 100 nm. Kako bi se utvrdio stepen aglomeracije kao i struktura, veličina i karakter površine dobijenih nanočestica najčešće se koriste sledeće tehnike: transmisiona elektronska analiza (TEM), BET merenja, termogravimetrijska analiza (TGA), Furijerova (Fourier) transformaciona infracrvena spektroskopija (FTIR).⁹⁴ Konkretno TEM analizom se može utvrditi oblik i veličina nanosilika čestica. FTIR i TGA omogućavaju određivanje strukture samih nanočestica, određivanje prisustva kontaminacije i koncentracije prisutnih silanol grupa na površini nanočestica. BET merenja daju mogućnost da se odredi specifična površina nanočestica silike.

2.3.3.2. Karakterizacija

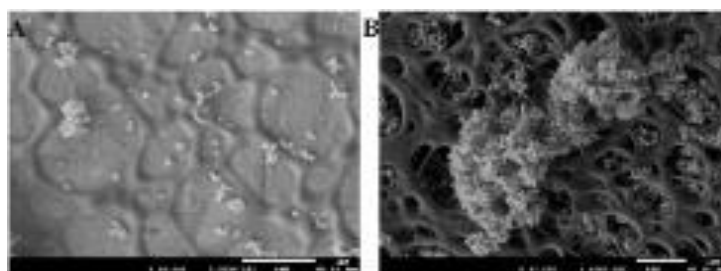
2.3.3.2.1. TEM analiza nanočestica silike

TEM analiza se koristi za direktno slikanje nanočestica kako bi se kvantativno utvrdila veličina, oblik, prisustvo agregata, distribucija veličina i morfologija nanočestica pomoću visokorezolucionog transmisionog elektronskog mikroskopa. Granica uvećanja mikroskopa određena je talasnom dužinom korišćene „elektronske svetlosti“. S obzirom je talasna dužina „elektronske svetlosti“ 10^4 puta manja od talasne dužine vidljive svetlosti granica uvećanja posmatranih nanočestica elektronskim mikroskopom je 2000000 puta. Izvor elektrona je vlakno (termoelektronska emisija), elektroni se potom

ubrzavaju na anodi (100 keV) i fokusiraju u kondenzorskom sočivu do određenog dijametra nakon čega se usmeravaju na ispitivane nanočestice. Slika se formira na osnovu rasejavanja elektrona na atomima i defektima posmatranih nanočestica. Elastično rasejanje elektrona je odgovorno za nastanak difrakcionih slika, dok neelastično rasejanje elektrona na nehomogenim delovima nanočestica (granicama čestica, defektima i dr.) proizvodi lokalne prostorne varijacije u intenzitetu transmitovanog elektronskog snopa i omogućava dobijanje klasične elektronske transmisionne slike nanočestica.⁹⁵ Nanočestice se pripremaju za analizu stanjivanjem sloja nanočestica do transparentne debljine (debljina sloja manja od 200 nm) ili uzimanjem otiska sa površine nanočestica (replika).⁹⁶ Na slici 2.10. su upoređene TEM analizom nanočestice silike dobijene različitim postupcima. Upoređene su strukture industrijski sintetisanih sfernih nanočestica silike (637238 ALDRICH, 15 nm) i laboratorijski sintetisanih Šteberovom metodom nanočestica silike (50 i 100 nm).⁹⁷ Slika 2.11. predstavlja uporednu TEM analiza pojedinačnih nanočestica silike (A) i formiranih aglomerata (B) dobijenih postupkom piro-hidrogenizacije.⁹⁸



Slika 2.10. TEM analiza nanočestica silike.⁹⁷



Slika 2.11. TEM analiza nanočestica silike: A) pojedinačne sferne čestice i B) aglomerati nanočestica silike.⁹⁸

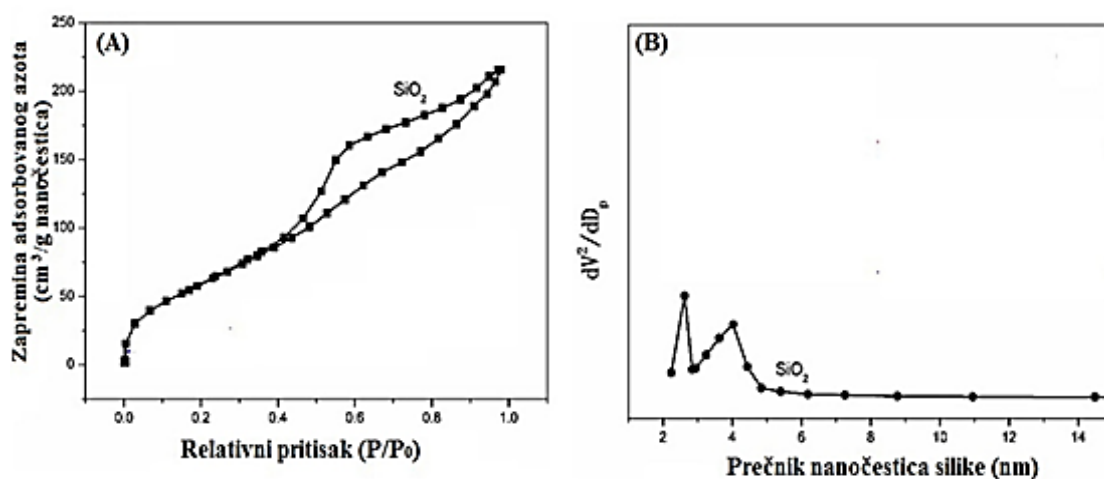
2.3.3.2.2. BET merenja nanočestica silike

Specifična površina nanočestica (SA) se određuje pomoću BET merenja. Ovu metodu su razvili Brunauer, Emet i Teler 1938. godine snimajući izotermnu adsorpciju monosloja

azota na površini silike. Suština ove tehnike je izučavanje veličine koja pokazuje koji deo gasa se adsorbirao na površini ispitivanih nanočestica. Adsorpcija gasa se meri tako što se koristi uređaj „adsorpciona vaga“ kod koje se adsorbens (nanočestice) nalazi u platinskoj posudi koja je okačena o spiralu od kvarcne niti. Adsorbat (azot) se nalazi na dnu staklene cevi u kojoj se nalazi i spirala sa posudom. Spirala je kalibrisana tako da bilo koja elongacija odgovara određenoj masi. Princip metode je da se adsorbat zagreva pomoću posebne peći i količina adsorbovanog gasa se direktno meri povećanjem mase adsorbenta (istezanjem opruge). Merenja se vrše za niz pritisaka da bi se dobila adsorpciona izoterma (slika 2.12. (A)). Na osnovu određene količine adsorbovanog gasa može se pomoću Avogadrovog zakona izračunati koliko je to u stvari molekula. Kako je poprečni presek jednog molekula gasa (azota) poznat može se preračunati kolika je površina odnosno specifična površina ispitivanih nanočestica.⁹⁹ Podaci koji se dobijaju BET merenjem omogućavaju da se procene svojstva nanočestica kao što su hemijska aktivnost, međučestično trenje, adsorpcija, katalitička svojstva i kontaminacija.

Huang i sar. su na osnovu BET merenja odredili da nanočestice silike imaju veliku specifičnu površinu (SA) (od 50-400 m^2/g), što omogućava dobru interakciju sa medijumom tj. ima veliku reaktivnost. Na osnovu specifične površine nanočestica može se izračunati prečnik primarnih nanočestica silike d_p po formuli:

$d_p = 6/(\rho_p * SA)$, gde je ρ_p gustina nanočestica SiO_2 i koja iznosi 2,2 g/cm^3 (slika 2.12. (B)).¹⁰⁰



Slika 2.12. Adsorpciona/desorpciona izotermna azota na nanočestice silike (A).

Distribucija prečnika nanočestica silike (B).¹⁰¹

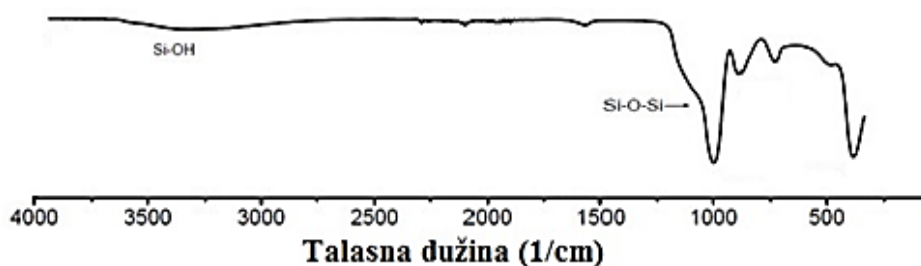
2.3.3.2.3. TGA analiza nanočestica silike

Termogravimetrijska analiza (TGA) je metoda termalne analize koja se temelji na merenju promene mase uzorka kao funkcije temperature ili kao funkcije vremena (pri konstantnoj temperaturi). TGA je široko primenjivana metoda koja se koristi za karakterizaciju i identifikaciju materijala, određivanje sastava uzorka, određivanje udela organskog rastvarača u uzorku, nečistoća u uzorku (pepeo) i aditiva, kao i mehanizama i kinetike razgradnje. Uređaj za termogravimetrijsku analizu u osnovi se sastoji od precizne vage povezane s posudom za uzorak koja se nalazi unutar pećnice koja omogućuje zagrevanje uzorka. Rezultati merenja prikazuju se grafikom zavisnosti mase od temperature u slučaju da se tokom merenja menja temperatura ili zavisnost mase od vremena ukoliko je temperatura prilikom merenja konstantna.

2.3.3.2.4. FTIR analiza nanočestica silike

Tehnika infracrvene spektroskopije sa Furijeovom (Fourier) transformacijom (FTIR) koristi upadno zračenje široke spektralne oblasti (polihromatsko zračenje) za utvrđivanje strukture materijala. Posle interakcije sa uzorkom u reflektovanom spektru je smanjen intenzitet na onim talasnim dužinama koje uzorak apsorbuje. Apsorpcioni spektar se dobija oduzimanjem spektra reflektovanog zraka od spektra referentnog zraka. Spektar se dobija matematičkim raščlanjivanjem polihromatskog zračenja na monohromatske komponente i prikazivanjem u vidu frekvencija-intenzitet. Prednost ove tehnike nad klasičnom tehnikom skanirajuće infracrvene spektroskopije je što vreme snimanja koje uključuje obasjavanje uzorka polihromnim snopom, i izračunavanje dijagrama intenzitet-frekvencija (vreme snimanja) kreće u intervalu 0,05 do 1s, pa se snimanje za kratko vreme može višestruko ponoviti i akumulacijom signala znatno smanjiti odnos signal/šum.¹⁰²

FTIR analizom nanočestica silike se može utvrditi njena struktura (slika 2.13.). Literaturno je dokazano da se kristalna struktura nanosilika čestica pokazuje pik na 1088 cm^{-1} koji predstavlja asimetrične valencione vibracije prisutnih Si-O-Si grupa, dok pik na 815 cm^{-1} je posledica simetričnih valencionih vibracija istih ovih grupa. Ovo je uskladu sa standardnim IR spektrom silike. Pik na 3500 cm^{-1} na spektru silika nanočestica je dokaz prisustva Si-OH grupa. Adsorbovana voda se može detektovati na osnovu pika na 1635 cm^{-1} .⁸⁰



Slika 2.13. FTIR spektar nanočestica silike.¹⁰³

2.3.3.3. Svojstva i primena pirogenih nanočestica silike

Pirogene nanočestice silike su veoma privlačan materijal za primenu u biotehnologiji zbog toga što je relativno jeftin, hemijski inertan, termostabilan i biokompatibilan. Nanočestice silike su poslednjih dve decenije privukle veliku pažnju zbog mogućnosti njihove primene u katalitičkim i separacionim postupcima, u biomedicini kao biosenzori i pogodan su materijal za adsorpciju različitih biomolekula (proteini, peptidi, DNK, antigeni-antitela).¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Veličina nanočestica silike je u opsegu od 10 do 100 nm. Stabilna struktura ovih nanočestica omogućava da one budu otporne prema mehaničkom pritisku i degradaciji. Takođe, one imaju veliku specifičnu površinu ($> 200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) što omogućava vezivanje velike količine biomolekula. Poseduju izuzetnu stabilnost u rastvorima sa visokom koncentracijom soli (npr. 0.15 M NaCl) pri $\text{pH} > 10,5$.¹⁰⁷ Apsorbuju infracrvenu, vidljivu i ultraljubičastu svetlost. Interaguju sa magnetnim poljem pri čemu funkcionalne grupe silike unutar njene strukture zadržavaju svoje originalne optičke i magnetne osobine. Površina nanočestica silike može biti funkcionalizovana.

2.3.4. Svojstva pirogenih komercijalnih nanočestica silike-Aerosil 380

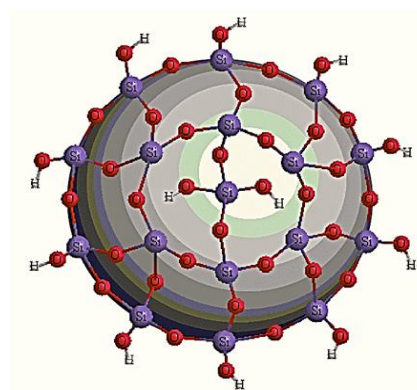
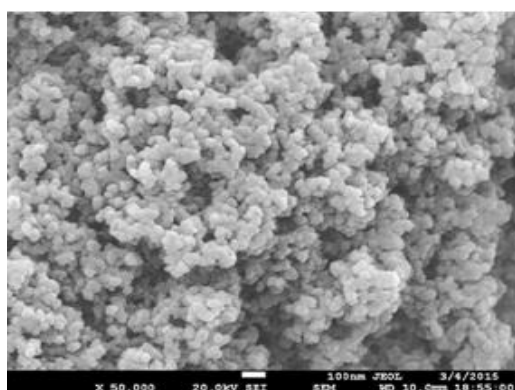
U ovoj disertaciji korišćena je pirogena silika Aerosil 380 koja spada u grupu hidrofilnih prahova SiO_2 i njena svojstva data su u Tabeli 2.3.¹⁰⁸ Proizvodi je Aerosil (Esen, Nemačka) koji je jedan od najvećih proizvođača pirogene silike na svetu, 2015. godine je je ova kompanija ostvarila zaradu od 13 milijardi dolara.¹⁰⁹ Aerosil 380 je komercijalna neporozna nanosilika koja ima specifičnu površinu od $380 \text{ m}^2/\text{g}$ (slika 2.14.). TEM slika Aerosil 380 je prikazana na slici 2.14.

Primena pirogene silike Aerosil je raznovrsna: kao ojačavajuće punjenje silikonskih guma (oko 55 % upotrebe pirogene silike je za ove potrebe), kao osnovni agens (supstrat) za boje i polimere, kao aditiv koji doprinosi jačanju polimera, kao boja i mastilo i dr. Istaložena silika se koristi kao punilac za gume. Koristi se i u prehrambenoj industriji i kozmetici kao gelirajući i suspendujući reagens u sklopu različitih formulacija.¹⁰⁹

Konkretno u kozmetici se koristi kako bi se povećala termička stabilnost karmina. U prehrambenoj industriji se koristi kao sastojak dehidriranih proizvoda u prahu kao što su npr. supe, začini i osvežavajuća pića.¹¹¹ Silika Aerosil ispunjava kriterijum čistoće za upotrebu kao aditiva u hrani E551 u skladu sa regulativom Evropske Unije 231/2102.¹¹²

Tabela 2.3. Svojstva komercijalne pirogene silike-Aerosil 380.¹⁰⁸

Osobine	Aerosil 380	Gubitak mase pri zagrevanju 2 h, 1000 °C	pri pH 4 % suspenzija < 2,5 %
Ponašanje prema vodi	Hidrofilan		3,6-4,3 %
Izgled	beo prah	Sadržaj SiO ₂	99,8 %
BET specifična površina	380 ± 30 m ² /g	Sadržaj Al ₂ O ₃	0,05 %
Srednja veličina prečnika čestica	7 nm	Sadržaj Fe ₂ O ₃	0,003 %
Nasipna gustina	50 g/dm ³	Sadržaj TiO ₂	0,03 %
Sadržaj vlage nakon 2h, na 105 °C	< 1,5 %	Sadržaj HCl	0,025 %
Prosečna gustina (g/l)	50		
Čistoća (% sadržaj SiO ₂)	99,8		



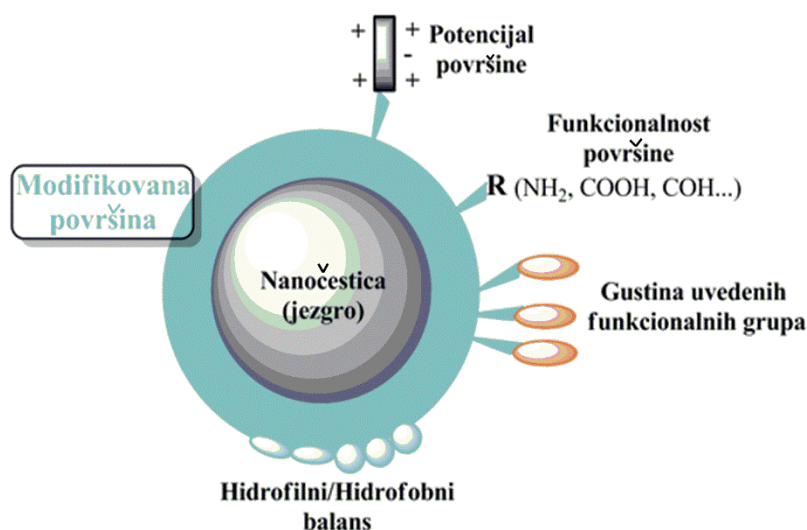
Slika 2.14. (A) TEM analiza pirogene silike Aerosil 380.¹¹⁰ (B) 3D prikaz nanočestice silike.

2.4. Hemijska modifikacija nanočestica silike

Hemijskom modifikacijom površine nanočestica može se postići da se na jednostavan način na njihovu površinu uvedu različite funkcionalne grupe kao što su npr. aldehidne, epoksidne, tiolne, amino, karboksilne i dr. Direktni pozitivni efekti hemijske modifikacije površine nanočestica su:

1. veća mogućnost vezivanja biomolekula od interesa,
2. sprečavanje aglomeracije i nespecifičnog vezivanja između nanočestica koje su posledica njihovog malog hidrodinamičkog radijusa i velike specifične površine,
3. poboljšavanje mehaničkih i fizičkih osobina nanočestica čime se proširuje mogućnost njihove primene.¹¹³

Fizičke, mehaničke i hemijske osobine dobijenih hemijski modifikovanih nanočestica će zavistiti od njihove primarne strukture (jezgra) kao i od formiranog filma modifikujućeg agensa na njihovoj površini (slika 2.15.).



Slika 2.15. Faktori koji se mogu modifikovati pravilnim izborom tehnike i polimera za modifikaciju površine nanočestica.

Površina neorganskih nanočestica može se funkcionalizovati:

1. organskim polimernim molekulima i to na dva načina: formiranjem hemijskih veza između organskih polimera i nanočestica (kovalentno vezivanje) i fizičkom adsorpcijom organskih polimera na površinu neorganskih nanočestica.
2. modifikujućim reagensima neorganskog ili organsko-neorganskog porekla koji se vezuju za površinu nanočestica kako adsorpcijom tako i kovalentnim vezama.

Izborom odgovarajućeg modifikatora i tehnike modifikacije može se kontrolisati potencijal, vrsta funkcionalnih grupa uvedenih na površinu nanočestica, gustina i debljina dobijenog filma na površini nanočestica, kao i balans između hidrofilnosti i hidrofobnosti površine (slika 2.15.).

U poslednje vreme, posvećena je velika pažnja modifikovanju površine neorganskih nanočestica metodama koje obuhvataju kovalentno vezivanje modifikatora pošto to vodi ka mogućnosti stvaranja jačih interakcija između modifikatora i nanočestica.

2.4.1. Modifikacija fizičkom adsorpcijom modifikatora na površinu nanočestica

Prilikom modifikacije površine neorganskih nanočestica fizičkom adsorpcijom molekulima organskih polimera ili modifikujućijih reagenasa dominantno se formiraju slabe van der Valsove sile ili vodonične veze sa površinom nanočestica. S obzirom da su formirane veze slabe i nestabilne, fizički adsorbovani molekuli organskih polimera ili modifikujućijih reagenasa na površini nanočestica su termički nestabilni i rastvorljivi. Nestabilnost formiranog filma na površini nanočestica predstavlja glavnu manu ove metode modifikacije čime je ograničena mogućnost njene upotrebe. Radi poboljšanja metode modifikacije fizičkom adsorpcijom molekulima organskih polimera površine nanočestica veoma često se koriste surfaktanti ili makromolekuli koji će smanjiti privlačne sile između samih nanočestica i time omogućiti bolju adsorpciju polimera na pojedinačne čestice. U te svrhe se najčešće koriste oleinska i stearinska kiselina.

Konkretno, Graždik i sar.¹¹⁴ su modifikovali nanočestice silike 3-aminopropiltrioksisilanom (APTES) u metanolu i izobutylketonu. Oni su takođe tretirali nanočestice silike i oleinskom kiselinom u heksanu. FTIR i TGA analizom dobijenih modifikovanih nanočestica pokazalo se da polarne grupe oleinske kiseline selektivno adsorbuju na površinu nanočestica silike formirajući pritom elektrostatičke interakcije čime se smanjuju privlačne sile između nanočestica silike onemogućavajući tako stvaranje aglomerata između nanočestica. Prilikom modifikacije sa APTES molekulima bolje se pokazao izobutylketon kao rastvarač, jer su dobijene pojedinačne modifikovane nanočestice dok su u metanolu nastali agregati nanočestica. Treba napomenuti da su i APTES i oleinska kiselina u ovom slučaju adsorpcijom vezani za nanočestice silike.

2.4.2. Modifikacija kovalentnim vezivanjem organskih polimera na površinu nanočestica

Postoje dva glavna pristupa hemijskog vezivanja polimernih lanaca na površinu silike:

1. kovalentno vezivanje krajnjih funkcionalnih grupa organskih polimera na površini, to jest "grafting" metod,
2. i „*in situ*“ polimerizacija gde rast monomera startuje inicijacijom, pa se graftovani polimer dobije sintezom polimera iz polaznog monomera oko nanočestica.

2.4.2.1. Modifikacija nanočestica „grafting“ metodom

Modifikacija površine nanočestica graftovanjem polimernih lanaca je korišćena u više polja nanotehnologije. Ovaj proces je našao primenu u:

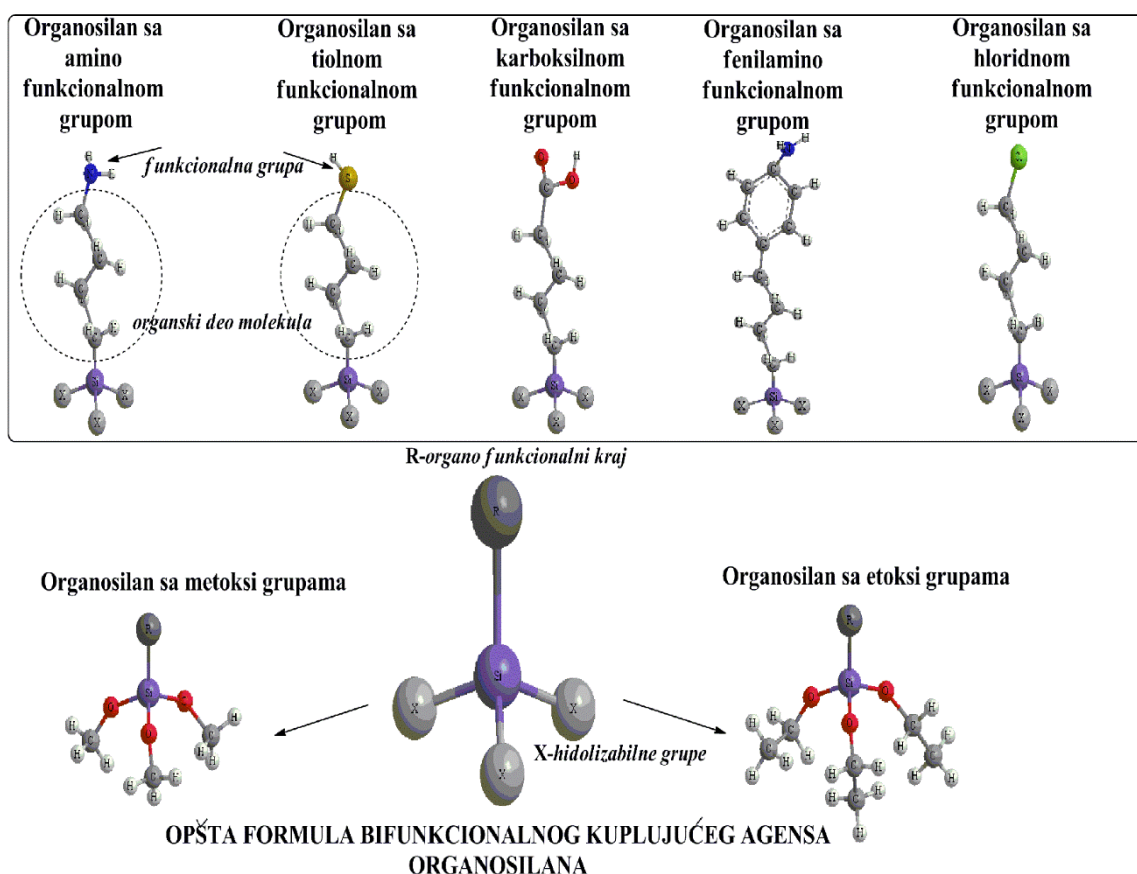
1. sintezi biomaterijala za koje se mogu vezati ćelije i kod kojih ćelijska adhezija i proliferacija mora biti unapređena radi bolje biokompatibilnosti,
2. u sintezi nosača za kovalentnu imobilizaciju peptida i enzima, kao i za vezivanje različitih biomolekula kao što su DNK, antitela, lipozomi i dr.

Nanočestice oksida metala (Al_2O_3 , Fe_3O_4 , SiO_2 , TiO_2 i ZnO) imaju slobodne hidroksilne grupe na svojoj površini koje se nalaze kao završeci kristalnih rešetaka koje čine osnovnu strukturu, tj. jezgro ovih nanočestica. Formiranjem vodoničnih veza između ovih hidroksilnih grupa i molekula vode dolazi do hidratacije površine nanočestica pri čemu su molekuli vode organizovani u više slojeva oko nanočestice. Polarnost i gustina naelektrisanja jezgra čestica diktira debljinu formiranog sloja vode oko nje. Upravo hidroksilne grupe su u stanju da reaguju sa različitim agensima kao što su karboksilne kiseline, sumporna i fosforna kiselina, kao i bifunkcionalni kuplujući agensi (organosilani), omogućavajući time dobru podlogu za primenu različitih metoda za modifikaciju nanočestica. Međutim, reaktivnost površine nanočestica oksida metala zavisiće od reaktivnosti katjona metala od kog je sastavljena, njegovog koordinacionog broja i stepena oksidacije.

Bifunkcionalni kuplujući agensi, organosilani, se najčešće koriste kao sredstva za kovalentnu modifikaciju-„grafting“ metodom.¹¹⁵ Struktura kuplujućih agenasa može se predstaviti kao RSiX_3 gde X predstavlja hidrolizibilnu grupu koja je etoksi ili metoksi grupa, a R predstavlja organsko-funkcionalni deo ovih molekula (slika 2.16.).

Reakcija silanizacije je reakcija kojom se površina nanočestica oksida metala modifikuje pomoću organosilana, kako u vodenoj sredini tako i u prisustvu organskih rastvarača.

Prilikom modifikacije površine nanočestica oksida metala organosilanima hidrolizibilna grupa X reaguje sa hidroksilnom grupom na površini nanočestice pri čemu se odvaja alkohol (metanol ili etanol), a stvara kovalentna veza između organosilana i površine nanočestice. Kao posledica kovalentnog vezivanja ovih agenasa različite terminalne funkcionalne grupe organo grupa R bivaju uvedene na površinu nanočestice. U zavisnosti od vrste terminalne funkcionalne grupe koju poseduje organosilan korišćen prilikom modifikacije može se kontrolisati hidrofobnost, odnosno hidrofilnost površine dobijene modifikovane nanočestice. U poslednje vreme ulaže se veliki trud kako bi se razvili različiti tipovi silanskih polimernih lanaca (R grupe organosilana), posebno onih koji imaju slobodnu hloridnu, tiolnu, karboksilnu, cijano ili amino grupu upravo zbog sposobnosti ovih grupa da vežu veće biomolekule od interesa (slika 2.16.).



Slika 2.16. Šematski prikaz molekula organosilana.

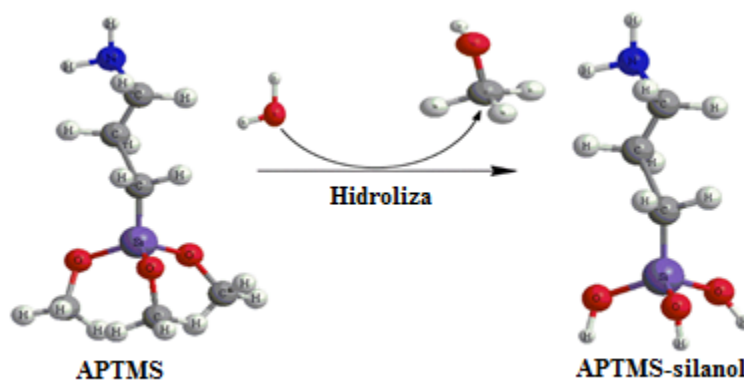
Treba napomenuti da je reakcija silanizacije atraktivna pre svega zbog hemijske veze koja se stvara između površine silike i silana, kao i zbog činjenice da pri ovom procesu skoro da ne dolazi do adsorpcije molekula silana na površinu što je slučaj kod sličnih vrsta postupaka.

Hemijska modifikacija reakcijom silanizacije nanočestica silike je proučavana korišćenjem aminosilana kakvi su npr. 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMS) i 3-aminopropiltrioksisilan (APTES) zbog značajnih pogodnosti koji ovi organosilani daju u kontekstu razumevanja samog postupka modifikacije površine.^{116, 117} Prilikom modifikacije silika nanočestica aminosilanima, površina dobijenih modifikovanih silika nanočestica je bogata amino grupama koje su pre svega pogodne za dalju modifikaciju zbog svoje reaktivnosti. Dalja modifikacija amino-modifikovanih nanočestica ima za cilj da omogući kovalentno vezivanje biomolekula. Biomolekuli se na površinu bogatu amino grupama mogu vezati isključivo adsorpcijom, pa otuda potreba za daljom modifikacijom.

2.4.2.1.1. Mehanizam reakcije silanizacije

Radi što boljeg razumevanja mehanizma reakcije silanizacije uzet je primer modifikacije nanočestica silike 3-aminopropiltrimetoksisilanom (APTMS-om) u vodenoj sredini. Stabilan monosloj aminosilana u obliku mreže formira se na površini nanočestica silike u tri koraka^{117, 118}:

1. U prvom koraku u prisustvu vode dolazi do hidrolize metoksi grupa APTMS-a, kao rezultat nastaju silanoli i oslobađa se alkohol (metanol). Na slici 2.17. je prikazan prvi korak reakcije silanizacije.



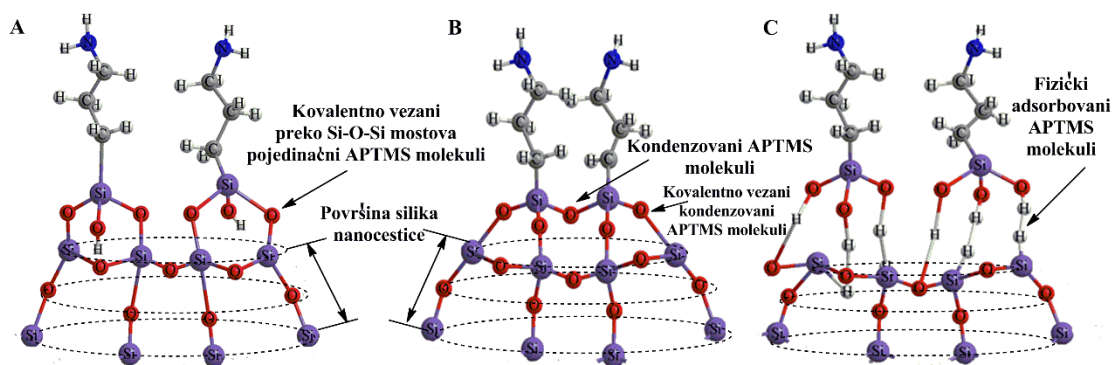
Slika 2.17. Šematski prikaz prvog koraka reakcije silanizacije.

2. U drugom koraku dolazi do povratne reakcije kondenzacije između dva molekula APTMS-silanola pri čemu se formira oligomerni lanac APTMS-a kao što je prikazano na slici 2.18.

silika nanočestica formiranjem siloksan veza. Dakle, može se zaključiti da se i hidroliza i kondenzacija molekula organosilana u organskom rastvaraču dešava isključivo na samoj površini nanočestice silike. U zavisnosti od organskog kraja korišćenog organosilana za modifikaciju rastvarač može, a i ne mora, biti potreban.

Mnogi eksperimentalni rezultati su, međutim, sugerisali da je ovo dosta uprošćeno objašnjenje po kome je sama reakcija silanizacije idealizovana, dok je u realnosti sam proces zapravo mnogo kompleksniji i osetljiv na uslove u kojima se odvija. Uticaj koji uslovi reakcije (temperatura, prisustvo vode, rastvarač i vreme trajanja reakcije) imaju na strukturu formiranog APTMS filma na površini nanočestica proučavan je pomoću FTIR-spektroskopije. Konkretno proučavana je struktura APTMS monosloja formiranog na površini nanočestice prilikom odigravanja reakcije u anhidrovanom toluenu, a došlo se do zaključka da postoje najmanje tri vrste APTMS molekula u formiranom monosloju i to:

1. Pojedinačni APTMS molekuli koji su hemijski vezani za površinu silike (slika 2.20. A).
2. APTMS molekuli kondenzovani sa drugim molekulom APTMS-a pri čemu formiraju lanac koji je hemijski vezan za površinu silike (slika 2.20. B)
3. Fizički adsorbovani molekuli APTMS-a (slika 2.20. C).



Slika 2.20. Šematski prikaz vrste APTMS molekula vezanih za površinu nanočestice silike.

Najveći problem stvaraju adsorbovani molekuli APTMS-a koji narušavaju strukturu i stabilnost monosloja formiranog na površini silike i otežavaju imobilizaciju biomolekula. Sonifikacijom modifikovanih nanočestica silika nakon završene reakcije silanizacije dolazi do desorpcije APTMS molekula i dobija se mehanički stabilniji monosloj na njihovoj površini.¹¹⁹

2.4.2.1.2. Faktori koji utiču na reakciju silanizacije

Na sam proces silanizacije utiču mnogobrojni faktori, kao što su broj grupa koje mogu hidrolizovati u molekulu organosilana, temperatura, priroda rastvora u kome se proces odvija, količina vode u toku reakcije, kao i vodeni film koji se može formirati na površini silike.

Uticaj vode na proces silanizacije

Vodeni film adsorbovan na površini silike i količina vode u reakcionoj smeši značajno utiču na graftovanje, zbog čega je ova reakcija izvođena u dva različita rastvora. Dobijeni podaci su poređeni kako bi se optimizovali uslovi pod kojima je najbolje da se izvodi ova modifikacija. Silanizacija je rađena u kiselom vodenom rastvoru (pH=3-5) i u anhidrovanom toluenu upravo da bi se ograničila količina nekovalentno vezanih molekula silana i količina vode.⁹²

Tretmanom u anhidrovanom toluenu dobija se homogenija i stabilnija površina sa znatno manje nekovalentno vezanih molekula silana za razliku od graftovanja izvršenog u kiselom vodenom rastvoru. Ustanovljeno je da homogenost površine direktno zavisi od količine vode na površini silike, tj. da se broj vezanih agregata silana znatno povećava što je veća hidratacija. Voda katalizuje reakciju kondenzacije između dva molekula silana i time dolazi do stvaranja agregata koji narušavaju homogenost površine.¹¹⁹

Problem stvaranja agregata može se rešiti i dodavanjem 99 %-nog metanola, pri čemu će se ravnoteža u reakciji kondenzacije između dva molekula silana pomeriti u suprotnom smeru. Ipak i u anhidrovanom rastvoru na površini silike pojaviće se određena količina vode, ali ova voda je potrebna jer katalizuje reakciju kondenzacije između silike i hidrolizovanog silana. Površina silike je hidrofilna ako se silanizacija vrši u kiseloj sredini, dok je u anhidrovanj sredini površina silike hidrofobna.

Pre reakcije silanizacije u kiselom vodenom rastvoru može se izvesti priprema površine silike kako bi se smanjila količina adsorbovane vode na njenoj površini. Ona se odvija u tri koraka: čišćenje površine, hidroliza površine i sušenje. Proces čišćenja površine se vrši u ključalim vodenim rastvorima metanola, dihlormetana i na kraju u rastvoru acetona. Pošto je količina adsobovane vode na površini silike ili vode prisutne tokom reakcije silanizacije ključna za reakciju između silana i silike, površina silike nakon čišćenja hidrolizuje u ključaloj vodi. Sušenje se vrši na temperaturi od 420 °C.

Kada se silanizacija odigrava u anhidrovanom rastvoru priprema površine silike se razlikuje. Površina se prvo očisti acetonom, zatim se potopi u rastvor sumporne kiseline i vodonik-peroksida čime se smanjuje količina vezane vode na površini silike.¹¹⁹

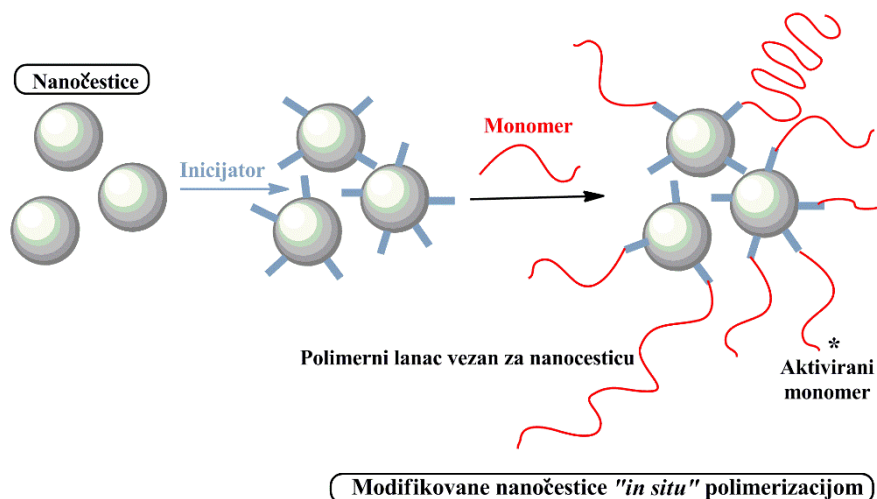
Uticaj temperature na proces silanizacije

Proučavani su efekti koje povišena temperatura ima na sam proces silanizacije i rezultati su pokazali da se izvođenjem ove reakcije na temperaturama iznad 70 °C poboljšava organizacija strukture površine modifikovane silike i dolazi do jačanja horizontalne polimerizacije tj. stvaranja Si-O-Si veza između dva molekula APTMS-a nakon vezivanja lanaca APTMS-a za površinu. Pokazalo se da je vezivanje lanaca APTMS-a na površinu silike mnogo bolje na nižim temperaturama, jer na visokim temperaturama ne dolazi do potpune hidrolize metoksi grupa, a samim tim ni do potpunog vezivanja APTMS i silike. Povišena temperatura takođe stabilizuje jonski oblik NH₂ grupe čime se povećava reaktivnost APTMS monosloja prema okolini ili u daljem tretmanu.¹²⁰

2.4.2.2. „In situ“ polimerizacija nanočestica

„In situ“ polimerizacija ili površinski inicirana polimerizacija je kovalentan metod modifikacije površine nanočestica koji uključuje korišćenje takozvanih inicijatora kao što su azo-, peroksidni i fotoinicijatori ili slobodni radikali. Specifičnost ove metode je i u tome što se polimerizacija odigrava direktno na površini nanočestica, a ne u reakcionoj smeši otuda i naziv površinski inicirana polimerizacija. Dobijene nanočestice na svojoj površini imaju vezane polimerne lance u vidu vlakana koja su pokretljiva i slobodno štrče ka okolini pa se takve modifikovane nanočestice još nazivaju i polimerne „četkice“.¹²¹

Za površinu nanočestice se prvo vezuje inicijator u vidu monosloja, nakon čega se za njih vezuju monomeri koji se koriste za modifikaciju. U sledećoj fazi dolazi do polimerizacije aktiviranih monomera vezanih za površinu čestica. Polimerni lanac raste u smeru suprotnom od površine nanočestice kao što je šematski prikazano na slici 2.21. Nakon završene polimerizacije dolazi do kovalentnog vezivanja polimera za površinu nanočestice. Pored inicijatora i monomera u reakcionu smešu je potrebno dodati i katalizator kako bi došlo do rasta lanca polimera.¹²²



Slika 2.21. Šematski prikaz mehanizma „in situ“ polimerizacije nanočestica.

Ovaj metod modifikacije se najčešće koristi kada je potrebno dobiti veliku gustinu graftovanog polimera na površini nanočestica. Problem može nastati kada se dostigne određena gustina polimera na površini nanočestica jer, usled sternih smetnji koje nastaju od susednih prethodno vezanih polimernih lanaca, nov lanac ne može da priđe samoj površini čestice. Ovaj metod je jednostavniji u odnosu na „grafting“ metod i omogućava bolju kontrolu vezivanja, kao i karakterizaciju polimernih lanaca pre vezivanja.⁹³ Moguće je dobiti film na površini čestica koji je deo i do 100 nm, što je nemoguće kod „grafting“ metode. Kod ove metode nije zapaženo vezivanje polimernih lanaca adsorpcijom jer nema polimerizacije van površine nanočestica.

Tokom poslednje decenije ovaj metod modifikacije nanočestica je postao veoma popularan, pa su tako razvijeni različiti mehanizmi „in situ“ polimerizacije monomera⁹³:

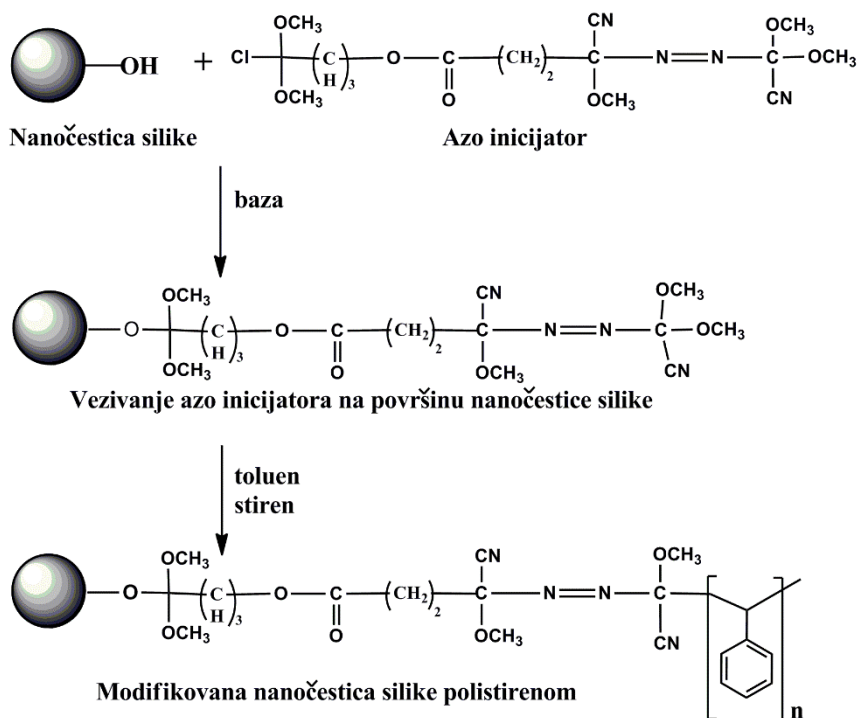
1. konvencionalna slobodno-radikalna polimerizacija,
2. kontrolisana slobodno-radikalna polimerizacija u koju spadaju azot-oksidom posredovana polimerizacija, polimerizacija transferom lanaca, prenos atoma radikalskom polimerizacijom, katjonska ili anjonska polimerizacija i polimerizacija otvaranjem prstena,
3. UV-indukovana polimerizacija.

2.4.2.2.1. Modifikacija nanočestica konvencionalnom slobodno-radikalnom polimerizacijom

Ovaj metod polimerizacije je jedan od najviše primenjivanih jer se može koristiti za polimerizaciju velikog broja monomera (sa različitim funkcionalnim grupama) u širokom opsegu reakcionih uslova. Najpogodniji je za modifikaciju nanočestica polarnim

polimerima. Prvi su ovaj vid polimerizacije opisali i razvili Pruker i Rue.¹²³ Sastoji se iz četiri faze: inicijacija, propagacija, terminacija i prenos lanca polimera na površinu nanočestice. Inicijacija obuhvata nastanak slobodnih radikala i potom njihovu reakciju sa monomerom. Kod ovog tipa polimerizacije kao inicijatori se najčešće koriste dijazo derivati i peroksidi. Propagacija se dešava konstantnom adicijom radikala rastućeg polimernog lanca na dvostruku vezu u monomeru. Terminacija nastaje kada dođe do reakcije između dva aktivna radikala polimernih lanaca. I na kraju kada je polimerizacija završena dobijeni lanac se prenosi na površinu nanočestica.

Primer modifikacije nanočestica silike ovom metodom je modifikacija polistirenom.¹²⁴ Kao inicijator koristi se azo inicijator, kao monomer stiren koji konvencionalnom slobodno-radikalskom polimerizacijom gradi polistiren (slika 2.22.). Ovim postupkom dobijene su modifikovane nanočestice sa velikom gustinom polimera na svojoj površini. Jedini problem koji se javio pri korišćenju ove metode je taj da nije došlo do vezivanja tj. transfera svih lanca polimera na nanočestice silike i njihovog kovalentnog vezivanja za površinu nego je došlo do adsorpcije određenog broja polistirenskih lanaca. Ovaj problem je prevaziđen ispiranjem modifikovanih nanočestica toluenom i centrifugiranjem. Postupak ispiranja i centrifugiranja se ponavlja 5 do 10 puta.



Slika 2.22. Šema kovalentnog vezivanja polistirena za nanočestice silike pomoću azo-inicijatora.¹²⁴

Polimeri sintetisani konvencionalnom radikalskom polimerizacijom imaju velike molekulske mase kao i široku raspodelu masa i lošu kontrolu nad funkcionalnim krajevima polimera. Ovi nedostaci se mogu prevazići korišćenjem kontrolisane slobodno-radikalске polimerizacije.

2.4.2.2.2. Modifikacija nanočestica kontrolisanom slobodno-radikalskom polimerizacijom

Kontrolisanom slobodno-radikalskom polimerizacijom može se modifikovati površina silika nanočestica korišćenjem velikog broja polimera. Ovom polimerizacijom dobijaju se dobro definisani polimeri sa pravilnom distribucijom molekulskih masa. Faza terminacije polimerizacije je zanemarljiva čime je smanjena mogućnost dobijanja polimera sa neodgovarajućim funkcionalnim krajem.¹²⁵

U skorije vreme je počeo ovaj vid polimerizacije da se koristi za modifikaciju nanočestica silike. Prednost ove modifikacije je u tome što inicijator, koji je vezan na površini nanočestica silike, čini mobilnu barijeru koja onemogućava fazu terminacije.¹²⁶ Takođe, zbog velike specifične površine nanočestica silike, većina inicijatora se nalazi na površini, čime je onemogućeno da slobodni aktivni radikali stvaraju problem prilikom polimerizacije jer se polimerizacija isključivo odigrava na površini nanočestica silike. Tako je kod ovog tipa polimerizacije stvoren balans između inicijacije i propagacije dok je kod konvencionalne slobodno-radikalске polimerizacije uspostavljen balans između aktivacije i deaktivacije. Brzina inicijacije kod ove metode mora biti velika dok je brzina propagacije mala što dovodi do toga da se inicijacija svih lanaca dešava simultano i time je moguće kontrolisati strukturu i molekulsku masu sintetisanih polimernih lanaca na površini silika nanočestica.

Najviše proučavani primeri kontrolisane slobodno-radikalске polimerizacije su: azot-oksidom posredovana polimerizacija (na engl. *Nitroxide mediated radical polymerization*, (NMP)), polimerizacija prenosom fragmenata lanaca polimera (na engl. *Reversible addition fragmentation chain transfer*, (RAFT)) i polimerizacija prenosom atoma (na engl. *Atom transfer radical polymerization*, (ATRP)). Pri čemu ATRP ima prednost u odnosu na ove druge dve polimerizacije jer je znatno jednostavnija.

Modifikacija nanočestica ATRP polimerizacijom

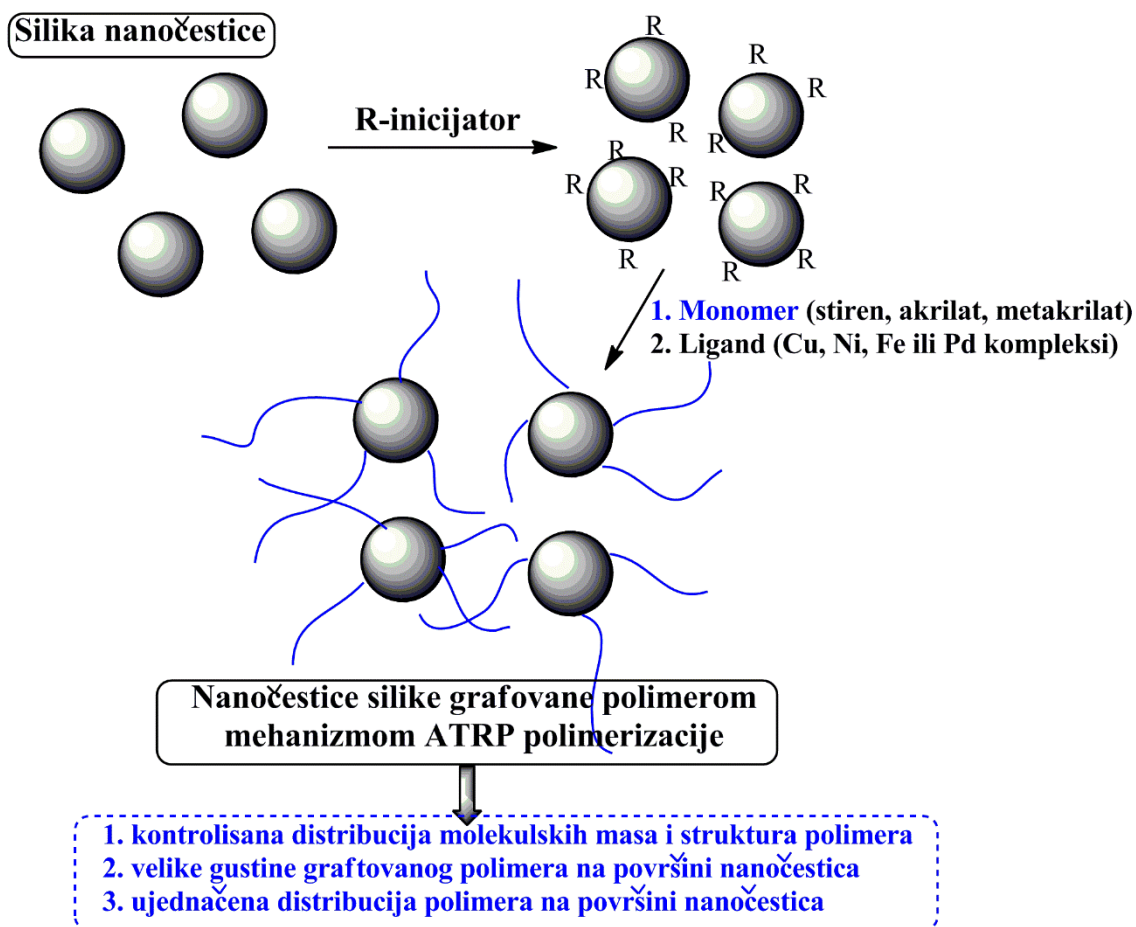
ATRP polimerizacija je uspešno primenjena za modifikaciju nanočestica silike i zlata,¹²⁷ kao i prilikom modifikacije nanočestica u obliku pločica i poroznih sfernih čestica.

Prilikom ove polimerizacije mogu se koristiti različiti vinil monomeri kao što su npr. stiren, akrilati i metakrilati, ali uz izuzetke kao što su akrilamid, vinil hlorid i vinil estri. Vrlo često se prilikom ATRP polimerizacije kao katalizatori koriste kompleksna jedinjenja Cu(II), Ni(II) i Pd(II).¹²⁸⁻¹³⁰ Kontrola polimerizacije se uspostavlja zahvaljujući reverzibilnoj reakciji aktivacije-deaktivacije između rastućeg polimernog lanca i metalnih kompleksa. Najviše se za ovaj tip polimerizacije koristi metil-metakrilat.¹³¹ Sinteza „četkica“ poli(metil-metakrilata) je izučavana elipsometrijom i dokazano je da se za 12 h mogu sintetisati „četkice“ debljine do 80 nm. Takođe je dokazano i da debljina filma polimera formiranog na površini nanočestica direktno zavisi od koncentracije inicijatora u reakcionoj smeši. Što je veća koncentracija inicijatora deblji je sloj filma formiranog na površini čestica.

Na slici 2.23. je šematski prikazana procedura modifikacije silika nanočestica mehanizmom ATRP polimerizacije. Nanočestice silike su uspešno modifikovane ATRP polimerizacijom sa 2-(4-hlorosulfonilfenil)etiltrioksisilanom u prisustvu Cu(I) kompleksa.¹³² Cu(I) kompleks je u ovom slučaju imao ulogu da deaktivira polimerizaciju. Hedrik i sar.¹³³ su nanočestice silike modifikovali metil-metakrilatom u prisustvu Ni(II) kompleksa kao katalizatora.

Prilikom ove modifikacije kao inicijatori su korišćeni alkoksiamini i alkilhaloestri koji su se pokazali kao mnogo bolji u odnosu na azo-inicijatore, jer su dobijeni polimeri kontrolisane molekulske mase i strukture. Patern i sar.¹³¹ su izučavali uticaj veličine nanočestica silike na ATRP polimerizaciju i došli su do zaključka da čestice manje od 75 nm mogu biti vrlo lako modifikovane ovom metodom pri čemu se dobijaju polimeri kontrolisane molekulske mase i velike gustine na površini silika nanočestica. S druge strane, pri modifikaciji nanočestica silike većih od 300 nm je zapažen nedostatak kontrole nad polimerizacijom čime su dobijeni polimeri široke raspodele molekulskih masa koji su bili neravnomerno raspoređeni na površini nanočestica silike.

Zaokret u primeni ATRP polimerizacije za modifikaciju nanočestica silike su napravili Karot i sar.¹³⁴ koji su uspešno graftovali stiren na površinu ovih nanočestica. U njihovoj metodi nanočestice silike su držane u dimetil-acetamidu tokom modifikacije kako bi se onemogućila agregacija nanočestica. Ova metoda se pokazala kao uspešna jer je dobijena kontrolisana molekulska masa polimera i dobra distribucija polimera na površini nanočestica.



Slika 2.23. Šematski prikaz modifikacije nanočestica silike ATRP polimerizacijom.

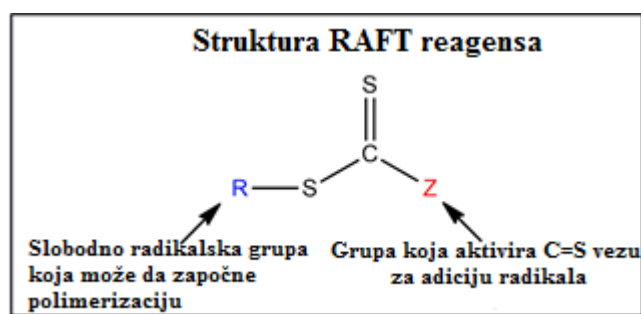
Još jedan od primera „*in situ*“ polimerizacije ATRP mehanizmom je modifikacija nanočestica silike pomoću nejonskog polimera poli(oksietilen-metakrilata) (POEM) i jonskog polimera poli(stiren-sulfonske kiseline) (PSSA).⁹⁰

Modifikacija se odigrava u tri koraka: prvo dolazi do aktivacije silanol grupa koje se nalaze na površini nanočestica silike, potom dolazi do supstitucije OH grupa Cl⁻ grupama (drugi korak), da bi na kraju došlo do graftovanja polimera za površinu nanočestice polimerizacijom i to mehanizmom koji obuhvata prenos ATRP polimerizacijom.

Modifikacija nanočestica RAFT polimerizacijom

RAFT polimerizacijom se modifikuju nanočestice korišćenjem reagenasa koji sadrže tiokarbonilno grupu (S=C-S) za koju je vezana slobodno-radikalna grupa (R) koja omogućava reiniciranje polimerizacije i još jedna grupa (Z) koja može da aktivira C=S vezu za adiranje radikala (slika 2.24.)¹³⁵. RAFT reagensi kakvi su ditioestri ili tritioarbonati su u stanju da kontrolišu polimerizaciju monomera kao što su stiren, metil-

akrilat i metil-metakrilat. Ditiokarbamati se koriste za kontrolu polimerizacije vinil-acetata i N-vinilkarbazola.¹³⁶



Slika 2.24. Opšta struktura RAFT reagensa.

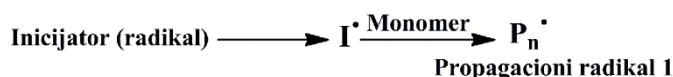
Mehanizam RAFT polimerizacije se sastoji iz više koraka (slika 2.25.)¹³⁶:

1. Inicijacija i propagacija obuhvataju vezivanje radikala inicijatora za monomer i stvaranje propagacionog radikala 1 (P_n^\bullet).
2. Propagacioni radikal se potom adira na RAFT reagens 1 pri čemu nastaje RAFT reagens radikal 2 koji se odmah razlaže na RAFT reagens 3 i radikal R^\bullet .
3. Radikal R^\bullet ponovo inicira reakciju formirajući propagacioni radikal 2 (P_m^\bullet).
4. U finalnom koraku se uspostavlja ravnoteža između propagacionog radikala 1 i 2 i RAFT reagens 3. Ravnoteža se mora brzo uspostaviti kako bi verovatnoća rasta svih lanaca bila podjednaka što će dovesti do stvaranja polimernih lanaca tačno definisane molekulske mase.
5. Terminacija obuhvata reakciju između propagacionih radikala 1 i 2 pri čemu nastaje polimer koji se može vezati za nanočesticu.

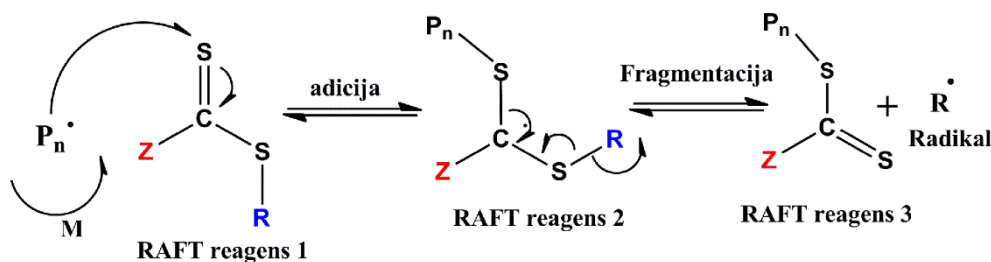
RAFT polimerizacija ima prednost u odnosu na ATRP polimerizaciju jer dozvoljava korišćenje šireg spektra monomera pre svega se to odnosi na vinil-acetat. Za vinil-acetat je dokazano da ga nije moguće polimerizovati ATRP mehanizmom. Ovaj vid polimerizacije se intenzivno koristi za sintezu blok kopolimera, cikličnih polimera i zvezdastih polimera.¹³⁷

Postoji samo nekoliko radova u kojima je opisana modifikacija silika nanočestica RAFT polimerizacijom. Pre svega nanočestice silike su uspešno modifikovane polimetilmetakrilatom i poli(N,N-dimetilakrilamidom) RAFT polimerizacijom pri čemu je korišćen ditiobenzoat kao RAFT agens.¹³⁸

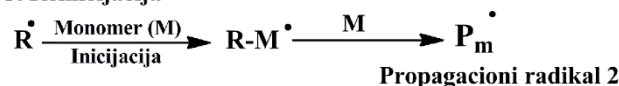
1. Inicijacija i propagacija



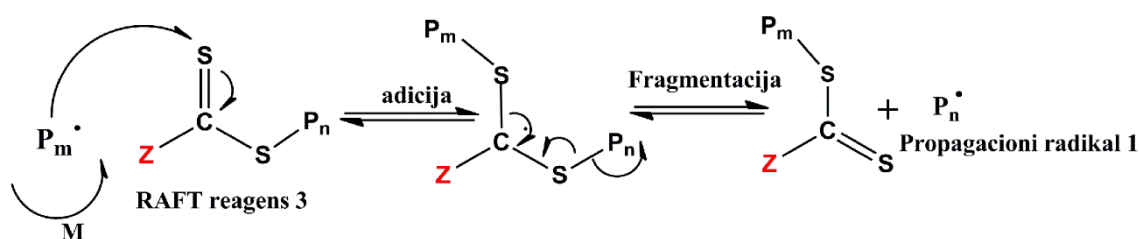
2. Reverzibilna fragmentacija lanca



3. Reinicijacija



4. Uspostavljanje ravnoteže



5. Terminacija



Slika 2.25. Šematski prikaz mehanizma RAFT polimerizacije.

Dobijene „četkice“ silika nanočestica nakon 12 h i 48 h na 90 °C su imale debljinu filma polimera na površini od 28 nm i 11 nm, redom. U poređenu sa ATRP polimerizacijom, gde su korišćeni isti polimeri i inicijator s tim da je dodat ligand Cu(I)Br kompleks, ova metoda je dosta sporija jer je ATRP polimerizacijom na 110 °C za 1,5 h dobijena ista debljina polimernog filma na površini nanočestica silike.¹³⁹

Modifikacija nanočestica NMP polimerizacijom

Azot-oksidi posredovana polimerizacija ima isti mehanizam kao ATRP polimerizacija osim što za nju nije potreban katalizator jer se inicijacija polimerizacije vrši zagrevanjem. Ova polimerizacija se odigrava posredstvom azot-oksida radikala. Ovi radikali mogu da reverzibilno reaguju sa rastućim lancem polimera, ali nisu u stanju da iniciraju polimerizaciju. Inicijatori se obično prave termičkom razgradnjom azo- ili peroksidnih inicijatora u prisustvu monomera i azot-oksida.

Bartolom i sar.¹⁴⁰ su uspešno ovom metodom modifikovali nanočestice silike alkoksiaminima koji su kovalentno vezani za površinu ovih nanočestica. Ovo je ujedno i jedini pokušaj modifikacije silika nanočestica ovom metodom.

Blomberg i sar.¹⁴¹ su primenom NMP polimerizacije uspeali da sintetišu šuplje nanočestice koje se mogu koristiti kao nosači za lekove modifikacijom silika nanočestica sa stirenom pomoću etoksiamintrihihlorosilana kao inicijatora. Dobijene su „četkice“ sa polistirenom koje imaju šupljo jezgro pogodno za smeštanje bioaktivnih substanci, jer je uklonjeno jezgro koju su činile nanočestice silike fluorovodoničnom kiselinom.

2.4.2.2.3. UV-indukovana polimerizacija

Kim i sar.⁹² su u svojoj studiji predstavili metod „*in situ*“ graftovanja polimera metilmetakrilata pomoću UV aktivacije. Polimerizacija metilmetakrilata (MMA) je inicirana UV radijacijom. Ovako inicirana polimerizacija je veoma brza i efikasna. Slobodne OH grupe su mesta na koja će biti vezani UV aktivirani polimeri. Polimerizacija se odigrava na svakoj čestici pojedinačno. Zapaženo je značajno povećanje prečnika čestica usled polimerizacije koja se događa na njihovoj površini. Pa se može reći da je to ujedno i jedna od mana ovog načina modifikacije silika nanočestica.

Šin i sar.¹⁴² su površinu silika nanočestica sintetisanih Šteberovom metodom modifikovali sa poli(etilen glikol) metakrilatom (PEGMA) i poli(propilen glikol) metakrilatom (PPGMA). Ovi polimeri su graftovani za površinu silika nanočestica UV-fotopolimerizacijom. Kao rezultat dobijene su sferne nanočestice sa malim prinosom mase, hidrofobnog karaktera i smanjenom sposobnošću da adsorbuju vodu, kao i sa smanjenom električnom provodljivošću.

2.4.3. Modifikacija nanočestica modifikujućim reagensima

Metoda modifikacije pomoću modifikujućih agenasa obuhvata korišćenje reagenasa koji reaguju sa hidroksilnim grupama na površini silika nanočestica pri čemu se kovalentno vezuju za nju. Najčešće se koriste kao modifikujućim agensi toluen-2,4-diizocijanid (TDI),¹⁴³ glicidilfenil etar (GPE),¹⁴⁴ epihlorhidrin,¹⁴⁵ glutaraldehid i cijanogen-bromid.

2.5. Imobilizacija enzima adsopcijom na neporozne nanočestice silike

U poglavlju 2.2. su navedene sve vrste neorganskih nanočestica koje su do sada uspešno korišćene za imobilizaciju enzima. Među njima veliku prednost zbog svojih fizičkih i hemijskih karakteristika imaju nanočestice silike. U dosadašnjoj praksi se pokazalo da su nemodifikovane nanočestice silike veoma dobar materijal prvenstveno za adsorpciju različitih biomolekula. Uopšteno gledano pri adsorpciji biomolekula na ovaj tip nanočestica dolazi do stvaranja nekovalentnih interakcija između terminalnih silanol grupa koje se nalaze na površini silika nanočestica i funkcionalnih grupa prisutnih u biomolekulu. Dominatno se formiraju elektrostatičke interakcije i vodonične veze koje nastaju zahvaljujući prisutnim grupama i njihovom naelektrisanju na površini kako biomolekula tako i silike.⁴⁹

Najveći izazov pri adsorpciji enzima na čvrste nosače je da se identifikuje i predvidi mehanizam koji kontroliše stvaranje interakcija između enzima i nosača. Mehanizam stvaranja interakcija zavisi od temperature, koncentracije, jonske jačine i pH.¹⁴⁶ Kako enzimi poseduju ogromnu hemijsku i fizičku raznovrsnost, za očekivati je da bude više značajnih mehanizama stvaranja interakcija između enzima i nosača.

Zbog svih ovih navedenih razloga u daljem tekstu će biti razmatrani faktori koji utiču na adsorpciju različitih enzima na nanočestice silike sa posebnim osvrtom na neporozne nanočestice silike sintetisane piro-hidrogenizacijom (pirogene nanočestice silike). Adsorpcija enzima na nanočestice silike u vodenoj sredini je veoma kompleksna i zavisi od više faktora:

1. morfologije i koncentracije nanočestica,
2. strukture i koncentracije enzima koji adsorbuje,
3. pH sredine u kojoj se dešava adsorpcija,
4. jonske jačine vodenog rastvora.

2.5.1. Uticaj strukture nanočestica silike na adsorpciju enzima

Kao što je već rečeno u poglavlju 2.3., pirogena neporozna nanosilika je amorfan materijal koji se sastoji od neporoznih sfera nanodimenzija koje poseduju veliku specifičnu površinu i pokazuju veliki afinitet ka adsorpciji organomolekula u vodenoj sredini.

Međutim, problem se javlja zbog činjenice da pojedinačne nanočestice silike stvaraju agregate koji imaju i do 10 puta veći prečnik što ima za posledicu smanjenu površinu za

vezivanje enzima. Neki autori tvrde da se za formiranje agregata zaslužne vodonične i elektrostatičke interakcije koje nastaju između pojedinačnih čestica. Drugi autori ipak misle da se agregacija primarnih čestica vrši preko Si-O-Si veza. Pomoću SEM i TEM mikroskopije teško je utvrditi tačan način formiranja agregata. Ono što je precizno utvrđeno je da broj i karakteristike intermolekulskih veza između primarnih čestica u agregatima zavisi od temperature i frekvencije sudara između primarnih čestica. Način formiranja agregata ima značajan uticaj na interakcije između nanočestica silike i polarnih jedinjenja kao što su voda, polimeri, proteini, surfaktanti i rastvarači.¹⁰⁴ Koncentrovane vodene suspenzije nanočestica silike, koje najčešće sadrže njihove agregate različitih veličina, su stabilne i ne gube sposobnost adsorpcije.

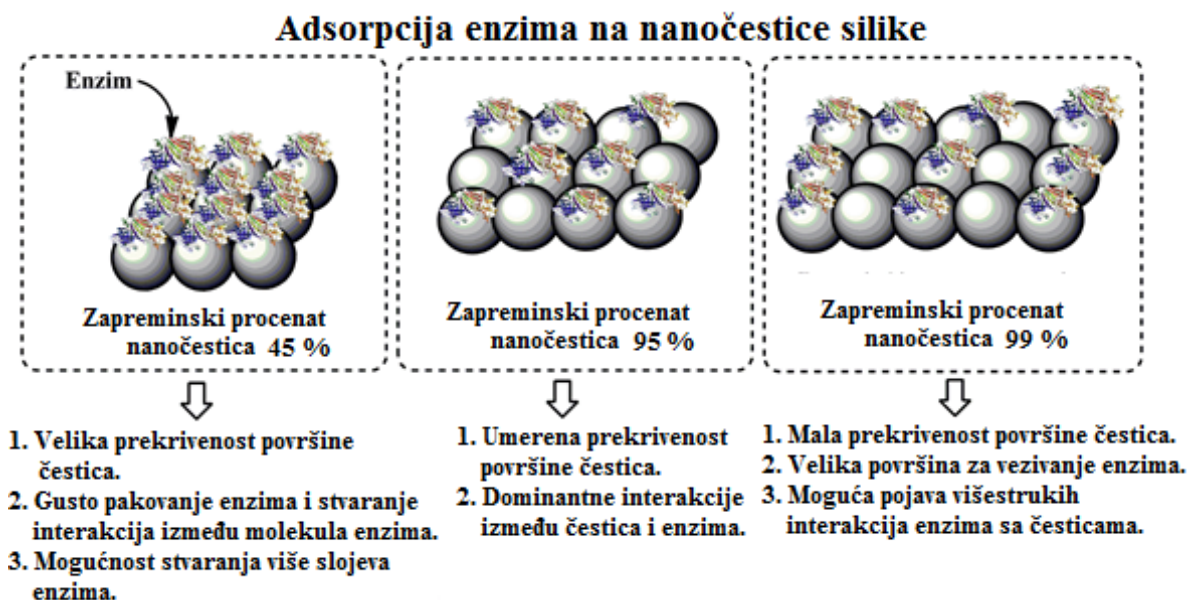
Hemijska modifikacija, imobilizacija polimera i dodavanje surfaktanata i alkohola u koncentrovanu vodenu suspenziju nanočestica silike mogu dovesti do promena u formiranim vodoničnim vezama između primarnih nanočestica i preraspodele naelektrisanja na površini agregata što opet dovodi do bolje disperzije primarnih čestica u suspenziji ili osušenim suspenzijama-prahovima. Prahovi dobijeni od čestica na koje su adsorbovani proteini, celuloza, lekovi i dr. molekuli imaju veliku primenu u medicini i biotehnologiji.^{48, 147, 148}

Stabilnost agregata primarnih čestica raste sa opadanjem prečnika primarnih čestica i veoma je važan faktor za adsorpciju enzima. Enzimi se vezuju na spoljašnju površinu agregata čiji je prečnik unutrašnjih kanala između čestica manji od prečnika molekula enzima. Kapacitet adsorpcije (mg proteina po m² površine čestica) smanjuje se sa smanjenjem specifične površine nanočestica silike (S_A) zbog smanjenja koncentracije dostupnih SiOH grupa na površini čestica jer su one glavna mesta za adsorpciju enzima. Koncentracija SiOH grupa se kreće od 2 do 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ u zavisnosti od S_A nanočestica silike.¹⁴⁷ Treba napomenuti da na površini nanočestica silike postoje tri vrste silanol grupa koje se razlikuju po hemijskoj reaktivnosti i ponašanju pri adsorpciji enzima. Vicinalne grupe silanol grupe, kojih i ima najviše, stvaraju najjače interakcije i najvažnije su za adsorpciju molekula na površinu nanočestica silike.

2.5.2. Uticaj odnosa nanočestica silike /enzima na adsorpciju enzima

Dosadašnja istraživanja su pokazala da što je veći zapreminski procenat nanočestica silike u uzorcima značajno je veća verovatnoća stvaranja jakih interakcija između enzima i nanočestica silike u odnosu na enzim-enzim interakcije. Međutim, u uzorcima sa

zapreminskim procentom nanočestica silike preko 95 % prevelika je površina nanočestica silike koja je dostupna enzimima da se za nju vežu, pa postoji mogućnost stvaranja prejakih i višestrukih interakcija što ima za posledicu deaktivaciju molekula enzima (slika 2.26.).



Slika 2.26. Šematski prikaz modela vezivanja enzima pri različitim udelima nanočestica silike.

Za uspešnu adsorpciju enzima potrebno je utvrditi optimalnu količinu nosača koju treba ponuditi određenoj količini enzima. U skladu sa prethodno iznetim činjenicama, može se zaključiti da je maksimum postignute katalitičke aktivnosti u direktnoj korelaciji sa količinom vezanog enzima u situacijama kada je prekrivenost površine nanočestica enzimom umerena.

U slučajevima kada je prekrivenost površine nanočestica enzimom mala javlja se mogućnost stvaranja višestrukih veza između enzima i nosača što može dovesti do konformacionih promena enzima, a time i do gubitka katalitičke aktivnosti. Jedan od načina da se što više molekula enzima zadržalo u aktivnoj konformaciji nakon adsorpcije je povećanje prekrivenosti površine nanočestica molekulima enzima.

Kada je prekrivenost površine nanočestica silike veoma velika najčešće dolazi do stvaranja više slojeva enzima na površini čestica što dovodi do limitacija u prenosu mase, a samim tim i do smanjenja katalitičke aktivnosti enzima.

Prethodno iznete tvrdnje su potkrepljene prilikom imobilizacije lipaze iz *Candida antarctica* (CAL B) na nanočestice silike. Dokazano je da CAL B adsorbuje tako što se

molekuli enzima gusto pakuju na površini nanočestica silike što omogućava da se njihova nativna struktura i katalitička aktivnost sačuva. Kada su molekuli CAL B veoma udaljeni jedan od drugog na površini silike dolazi do značajnog pada u katalitičkoj aktivnosti dobijenih imobilizata.¹¹⁴

Treba napomenuti da postoje i enzimi kojima ne odgovara gusto pakovanje na površini silika nanočestica jer dolazi do interakcija između susednih molekula enzima što ima za posledicu gubitak katalitičke aktivnosti. Primer takvog enzima je subtilizin Carlsberg.⁹³

2.5.3. Uticaj pH i jonske jačine rastvora na adsorpciju enzima na nanočestice silike

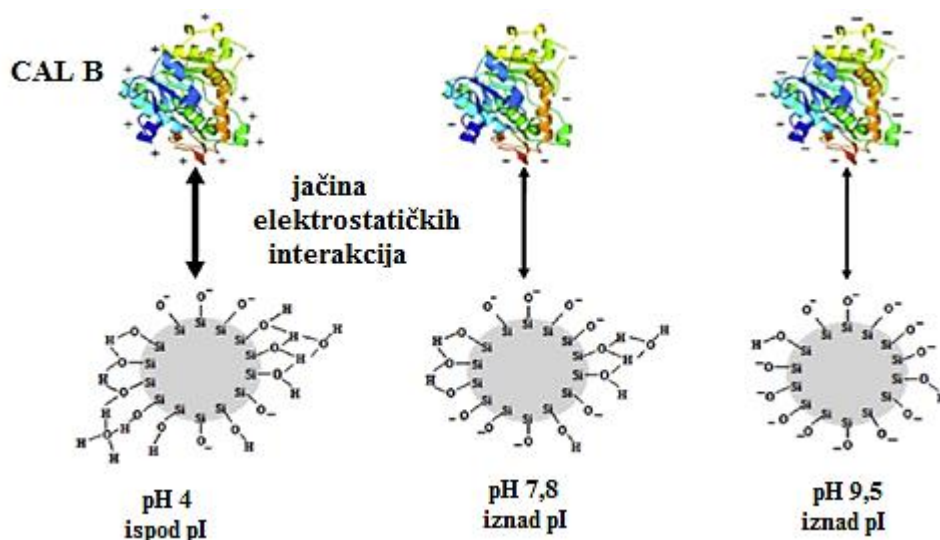
Na jačinu elektrostatičkih interakcija utiče naelektrisanje površine nanočestica silike i samog enzima. Kada je pH veći od 4 silanol grupe teže da budu deprotonovane pa je površina silike negativno naelektrisana. Kako se povećava pH sve veći deo silanol grupa je deprotonovan i samim tim je koncentracija negativnog naelektrisanja na površini sve veća.¹⁴⁹

Pa tako ako je površina enzima pri nižim pH pozitivno naelektrisana doći će do formiranja jakih privlačnih elektostatičkih interakcija između enzima i nanosilika čestica. Na slici 2.27. je prikazan uticaj pH na jačinu formiranih elektrostatičkih interakcija između CAL B i nanočestica silike.

Može se zapaziti da sa povećanjem pH dolazi do smanjenja jačine elektrostatičkih interakcija što je direktna posledica činjenice da molekuli CAL B na višim pH postaju negativno naelektrisani i da dolazi do nastanka odbojnih sila između molekula enzima i negativno naelektrisanih nanočestica silike.

Uticaj koji pH ima na adsorpciju izučavan je i prilikom imobilizacije α -amilaze na nanočestice silike.¹⁵⁰ Došlo se do zaključka da i ovom enzimu odgovara negativno naelektrisana površina nanočestica silike pa je imobilizacija vršena pri pH 5,5.

Praćenjem kinetike imobilizacije, dokazano je da se α -amilaza vezuje veoma brzo za površinu silika nanočestica i da se većinom formiraju jake elektrostatičke interakcije između pozitivno naelektrisanih grupa enzima i negativno naelektrisane površine nanočestica silike.



Slika 2.27. Šematski prikaz naelektrisanja površine silike i CAL B u zavisnosti od pH.

Dobijena adsorbovana α -amilaza se pokazala kao dobar sastojak formulacija deterdženata, pošto je pokazala veću efikasnost pri čišćenju u odnosu na slobodan enzim. Takođe, adsorpcijom α -amilaze na nanočestice silike došlo je i do povećanja stabilnosti deterdžentnih formulacija. Negativna strana imobilizacije ovog enzima na nanočestice silike je to što je imobilizacija povećala osetljivost enzima na ostale sastojke koji čine formulacije deterdženata.

2.5.4. Uticaj strukture enzima na adsorpciju na nanočestice silike

Enzimi se obično imobilišu preko amino grupe (terminalne α - i ϵ - lizina), karboksilne grupe, sulfhidrilne grupe cisteina, imidazolne grupe histidina, hidroksilne grupe serina i treonina ili fenolnog jezgra tirozina.

Od svih nabrojanih grupa najveći broj enzima adsorbuje preko amino grupa lizina. Postoji više razloga kojima se to može objasniti:

1. poseduju dobru reaktivnost,
2. lizin je amino kiselina koja je vrlo retko odgovorna za katalitičku aktivnost enzima,
3. protonovana amino grupa može graditi elektrostatičke interakcije sa nosačima,
4. veliki broj ostataka lizina se nalazi na površini molekula što ih čini dostupnim za formiranje interakcija sa nosačem.

Treba napomenuti da su ϵ -amino grupe lizina jako bazne i da se samim tim u nedisociranom obliku nalaze samo pri pH od 9 do 10 što je veoma često područje pH u

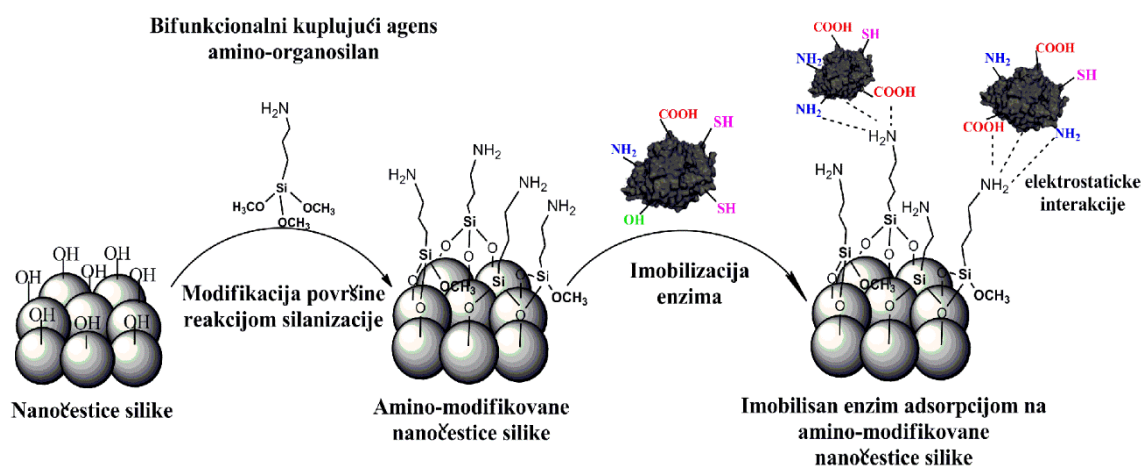
kojem većina enzima nije stabilna. Protonovan oblik ovih amino grupa je zanemarljive reaktivnosti. Terminalne α -amino grupe imaju niži pKa (približno oko 7-8) pa se u nedisociranom obliku nalaze u širem pH opsegu od ε -amino grupa. Dovoljno je da mali procenat amino grupa bude u nedisociranom obliku da se ostvare interakcije sa nosačem. Karboksilne grupe su takođe u velikom procentu prisutne u molekulima enzima, one mogu graditi vodonične veze ili elektrostatičke interakcije sa OH grupama nanočestica silike.

Fenolna, imidazolna i tiolna grupa su prisutne u molekulima enzima u malom procentu tako da nemaju dominantnu ulogu prilikom adsorpcije enzima. Hidroksilne grupe mogu graditi vodonične veze sa hidroksilnm grupama nanočestica silike.

2.6. Imobilizacija enzima na modifikovane neporozne nanočestice silike

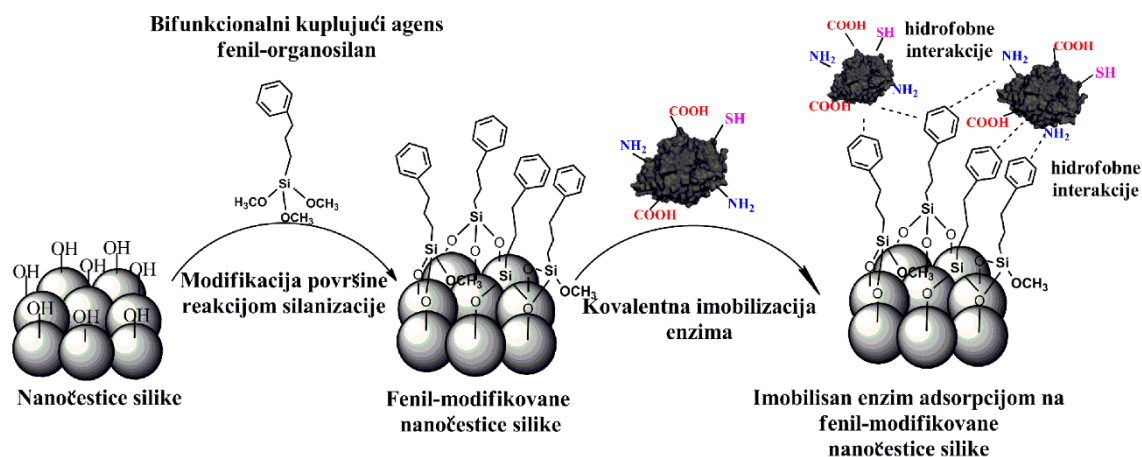
2.6.1. Adsorpcija enzima na nanočestice silike modifikovane silanizacijom

Metoda modifikacije površine nanočestica silike reakcijom silanizacije se najviše primenjuje pa je i najbolje proučena. Prilikom modifikacije nanočestica silike organosilanima koji poseduju aminopropil funkcionalnu grupu (kao što su npr. 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMS) i 3-aminopropiltrioksisilan (APTES)) usled reakcije između Si-OH grupa nanočestica i aminosilana dolazi do uvođenja amino grupa na površinu ovih čestica. Popularnost aminosilana kao modifikujućih agenasa leži u činjenicama da su: lako dostupni, jeftiniji u odnosu na druge komercijalno dostupne silane i u reaktivnosti uvedene amino grupe na površini nanočestica.¹⁵¹ Iz ugla imobilizacije enzima uvedene amino grupe omogućavaju vezivanje enzima uglavnom adsorpcijom (slika 2.28.). Međutim njihov značaj se ogleda u činjenici da one imaju ključnu ulogu u velikom broju procedura kojima se aktivira amino-modifikovan nosač kako bi se omogućila kovalentna imobilizacija enzima.



Slika 2.28. Šematski prikaz modifikacije silika nanočestica amino organosilanom i imobilizacije enzima adsorpcijom.

Fenil-trialkoksilani (kao što je npr. komercijalno dostupan trimetoksi(2-fenilpropil)silan) se takođe mogu koristiti za modifikaciju nanočestica silike kako bi se povećala hidrofobnost nanočestica i time omogućilo bolje vezivanje enzima adsorpcijom stvaranjem hidrofobnih interakcija (slika 2.29.).¹⁵²

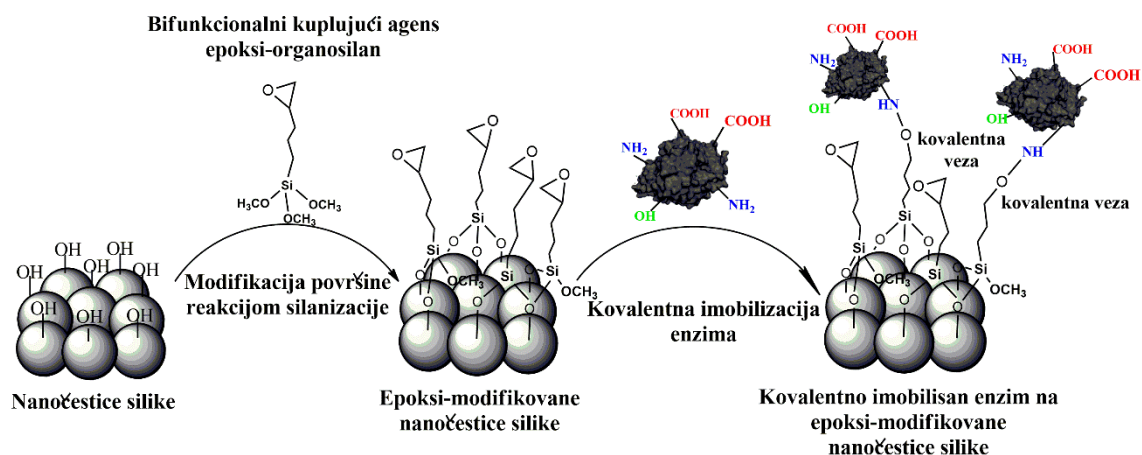


Slika 2.29. Šematski prikaz modifikacije nanočestica silike fenil organosilanom i imobilizacija enzima hidrofobnom adsorpcijom.

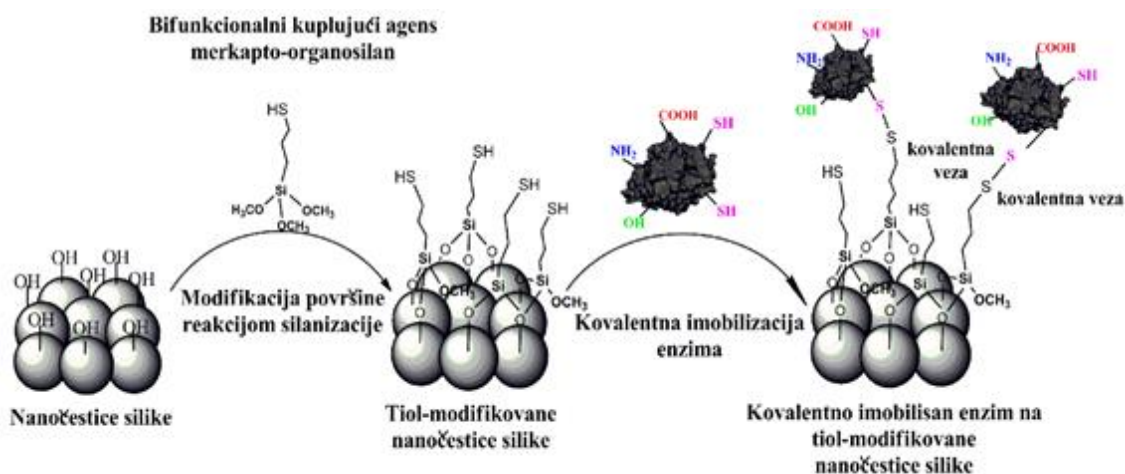
2.6.2. Kovalentna imobilizacija enzima na nanočestice silike modifikovane silanizacijom

Kovalentna imobilizacija enzima na čvrste nosače se zasniva na stvaranju najmanje jedne hemijske veze između funkcionalnih grupa enzima i čvrstog nosača. Pri čemu nije poželjno da dođe do stvaranja hemijskih veza između aminokiselinskih ostataka koji su esencijalni za katalitičku aktivnost enzima i nosača. Metode kovalentnog vezivanja enzima su obično složene, zametne, skupe i sastoje se iz najmanje dve faze: modifikacije i/ili aktivacije nosača i imobilizacije enzima na nosač.

Postoje organosilani koji poseduju funkcionalne grupe koje omogućavaju kovalentno vezivanje enzima bez dodatne aktivacije modifikovanih nanočestica. Primeri takvih silana su epoksi-propil-trialkoksasilani i merkaptopropil-trialkoksasilani (slika 2.30. i 2.31.).¹⁵³



Slika 2.30. Šematski prikaz modifikacije nanočestica silike epoksi-organosilanom.



Slika 2.31. Šematski prikaz modifikacije nanočestice silike merkaptorganosilanom.

Kovalentna imobilizacija enzima na modifikovane nanočestice.

Silanizacijom nanočestica silike epoksi-silanom dolazi do uvođenja epoksi grupa na njihovu površinu kao što je prikazano na slici 2.30. Uvedene grupe su jako reaktivne zbog čega nije potrebna dodatna aktivacija već se preko njih enzimi mogu direktno kovalentno vezati.

Modifikacijom silika nanočestica merkaptopropil-silanom dolazi do uvođenja tiolnih grupa na njihovu površinu. Dobijene nanočestice su izrazito hidrofobne i pogodne su za kovalentno vezivanje enzima koji u svom molekulu poseduju veliki broj cisteina. Uvođenje tiolnih grupa na površinu silika nanočestica može biti postignuto i njihovom modifikacijom aminosilanom da bi potom modifikovane nanočestice bile aktivirane *N*-acetilhomocistein tiolaktonom.¹⁵⁴ Ovako dobijene modifikovane nanočestice su hidrofilne, za razliku od onih dobijenih modifikacijom merkaptosilanom.

2.6.2.1. Aktiviranje nanočestica silike modifikovanih silanizacijom

Mali je broj funkcionalnih grupa koje mogu biti uvedene postupkom hemijske modifikacije na površinu nanočestica koje su toliko reaktivne da se može odmah pristupiti kovalentnoj imobilizaciji enzima na takve nanočestice. Usled toga veoma retko je moguće koristiti modifikovane nanočestice direktno za imobilizaciju enzima stvaranjem kovalentnih veza, već se pre imobilizacije pristupa aktivaciji enzima ili modifikovanih nanočestica. Postupci aktivacije enzima su veoma zametni i mogu dovesti do njegove denaturacije pa je to glavni razlog što se mnogo češće modifikovane nanočestice pre kovalentnog vezivanja hemijski obrađuju aktivatorima i modifikujućim agensima.

Kao što je prethodno navedeno, nanočestice na čiju površinu su uvedene epoksidne, tiolne i aldehidne grupe se mogu direktno koristiti za kovalentnu imobilizaciju enzima, tj. uvedene grupe su dovoljno reaktivne da mogu graditi kovalentnu vezu sa funkcionalnim grupama prisutnim u molekulima enzima.

Generalno aktivacija modifikovanih nanočestica se sastoji u tretiranju površine nanočestica koje sadrže grupe koje ne mogu da grade kovalentnu vezu sa funkcionalnim grupama enzima reagensima koji omogućavaju uvođenje reaktivnih elektrofilnih grupa na njihovu površinu.¹⁵³ Funkcionalne grupe koje se nalaze na površini molekula enzima su većinom nukleofilnog karaktera ili, ako i nisu, podešavanjem pH imobilizacije mogu postati. U većini slučajeva brza imobilizacija enzima sa velikim prinosom vezanog enzima po jedinici mase nanočestica se odigrava pri pH od 6 do 9. Najviše se koriste fosfatni puferi, dok TRIS pufer (koji sadrži tris(hidroksimetil)aminometanu) treba izbegavati zbog prisustva primarnih amino grupa koje se mogu takmičiti sa amino grupama enzima pri vezivanju za nanočestice. Takođe, mora se obratiti pažnja i na činjenicu da je pri visokim pH vrednostima hidroksilna grupa (OH^-) takođe nukleofil pa se može umesto enzima vezati za elektrofilnu grupu uvedenu na površinu silika nanočestica. Stoga se mora napraviti kompromis prilikom izbora pH za imobilizaciju između očuvanja elektrofilnosti uvedenih grupa na nanočestice i potrebne nukleofilnosti funkcionalnih grupa enzima koje učestvuju u formiranju kovalentnih veza enzima sa nanočesticama.

Kada se koriste relativno nereaktivne elektrofilne modifikovane nanočestice pogodno je koristiti rastvor za imobilizaciju čija je pH veća od 8, sa druge strane reaktivne elektrofilne modifikovane nanočestice zahtevaju da pH bude oko 6 ili manja jer će u tim slučajevima jako mali ali dovoljan procenat neprotonovanih ostataka lizina biti prisutni u molekulu enzima za reakciju sa elektrofilnim grupama prisutnim na površini nanočestica.^{153, 155}

Najrasprostranjenije nukleofilne funkcionalne grupe u molekulima enzima su amino grupe koje su ujedno i najznačajnije za vezivanje sa elektrofilnim grupama prisutnim na površini nanočestica.¹⁵⁵

ϵ -Amino grupe lizina su veoma bazne i nalaze se u nedisosovanom obliku samo u baznoj sredini na pH većim od 9 što nije uvek u saglasnosti sa stabilnošću enzima. S druge strane reaktivnost protonovanih amino grupa je zanemarljiva. Terminalne α -

amino grupe imaju niže pKa vrednosti od 7-8 pa se njihovo učešće u reakciji sa elektrofilnom grupom nosača može proširiti i na neutralne pH vrednosti, problem je što ove grupe nisu uvek izložene na površini molekula enzima nego se većinom nalaze u njegovoj unutrašnjosti. Srećom kako je već rečeno na pH vrednostima oko 6 i jako mali udeo neprotonovanih amino grupa može biti dovoljan za reakciju sa elektrofilnim grupama nosača.

Hidroksilne grupe serina su takođe nukleofilne i mogu reagovati sa uvedenim elektrofilnim grupama. Karboksilne grupe iako prisutne u značajnoj meri nisu dovoljno reaktivne, i da bi se koristile moraju biti aktivirane.^{155, 156}

U daljem tekstu će biti sumirane najvažnije procedure aktivacije površine silanizacijom modifikovanih nanočestica silike. Fokus će biti na molekulskom mehanizmu i operativnim uslovima procedure aktivacije silanizacijom modifikovanih nanočestica silike.

2.6.2.1.1. Aktivacija amino-modifikovanih nanočestica silike cijanuril-hloridom

Uvedene amino grupe silanizacijom na površinu modifikovanih čestica mogu biti tretirane 2,4,6-trihlor-1,3,5-triazinom (cijanuril-hlorid) (slika 2.32.). Ovako aktivirana površina nanočestica silike će omogućiti lakšu kovalentnu intramolekulsku imobilizaciju enzima, pri čemu se može dobiti znatno stabilniji i aktivniji enzim.

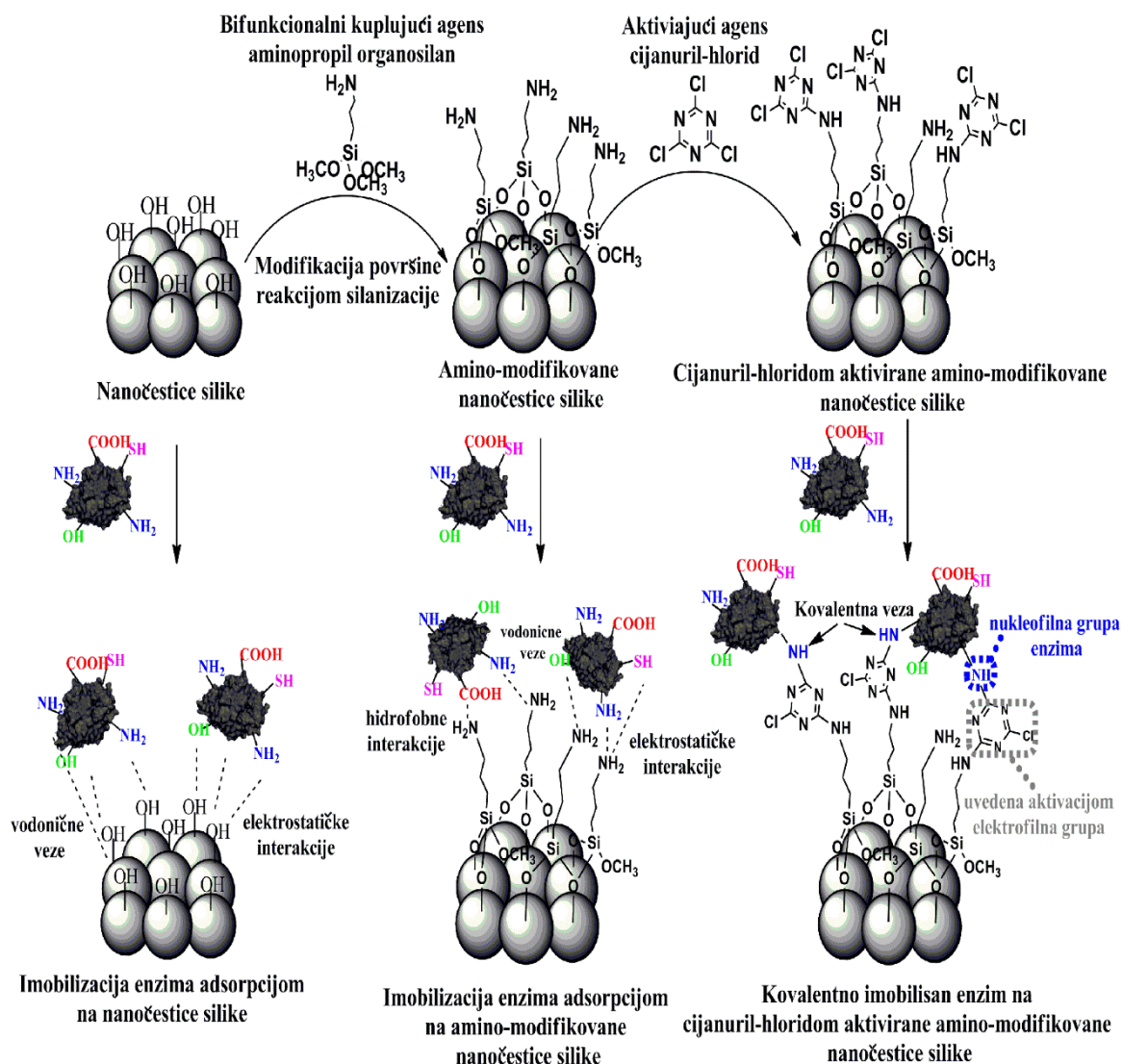
Povećanje aktivnosti imobilisanog enzima, u odnosu na slobodan enzim, može biti posledica povoljne promene konformacije enzima pri vezivanju, kao i činjenice da se imobilizacijom enzima smanjuje mogućnost grupisanja molekula enzima u reakcionoj smeši koje dovodi do nepotpunog iskorišćenja njihove katalitičke aktivnosti.¹⁵⁷

Cijanuril-hlorid ima tri slobodna atoma hlora koje se lako mogu supstituisati reagensima sa različitim nukleofilnim grupama, u prisustvu hidrohlorid akceptora (najčešće natrijum-karbonata, natrijum-bikarbonata, natrijum-hidroksida i amina), zbog čega su ovi reagensi veoma pogodni za dobijanje mono-, di-, i tri- supstituisanih 1,3,5-triazina (slika 2.33.).

Supstitucija atoma hlora može biti kontrolisana temperaturom kako bi se vršila postupna supstitucija. Na osnovu dosadašnjih saznanja supstitucija jednog atoma hlora se vrši na temperaturi od -5°C do 0°C (slika 2.33. (A)), dva na temperaturi od 30°C do 50°C (slika 2.33. (B)), a tri na temperaturi od 90° do 100°C slika 2.33. (C)).¹⁵⁸

Način na koji će se vršiti supstitucija takođe zavisi i od strukture nukleofila, sternih smetnji, supstituenata prisutnih u s-triazinskom prstenu, kao i od prirode rastvora u kome

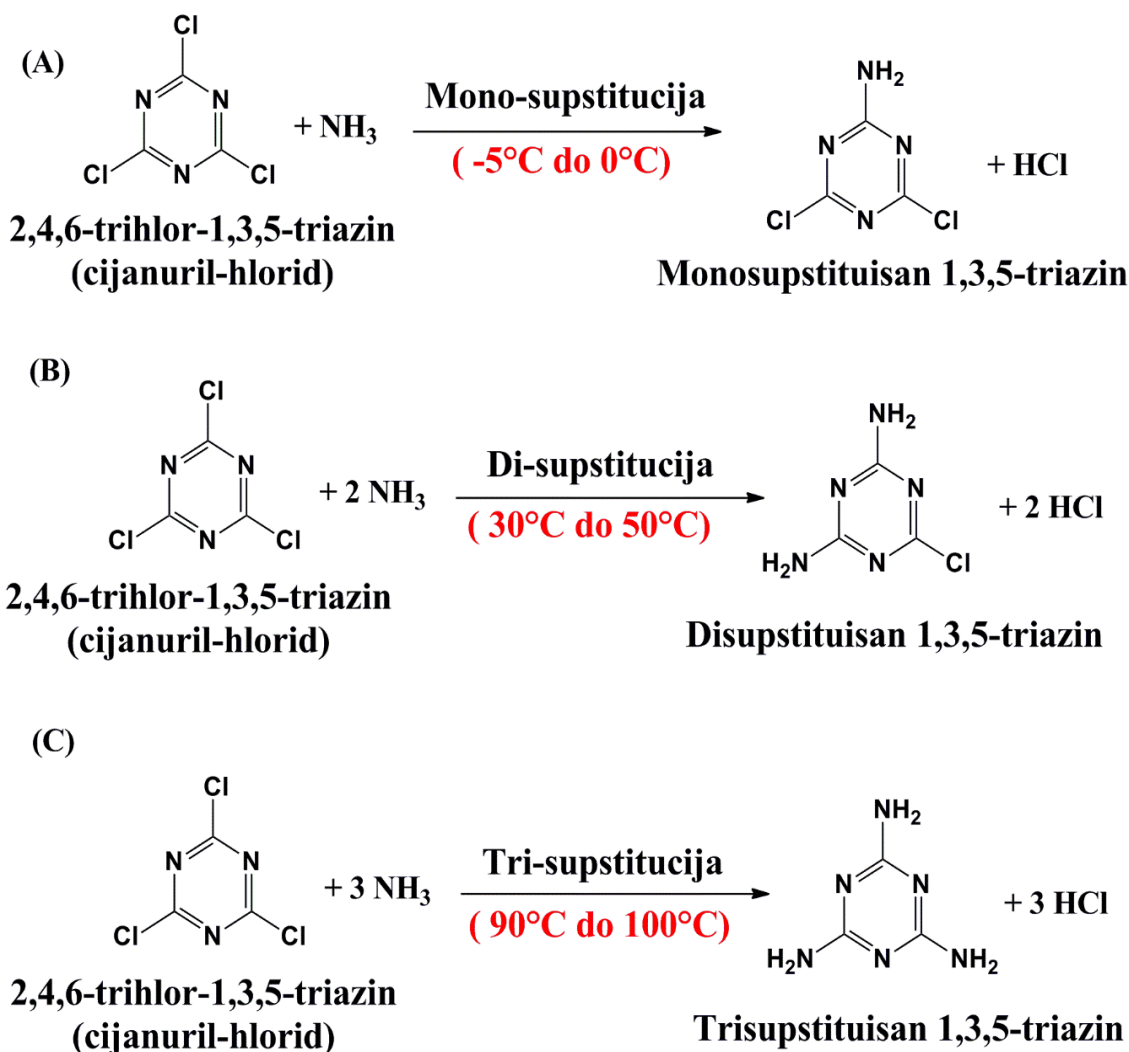
se vrši supstitucija. Kontrolom pre svega temperature, vremena, i uslova reakcije, supstitucija atoma hlora u cijanuril-hloridu različitim supstuentima može se postići odgovarajućim redom.



Slika 2.32. Šematski prikaz aktivacije cijanuril-hloridom amino-modifikovanih nanočestica silike. Poređenje načina imobilizacije enzima na siliku-, amino-modifikovane i cijanuril-hloridom aktivirane amino-modifikovane nanočestice silike.

Izborom temperature reakcije aktivacije amino-modifikovanih silika nanočestica od 0 °C omogućava se da nukleofilne amino grupe koje se nalaze na površini modifikovanih silika nanočestica u prisustvu cijanuril-hlorida reaguju sa atomima hlora ovog jedinjenja, i da pri tome nastanu odgovarajući monosupstituenti. Dobijeni nosač je pogodan za kovalentnu imobilizaciju enzima jer poseduje slobodne atome hlora *s*-triazinskog prstena

koji mogu da reaguju sa nukleofilnim grupama molekula enzima kao što je prikazano na slici 2.33. Odigravanje reakcije aktivacije na višim temperaturama nije pogodno jer bi nastali di- i trisupstituisani derivati koji imaju jedan odnosno nijedan atom hlora u svojoj strukturi koji bi bio u stanju da reaguje sa nukleofilnim grupama enzima i nagradi kovalentnu vezu čime bi bilo otežano kovalentno vezivanje enzima usled sternih smetnji u slučaju disupstituisanih derivata, a potpuno onemogućeno u slučaju tri supstituisanih derivata.¹⁵⁹

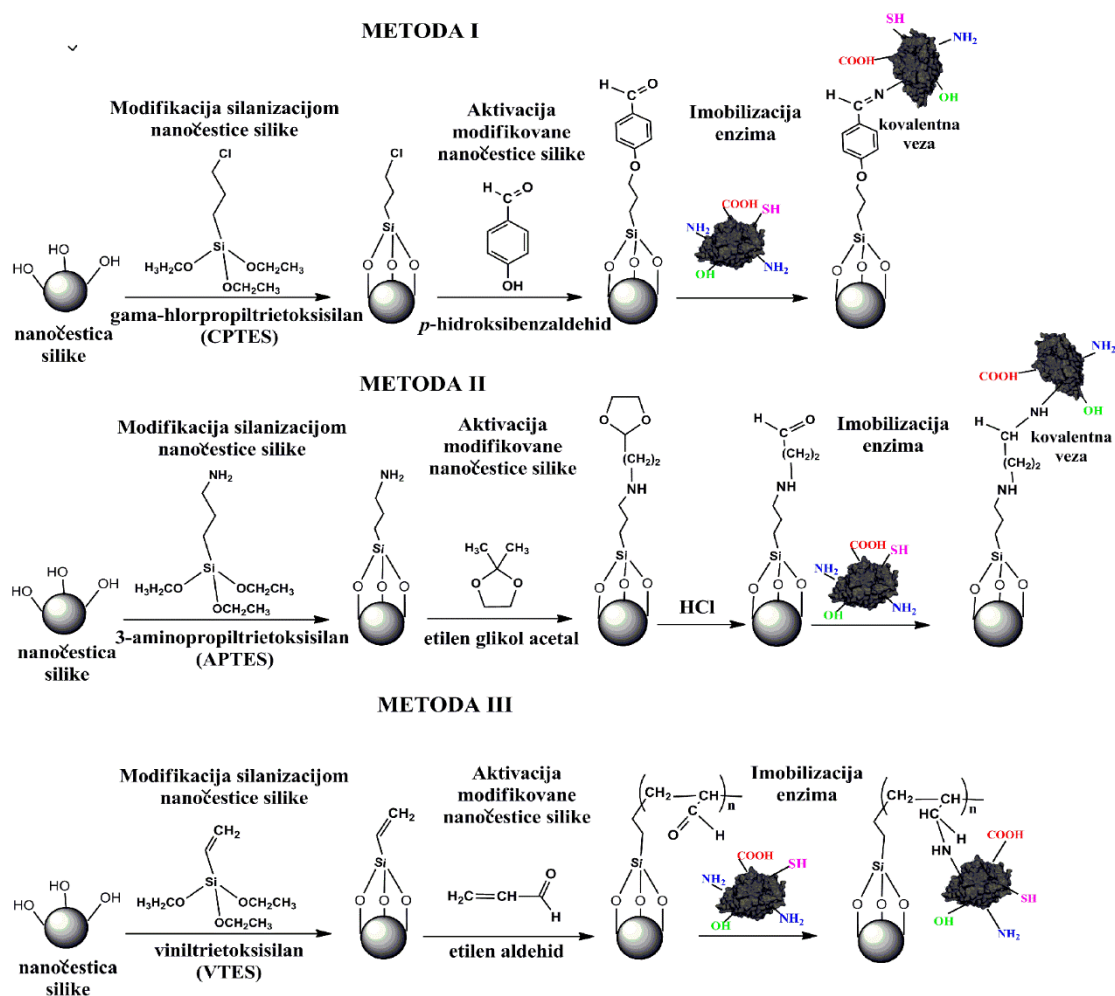


Slika 2.33. Mehanizam supstitucije cijanuril-hlorida.

2.6.2.1.2. Aktivacija amino modifikovanih nanočestica silike uvođenjem aldehidne grupe

Postoje tri načina funkcionalizacije površine nanočestica silike koje imaju za cilj uvođenje aldehidne grupe.¹⁶⁰ Na slici 2.34. su šematski prikazane sve tri metode koje se

sastoje iz dva stupnja. U prvom stupnju dolazi do reakcije silanizacije između nanočestica silike i organosilana (γ -lorpropiltrioksisilan (CPTES)-metoda I; 3-aminopropiltrioksisilan (APTES)-metoda II i viniltrioksisilan (VTES)-metoda III. Nakon prvog stupnja modificirane čestice bivaju aktivirane uvođenjem aldehidne grupe. Kao aktivirajući agensi se koriste *p*-hidroksibenzaldehid, etilenglikol acetal i etilen aldehid. Uvedene aldehidne grupe su veoma reaktivne prema amino grupama enzima čime se omogućava kovalentno vezivanje.



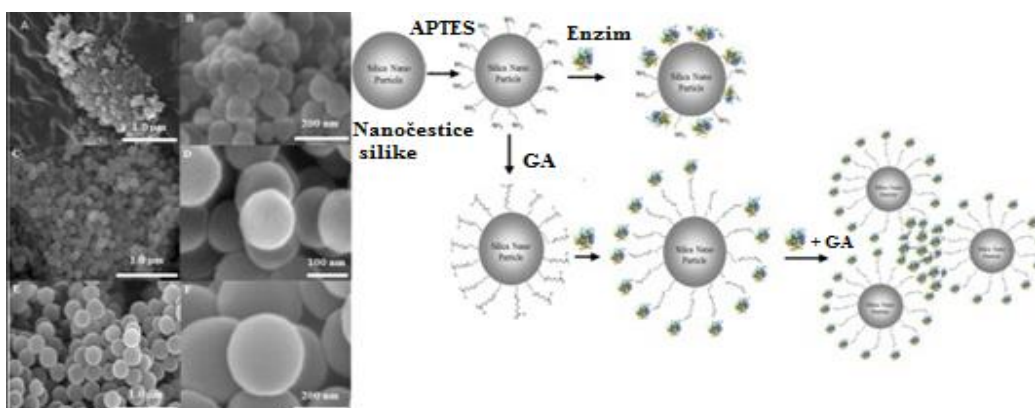
Slika 2.34. Šematski prikaz metoda aktivacije uvođenjem aldehidne grupe silanizacijom modificiranih nanočestica silike.

TEM mikroskopija je pokazala da postoji razlika u strukturi između nanočestica dobijenih na ova tri načina. Modificirane nanosilika čestice dobijene metodom I i II imaju sličnu strukturu, dok nanočestice dobijene metodom III imaju dužu „nožicu“ kojom je uvedena aldehidna grupa vezana za površinu čestice. Za kovalentnu imobilizaciju pogodnija je što duža „nožica“ zbog lakšeg prenosa supstrata i proizvoda. Uvođenjem aldehidnih grupa

metodom III stvara se pogodna mikrookolina za imobilizaciju enzima, a posebno za imobilizaciju pankreasne lipaze (PL).¹⁶⁰

Pankreasna lipaza koja je kovalentno imobilisana na ove nanočestice pokazuje visoku hidrolitičku aktivnost i termostabilnost. Smatra se da je to posledica činjenice da je velika količina ovog enzima vezana za nosač jer se na njegovoj površini nalazi velika količina reaktivnih aldehidnih grupa. Na površini čestica se formira monosloj lipaza koje su odvojene od same površine nosača dugačkom „nožicom“ čime je obezbeđen lakši prilaz supstrata aktivnom mestu pankreasne lipaze.¹⁶⁰

Amino-modifikovane nanočestice silike dobijene silanizacijom pomoću tetraetilortosilana (TEOS) i 3-aminopropiltrioksisilana (APTES) mogu biti tretirane sa glutaraldehydom (slika 2.35.).



Slika 2.35. SEM slika nanočestica silike 20 (A), 100(C) i 200 (E) nm. SEM slike modifikovanih nanočestica silike (B, D, F). Imobilizacija insulinaze adsorpcijom, kovalentnom imobilizacijom i „cross linking“ imobilizacijom (levo).¹⁴¹

Kao rezultat tretmana dobijene su nanosilika čestice sa slobodnim aldehidnim grupama jer su primarne amino grupe uvedene silanizacijom reagovala sa glutaraldehydom. Ovako sintetisan nosač je korišćen za kovalentnu imobilizaciju insulinaze. Insulinaza (EC 3.2.1.7) izolovana iz plesni *Aspergillus niger* pripada grupi glukozidnih hidrolaza, čija je uloga da razlaže insulin na fruktozu i glukozu. Industrijski je značajna jer se koristi za dobijanje visoko koncentrovanih fruktoznih sirupa.¹⁴¹

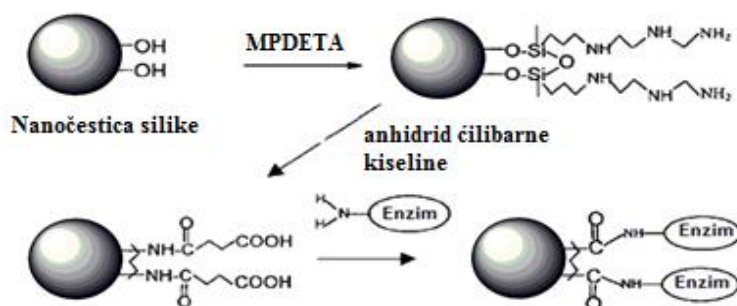
Ostaci lizina koji pripadaju nekatalitičkom domenu (N-domen) insulinaze su reagovali sa slobodnim aldehidnim grupama nosača što je dovelo do vezivanja enzima u aktivnom obliku. Dobijena imobilisana insulinaza je pokazala veću aktivnost i termostabilnost u

odnosu na slobodnu i nekovalentno vezanu insulinazu. Takođe, nema pada u aktivnosti njenim korišćenjem tokom sedam ciklusa.¹⁴¹

Giliker i sar.¹⁵¹ su nanočestice silike modifikovane amino-organosilanom da bi ih potom aktivirali glutaraldehidom i tako omogućili kovalentno vezivanje lakaze izolovane iz *Corioloopsis polyzona*. Ovako imobilisan enzim je pokazao izuzetnu selektivnost ka hidrolizi bisfenola A, fenolnog jedinjenja koje utiče na rad endokrinih žlezda, pa je njegova razgradnja jako značajna. Razvijena je i analitička metoda za detektovanje dobijenih jedinjenja hidrolizom bisfenola A.

2.6.2.1.3. Aktiviranje amino modifikovanih nanočestica silike uvođenjem karboksilne grupe

Nanočestice silike se modifikuju amino organosilanom (trimetoksisililpropildietilentriaminom, (MPDETA)) da bi površina nanosilike nakon završene silanizacije bila bogata slobodnim primarnim alifatičnim amino grupama. Dobijene amino-modifikovane nanočestice silike se potom tretiraju anhidridom ćilibarne kiseline i dobijaju se nanočestice sa slobodnim karboksilnim grupama. Karboksilovane nanočestice su korišćene za kovalentnu imobilizaciju glutamat-dehidrogenaze (GDH) i laktat-dehidrogenaze (LDH) (slika 2.36.).



Slika 2.36. Šematski prikaz imobilizacije enzima na amino-modifikovane nanočestice silike aktivirane anhidridom ćilibarne kiseline.

Oba enzima¹³⁸ katalizuju oksidoredukcione reakcije, pri čemu GDH koristi glutamat kao supstrat, a LDH koristi laktat. GDH i LDH imobilisane na amino-modifikovane nanočestice silike koje su aktivirane ćilibarnom kiselinom mogu se koristiti kao biosenzori. Kako bi proverili stabilnost potencijalnog biosenzora one su ostavljene u PBS puferu pH=6,8 tokom dve nedelje. Oba imobilizata su zadržala 93% svoje početne aktivnosti nakon dve nedelje, posle čega je došlo do njihove denaturacije.

2.6.3. Kovalentna imobilizacija enzima na nanočestice silike modifikovane „in situ“ polimerizacijom

Površina nanočestica silike može biti modifikovana i hemijskom polimerizacijom korišćenjem glicidil metakrilata u prisustvu azo-inicijatora. Kao rezultat ove modifikacije dobijaju se nanočestice silike sa epoksidnim grupama na površini. Kim i sar.¹⁴² su lipazu izolovanu iz *Mucor javanicus* imobilisali na ovako modifikovane nanočestice silike i dobili da se za 20 h na površinu čestica može vezati 18,9 mg/g lipaze. Epoksidne grupe uvedene na površinu silika nanočestica mogu reagovati sa amino, tiolnim i fenolnim grupama molekula lipaze.

Lipaza imobilisana kovalentnim vezama preko epoksidnih grupa je pokazala za 21 % veću aktivnost u odnosu na lipazu koja je vezana adsorpcijom na nanočestice silike. Izučavan je i efekat promene pH na aktivnost imobilisane lipaze na epoksi-modifikovane nanočestice silike. Imobilisana lipaza iz *M. javanicus* je pokazala veću aktivnost i stabilnost u širem pH opsegu u odnosu na slobodan enzim i enzim imobilisan adsorpcijom. Ovo su objasnili pretpostavkom da je kovalentna imobilizacija preko epoksidnih grupa stabilisala vezane molekule enzima i time onemogućila njihovu denaturaciju usled promene pH.

2.6.4. Kovalentna imobilizacija enzima na nanočestice silike tretirane modifikujućim reagensima

Cijanogen- i cijanuril-halidi se veoma često koriste za modifikaciju nanočestica silike zbog njihove sposobnosti da reaguju sa silanol grupama prisutnim na površini silika nanočestica pri čemu dolazi do građenja Si-O-C mosta ili veze između ovih reagenasa i površine nanočestica. Od cijanogen halida najčešće se koristi cijanogen-bromid jer je ovo jedinjenje od svih cijanogen-halida najmanje toksično i eksplozivno.

Modifikacija nanočestica silike cijanogen-halidima se vrši u veoma baznoj sredini (pH 10-11) na temperaturi od 4 °C.⁴⁶

Dobijene modifikovane čestice imaju kratku „nožicu“ što može stvarati problem prilikom korišćenja ovih čestica kao nosača za imobilizaciju enzima.

Uvedene C=N grupe mogu graditi kovalentnu vezu sa amino grupama enzima pri čemu se stvara se stvara imido-karbonatna kovalentna veza usled izrazite elektrofilnosti ugljenikovog atom C=N grupe.

I imidokarbonat može reagovati sa amino-grupama enzima. Ovakav način imobilizacije enzima veoma često podleže hidrolizi jer je stvorena Si-O-C veza veoma nestabilna.⁴⁷ Stabilni imobilisani enzim se dobijaju isključivo ako se ostvari višetačkasta kovalentna imobilizacija.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

U ovoj doktorskoj disertaciji tokom eksperimentalnog rada korišćeni su:

✚ Biokatalizatori:

- **Lipaza** iz kvasaca *Candida rugosa* i *Candida antarctica* proizvodi kompanije Sigma Aldrich, St. Louis, SAD.
- **β -galaktozidaza** iz plesni *Aspergillus oryzae* proizvod kompanije Sigma Aldrich, St. Louis, SAD.
- **Proteaza** iz *Bacillus licheniformis* i plesni *Aspergillus oryzae* proizviđača Novozymes, Bagsvard, Danska.

✚ Komercijalni nosač nano-dimenzija za imobilizaciju enzima:

- Pirogena silika Aerosil 380 (Evonik Industries, Essen, Nemačka).

✚ Bifunkcionalni kuplujući agensi za modifikaciju pirogene silike:

- (3-glicidiloksipropil)trimetoksisilan (GOPTMS) proizvođača Fluka Analytical, SAD.
- 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMS) proizvođača Fluka Analytical, SAD.
- trimetoksi(2-fenilpropil)silana) (PAPMS) proizvođača Fluka Analytical, SAD.

✚ Aktivirajući agens za aktiviranje amino-modifikovanih nanočestica silike:

- hlortriazin (cijanuril-hlorid) proizvođača Fluka Analytical, SAD.

✚ Pufferi:

- Za pripremu rastvora lipaze korišćen je natrijum-fosfatni puffer pH 7, 0,1 i 1 M. Puffer je pripremljen mešanjem rastvora soli $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ i $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u odgovarajućoj razmeri. Soli $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ i $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ proizvodi su kompanije Centrohem (Stara Pazova, Srbija).
- Za pripremu rastvora β -galaktozidaze korišćen je 0,1 M acetatni puffer pH 4,5 koji je pripremljen mešanjem sirćetne kiseline i soli Na-acetata u odgovarajućoj razmeri. Na-acetat je proizvod kompanije Sigma, St. Luis

SAD, dok je sirćetna kiselina proizvod kompanije Zorkafarm, Šabac, Srbija.

- Za pripremu rastvora proteaza korišćen je pufer pH 7,5 koji je pripremljen mešanjem 10 mM Na-acetata i 5 mM Ca-acetata u odgovarajućoj razmeri. Obe soli su proizvodi kompanije Sigma, St. Luis SAD.

✚ Ostale hemikalije i uređaji koji su korišćeni tokom eksperimentalnog rada:

- Na₂CO₃ (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- Kalijum, natrijum-tartarat (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- CuSO₄·5H₂O (Zorka Pharma, Šabac, Srbija),
- Folinov reagens (ABCR GmbH & Co, Karlsruhe, Nemačka),
- Coomassie briljantno plavo G-250 (Fluka analytical, SAD),
- H₃PO₄ i etanol (Zorka Pharma, Šabac, Srbija),
- *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- Natrijum-dodecil sulfat (SDS) (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (TRIS) (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- *o*-nitrofenil-β-galaktozid (*o*-NPG) (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- Azokazein (Fluka analytical, SAD),
- Trihlorsirćetna kiselina (TCA) (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- Albumin iz goveđeg seruma (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- Epihlorhidrin (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- HBr (Zorka Pharma, Šabac, Srbija),
- L-leucin-*p*-nitoanilid (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- Ninhidrin (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- Dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
- Analitička vaga, Mettler AJ100, (Mettler Toledo, Švajcarska),
- Centrifuga, MiniSpin eppendorf, (Eppendorf, SAD),
- Magnetna mešalica (IKA, SAD),
- Roler mikser (Stuart, Pariz, Francuska),

- UV-spektrofotometar, Ultrospec™ 3300 pro, (Biochrom Ltd, Frajburg, Nemačka),
- Vakuum sušnica (Binder Inc., Njujork, SAD),
- Peristaltička pumpa, PLP 33, (behr Labor-Technik GmbH, Dizeldorf, Nemačka),
- Termostat sa orbitalnim mešanjem, IKA KS 4000i (Control, Štaufen, Nemačka).

3.2. Metode

3.2.1. Modifikacija nanočestica silike

Modifikacija pirogenih neporoznih nanočestica silike rađena je sa tri različita silana, 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMS), trimetoksi(2-fenilpropil)silan) (PAPMS) i (3-glicidiloksipropil)trimetoksisilan (GOPTMS).

3.2.1.1. Modifikacija nanočestica silike APTMS-om

U cilju određivanja odgovarajuće količine organosilana potrebnog za modifikaciju nanočestica silike varirani su različiti maseni odnosi nanočestica silike i APTMS-a i to 1:0,25; 1:0,5; 1:0,75; 1:1 i 1:5.

Za sve masene odnose primenjena je ista procedura modifikacije:

U balon od 50 ml odmereno je na analitičkoj vagi 300 mg silika nanočestica i potom dodata preračunata zapremina APTMS-a (za maseni odnos 1:0,25 dodato je 0,295 ml APTMS-a; za 1:0,5 0,590 ml APTMS-a; za 1:0,75 0,885 ml APTMS-a; za 1:1 1,18 ml APTMS-a i za 1:5 5,9 ml APTMS-a). Potom je u balon dodato 36 ml toluena, 50 μ l trietilamina i dovođen je azot. Reakcija modifikacije je izvođena na sobnoj temperaturi u trajanju od 48 h i uz mešanje na magnetnoj mešalici pri brzini od 600 o/min. Nakon završene modifikacije, amino-modifikovana silika je filtrirana, ispirana sa 3 puta po 5 ml toluena i podvrgnuta ultrazvuku u trajanju od 5 min kako bi se uklonio neproreagovali organosilan. Prečišćena amino-modifikovana silika je potom sušena 24 h u vakuum sušnici na 40 °C. Dobijene APTMS-om modifikovane nanočestice silike su čuvane u eksikatoru do upotrebe.

3.2.1.1.1. Određivanje koncentracije amino grupa na površini modifikovanih nanočestica silike

Koncentracija amino grupa na površini APTMS-om modifikovanih nanočestica silike je određivana titracijom.

Primenjena je sledeća procedura: 10 mg modifikovanih nanočestica je rastvoreno u 10 mM rastvoru HCl uz mešanje u trajanju od 30 minuta. Nakon toga, nanočestice su odvojene centrifugiranjem na 6000 obrtaja/10 minuta i prikupljeno je 10 ml supernatanta. Supernatant je potom titrisan standardizovanim 10 mM rastvorom NaOH u prisustvu fenoftaleina kao indikatora.

Na osnovu utrošene zapremine rastvora NaOH prilikom titracije APTMS-om modifikovanih nanočestica silike računa se molarna koncentracija amino grupa na njihovoj površini. Dobijena vrednost predstavlja broj amino grupa u jedinicama površine (nm^2) na površini nanočestice izračunate na osnovu gustine silike (2.2 g/ml) i površine nanočestice (100 nm^2).

3.2.1.2. Aktivacija cijanuril-hloridom amino-modifikovanih nanočestica silike

Modifikovane nanočestice silike APTMS-om pri masenom odnosu nanočestica i APTMS-a 1:1 aktivirane su cijanuril-hloridom. Amino grupe koje se nalaze na površini ovih čestica reagovaće sa atomima hlora *s*-triazin prstena cijanuril-hlorida, pri čemu dolazi do reakcije supstitucije. Pri ovoj reakciji mora se voditi računa da nastanu mono-supstituenti, jer je kod di-supstituenata otežan prilaz enzima preostalom atomu hlora i time je onemogućeno njihovo vezivanje za nosač. Radi optimizacije uslova ove reakcije varirani su različiti maseni odnosi modifikovanih nanočestica APTMS-om i cijanuril-hlorida i to 1:0.5; 1:1 i 1:5, reakcija je takođe za sve masene odnose izvođena na dve temperature, 0 °C i 25 °C.

Za sve masene odnose i obe temperature primenjena je sledeća procedura: U balon od 50 ml stavljeno je 200 mg APTMS-om modifikovanih silika nanočestica, odgovarajuća masa cijanurilhlorida (0,1 g za maseni odnos modifikovanih nanočestica i cijanuril-hlorida 1:0,5; 0,25 g za maseni odnos 1:0,5; i 1 g za maseni odnos 1:1), odgovarajuća količina acetona (7 ml, 14 ml i 70 ml, redom) i 50 μl trietamina. Za svaki maseni odnos modifikovanih nanočestica i cijanuril-hlorida pripremljene su reakcione smeše u duplikatu pri čemu je jedna stavljena na 0 °C, a druga na 25 °C tokom 2 h na pri brzini obrtaja mešalice od 400 o/min. Nakon završetka reakcije aktivacije, aktivirani amino-modifikovani nosači su izdvojeni na vakuum filtru i isprani tri puta sa po 5 ml acetona potom sušeni u vakuum sušnici na 40 °C tokom 24 h. Dobijene cijanuril-hloridom APTMS-om modifikovane nanočestice silike su čuvane u eksikatoru do upotrebe.

3.2.1.3. Modifikacija nanočestica silike PAPMS-om

U balon od 50 ml odmereno je na analitičkoj vagi 300 mg silika nanočestica i potom dodata preračunata zapremina PAPMS-a tako da maseni odnos FNS:PAPMS bude 1:1. Zatim je u balon sipano 36 ml toluena, 50 μ l trietilamina i dovođen je azot. Reakcija modifikacije je izvođena na sobnoj temperaturi u trajanju od 48 h i uz mešanje na magnetnoj mešalici pri brzini od 600 o/min. Nakon završene modifikacije, modifikovana silika je filtrirana, ispirana sa 3 puta po 5 ml toluena i podvrgnuta ultrazvuku u trajanju od 5 min kako bi se uklonio neproreagovali organosilan. Prečišćena modifikovana silika je potom sušena 24 h u vakuum sušnici na 40 °C. Dobijene PAPMS-om modifikovane nanočestice silike su čuvane u eksikatoru do upotrebe.

3.2.1.4. Modifikacija nanočestica silike GOPTMS-om

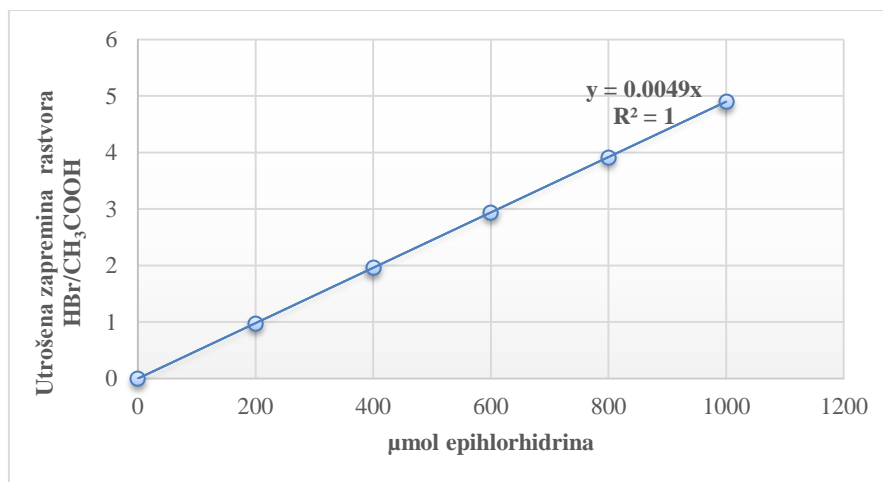
Radi optimizacije količine potrepnog organosilana za modifikaciju silika nanočestica variran je maseni odnos između nanočestica silike i GOPTMS-a (1:1, 1:2, 1:4 i 1:20), kao i dužina trajanja reakcije modifikacije (1-24 h). Za svaki maseni odnos primenjena je sledeća procedura:

U balon od 50 ml je stavljeno po 300 mg silika nanočestica i preračunata količina silana (od 0,250 do 1,9 mL). Potom je dodato 36 ml toluena, 50 μ l trietilamina i dovođen je azot. Reakcija modifikacije je izvođena na sobnoj temperaturi uz mešanje na magnetnoj mešalici pri brzini 600 o/min u trajanju od 1-24 h. Nakon završenih reakcija modifikacija, dobijene GOPTMS-om modifikovane nanočestice silike su filtrirane, ispirane sa 3 puta po 5 ml toluena i podvrgnute ultrazvuku u trajanju od 5 min kako bi se uklonio neproreagovali organosilan. Prečišćene GOPTMS-om modifikovane nanočestice silike su dispergovane u etanolu i potom sušene u vakuum sušnici na 40 °C tokom 24 h. Dobijene GOPTMS-om modifikovane nanočestice silike su potom čuvane u eksikatoru do upotrebe.

3.2.1.4.1. Određivanje koncentracije epoksi grupa na površini modifikovanih nanočestica silike

Koncentracija epoksi grupa na površini GOPTMS-om modifikovanih nanočestica silike je određivana titracijom sa HBr/CH₃COOH rastvorom (6 ml 45% HBr u 250 ml of CH₃COOH). Prvo je napravljena standardna kriva tako što je u 6 erlenmajera stavljeno 20 ml benzena i 10 ml glacijalne sirćetne kiseline, i potom je dodato nekiliko kapi 1 % kristalviolet boje. U erlenmajere je odmereno redom po 200, 400, 600, 800 i 1000 μ mol

99,9 % epihlorhidrina. Šesti erlenmajer je korišćen kao blank uzorak. Svih 6 rastvora je titrisano sa HBr/CH₃COOH rastvorom pomoću mikrobirete dok se boja ne promeni iz bledo roze u bledo zelenu. Zapremina rastvora HBr potrošena za titraciju ovih uzoraka je korišćena za pravljenje standardne krive (slika 3.1).



Slika 3.1. Standardna kriva za određivanje koncentracije uvedenih epoksi grupa na površinu nanočestica silike.

Za određivanje uvedenih epoksi grupa na nanočestice korišćena je ista procedura samo je u erlenmajere stavljan po 100 mg GOPTMS-om modifikovanih nanočestica. Na osnovu nagiba standardne krive i zapremine utrošenog rastvora prilikom titracije GOPTMS-om modifikovanih nanočestica određena je količina epoksi grupa prisutnih na površini modifikovanih čestica. Dobijena vrednost predstavlja broj epoksi grupa po g nanočestica (μmol/g).

3.2.2. Karakterizacija modifikovanih nanočestica silike

3.2.2.1. FTIR analiza

Modifikovane nanočestice kao i ne modifikovane nanočestice silike su analizirane FTIR spektroskopijom. FTIR spektari su dobijeni pomoću BOMEM (Hartmann & Braun) spektrofotometra na sobnoj temperaturi. U avanu je usitnjen i pomešan KBr sa 1 maseni % svakog uzorka, dobijeni prah je potom stavljen u kalup i presovan pomoću hidraulične prese. Kao rezultat presovanja dobijena je transparentna tableta koja je potom analizirana. FTIR spektar je sniman između 400 and 4000 cm⁻¹ pri rezoluciji od 4 cm⁻¹.

3.2.2.2. TGA analiza

Termogravimetrijska analiza (TGA) je rađena pomoću SDT Q-600 simultanog DSC-TGA uređaja. TGA spektri su dobijeni zagrevanjem uzoraka od 25 °C do 600 °C pri brzini zagrevanja od 10 °C / min. Zagevanje uzoraka se odigrava u inertnoj atmosferi pri brzini protoka azota od 0,1 dm³/min.

3.2.3. Imobilizacija enzima

3.2.3.1. Imobilizacija lipaza na nanočestice silike

Imobilizacija lipaze na nemodifikovane (FNS), amino-modifikovane (AFNS) i cijanurilhloridom aktivirane amino-modifikovane nanočestice silike (CCAFNS) izvođena pod istim uslovima nezavisno od toga koja nanočestica je korišćena. Pripremljen je početni rastvor lipaze u odgovarajućem fosfatnom puferu (0,1 ili 1 M, pH 7) koncentracije 3 mg/ml. Suspenzija nanočestica silike i rastvor lipaze pomešani su u ependorficama tako da se dobije unapred definisana inicijalna koncentracija proteina po gramu čestica. Ispitana je imobilizacija pri ponuđenim koncentracijama proteina 5,7; 57, 228, 570 i 1140 mg/g nosača. Pripremljeni su uzorci za tačke na 0,25; 0,5; 1, 2, 3, 4 i 5 h za svaku količinu ponuđenih proteina. Svi uzorci su inkubirani na 25 °C i sa mešanjem (13 000 o/min). Nakon isteka predviđenog vremena, uzorci su centrifugirani i uziman je uzorak supernatanta za određivanje zaostale aktivnosti lipaze. Dobijene vrednosti poređene su sa početnom aktivnošću lipaze (aktivnost početnog rastvora lipaze (IU/ml)) i na taj način je dobijena kriva pada aktivnosti lipaze u supernatantu. Izdvojeni imobilizat je ispran sa 3 puta po 1 ml pufera koji je korišćen za imobilizaciju, zatim osušen u vakuum sušnici na 40 °C tokom 2 h i korišćen za ispitivanje aktivnosti suvog imobilizata.

Imobilizacija lipaza na epoksi-modifikovane nanočestice silike (GFNS) je rađena po upravo opisanoj proceduri za FNS, AFNS i CCAFNS. S tim da je pravljena suspenzija nanočestica i rastvora lipaze tako da ponuđeni proteini po gramu nanočestica budu 600 mg/g. I ova imobilizacija je rađena i u 0,1 i 1 M fosfatnom puferu pH 7.

3.2.3.2. Imobilizacija β -galaktozidaza na nanočestice silike

Imobilizacija β -galaktozidaze na nemodifikovane (FNS), amino-modifikovane (AFNS) i cijanurilhloridom aktivirane amino-modifikovane (CCAFNS) nanočestice silike je izvedena tako što je prvo pripremljen rastvor ovog enzima u acetatnom puferu (0,1 M i pH 4,5) koncentracije 5 mg/ml. Suspenzija nanočestica i rastvor β -galaktozidaze pomešani su u ependorficama tako da se dobije unapred definisana inicijalna

koncentracija proteina po gramu čestica. Ispitana je imobilizacija pri ponuđenoj koncentraciji proteina: 83, 113, 230 i 435 mg/g. Pripremljeni su uzorci za tačke na 1, 3 i 5 h. Svi uzorci su inkubirani na 25°C uz mešanje (13 000 o/min). Nakon predviđenog vremena, uzorci iz ependorfa su centrifugirani radi odvajanja čestica nosača sa imobilisanim enzimom od supernatanta. Potom je izdvojeni imobilizat ispran sa 3 puta po 1 ml pufera koji je korišćen za određivanje aktivnosti imobilisanog enzima. Aktivnost β -galaktozidaze je određivana i u odvojenim supernatantima i poređena sa aktivnošću početnog rastvora β -galaktozidaze kako bi se dobila kriva pada aktivnosti u supernatantu.

3.2.3.3. Imobilizacija proteaza na nanočestice silike

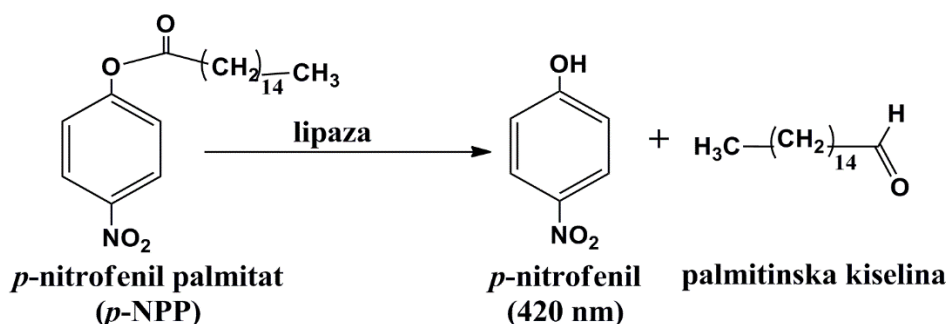
Imobilizacija komercijalne proteaze iz *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme) i proteaze iz *Bacillus licheniformis* (Alcalase) izvođene su na: nemođifikovane (FNS), amino-modifikovane (AFNS) i cijanurilhloridom aktivirane amino-modifikovane nanosilika čestice (CCAFNS) pod istim uslovima nezavisno od toga koja nanočestica je korišćena. U ependorfe je odmereno po 2 mg nanočestica i dodato je po 1 ml razblaženog rastvora proteaze (Flavourzyme ili Alcalase) koncentracije 0,05 mg/ml koji je napravljen u 10 mM natrijum-acetatnom puferu i 5mM kalcijum-acetatu (pH 7,5). Pripremljeni su uzorci za tačke na 1, 3 i 5 h. Svi uzorci su inkubirani na 25 °C i sa mešanjem (400 o/min). Nakon isteka predviđenog vremena, uzorci su centrifugirani i uziman je uzorak supernatanta za određivanje aktivnosti proteaze. Dobijene vrednosti poređene su sa početnom aktivnošću proteaza (aktivnost početnog rastvora proteaza) i na taj način je dobijena kriva pada aktivnosti proteaza u supernatantu. Izdvojeni imobilizat centrifugiranjem je ispran sa 3 puta po 1 ml pufera koji je korišćen za imobilizaciju (10 mM natrijum-acetatni pufer i 5 mM kalcijum-acetat (pH 7,5)) i potom je korišćen za ispitivanje aktivnosti imobilizata. Imobilizacija proteaza na epoksi-modifikovane nanočestice silike (GFNS) je rađena po upravo opisanoj proceduri za FNS, AFNS i CCAFNS. S tim da je ova imobilizacija je rađena i u 0,01 i 1 M Na-acetatnom puferu pH 7,5.

3.2.4. Određivanje aktivnosti enzima

3.2.4.1. Određivanje aktivnosti lipaze u hidrolizi *p*-nitrofenil palmitata

Hidrolitička aktivnost lipaze, kako slobodne (u supernatantu) tako i imobilisane, ispitivana je u reakciji hidrolize *p*-nitrofenil palmitata (*p*-NPP). Određivanje aktivnosti lipaze zasniva se na hidrolizi *p*-nitrofenil palmitata do *p*-nitrofenola i palmitinske kiseline (slika 3.2.). *p*-Nitrofenol je jedinjenje sa apsorpcionim maksimumom na 410 nm, a

promena apsorbance (time i koncentracije ovog jedinjenja) koristi se za određivanje aktivnosti enzima.



Slika 3.2. Hidroliza *p*-nitrofenil palmitata katalizovana lipazom.

Rastvor supstrata je pripreman tako što je 0,0378 g *p*-NPP, 0,017 g natrijum-dodecil sulfata (SDS) i 1,0 g Tritona X-100, rastvoreno u normalnom sudu od 100 ml. Ova smeša je zagrevana 15 minuta na 65 °C u vazдушnom termostatu, dobro je izmešana i ohlađena na sobnu temperaturu. Do upotrebe je čuvana na 4°C. Pre same upotrebe pripremljen je supstrat tako što je napravljen rastvor supstrata posmešan sa TRIS-HCl puferom koncentracije 0,1 mol/l (pH 8,2) u odnosu 1:1.

Prilikom ispitivanja aktivnosti slobodne lipaze, aktivnosti supernatanta u plastičnu kivetu za spektrofotometar odmereno je 50 µl uzorka i dopunjeno supstratom do ukupno 1 ml. Kiveta je potom postavljena u spektrofotometar i merena je apsorbance na 410 nm na svakih trideset sekundi, tokom 2 minuta. Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbance određena je vrednost $\Delta A/\Delta t$ iz koje je kasnije preračunata hidrolitička aktivnost slobodnog enzima i enzima u supernatantu odvojenom nakon završene imobilizacije po formuli:

$$A_s = R \times \frac{dA}{dt} \times \frac{V_u}{V_e} \times \frac{100000}{\epsilon \times 1000}$$

gde je A_s -hidrolitička aktivnost enzima (slobodnog ili u supernatantu) (IU/ml), R -razblaženje, V_u -ukupna zapremina (ml), V_e -zapremina uzorka (ml), $\epsilon=1500$ l/mol, dA/dt -promena apsorbance.

Da bi se ispitala koncentracija imobilisane aktivnosti, u plastičnu kivetu je odmereno 1 mg suvog imobilizata i dodato je 2 ml supstrata, zatim je ubačeno magnetno zrno. Kiveta je stavljena na magnetnu mešalicu (1000 o/min). Kiveta je potom prenošena u spektrofotometar na svakih 30 s i merena je apsorbance na 410 nm tokom 2 minuta. Iz

izmerenih vrednosti apsorbance određena je vrednost $\Delta A/\Delta t$ iz koje je kasnije preračunata koncentracija imobilisane aktivnosti enzima na imobilizatu po formuli:

$$A_i = R \times \frac{dA}{dt} \times \frac{V_u}{m_e} \times \frac{1000000}{\varepsilon \times 1000}$$

gde je A_i -koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g), R -razblaženje, V_u -ukupna zapremina (ml), m_e -masa suvog imobilizata (g), $\varepsilon=1500$ l/mol, dA/dt - promena apsorbance.

Prinos imobilizacije aktivnosti je računat po formuli:

Prinos imobilizacije aktivnosti (%)

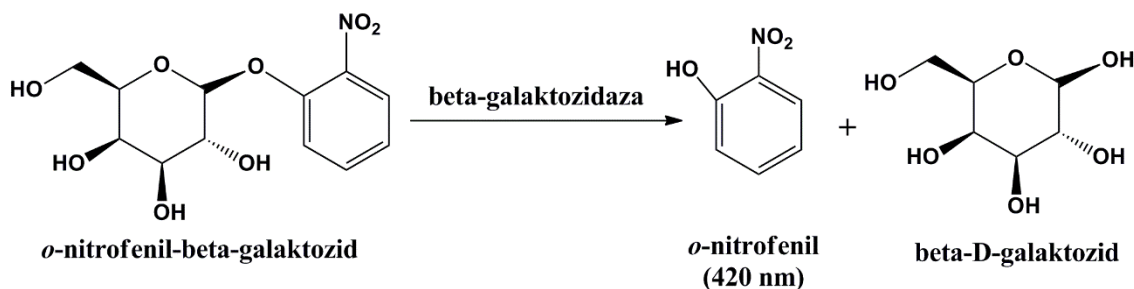
$$= \frac{(\text{aktivnost slobodnog enzima} - \text{aktivnost u supernatantu nakon imobilizacije})}{\text{aktivnost imobilisanog enzima}}$$

$\times 100$

(3.1)

3.2.4.2. Određivanje hidrolitičke aktivnosti β -galaktozidaze u hidrolizi *o*-nitrofenil- β -galaktozida

Hidrolitička aktivnost β -galaktozidaze, kako slobodne (u supernatantu) tako i imobilisane, ispitivana je u reakciji hidrolize *o*-nitrofenil- β -galaktozida (*o*-NPG). Određivanje aktivnosti β -galaktozidaze zasniva se na hidrolizi *o*-nitrofenil- β -galaktozida do *o*-nitrofenola i β -galaktozida (slika 3.3.). *o*-nitrofenol je jedinjenje sa apsorpcionim maksimumom na 410 nm, a promena apsorbance (time i koncentracije ovog jedinjenja) koristi se za određivanje aktivnosti enzima.



Slika 3.3. Hidroliza *o*-nitrofenil- β -galaktozida katalizovana β -galaktozidazom.

Rastvor supstrata je pripreman tako što je 0,015 g ONPG-a rastvoreno u 5 ml acetatnog pufera (0,1 M i pH 4,5).

Prilikom ispitivanja aktivnosti slobodne β -galaktozidaze i aktivnosti ovog enzima u supernatantima odvojenim nakon završene imobilizacije u plastičnu kivetu za spektrofotometar odmereno je 50 μ l supernatanta ili početnog rastvora enzima i

dopunjeno supstratom do ukupno 1 ml. Kiveta je potom postavljena u spektrofotometar i merena je apsorbance na 410 nm na svakih trideset sekundi, tokom 2 minuta. Iz dobijenih vrednosti određena je vrednost $\Delta A/\Delta t$ iz koje je kasnije preračunata hidrolitička aktivnost slobodnog enzima i enzima u supernatantu po formuli:

$$A_s = R \times \frac{dA}{dt} \times \frac{V_u}{V_e} \times \frac{1000000}{\epsilon \times 1000}$$

gde je A_s -aktivnost enzima (slobodnog ili u supernatantu) (IU/ml), R -razblaženje, V_u -ukupna zapremina (ml), V_e -zapremina uzorka (ml), $\epsilon=1357$ l/mol, dA/dt - promena apsorbance.

Da bi se odredila koncentracija imobilisane aktivnosti β -galaktozidaze, u plastičnu kivetu je odmereno 1 mg imobilizata i 2 ml supstrata, zatim je ubačeno magnetno zrno. Kiveta je stavljena na magnetnu mešalicu (1000 o/min). Kiveta je potom prenošena u spektrofotometar na svakih 30 s i merena je apsorbance na 410 nm. Na osnovu izmerenih apsorbanci koncentracija imobilisane aktivnosti je računata po formuli:

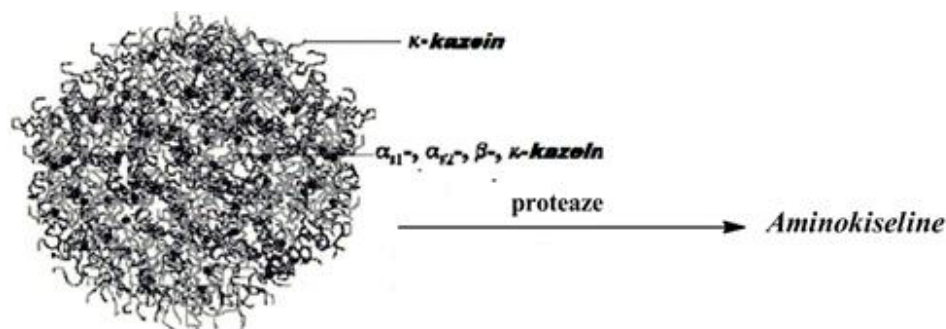
$$A_i = R \times \frac{dA}{dt} \times \frac{V_u}{m_e} \times \frac{1000000}{\epsilon \times 1000}$$

gde je A_i -koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g), R -razblaženje, V_u -ukupna zapremina (ml), m_e -masa suvog imobilizata (g), $\epsilon=1357$ l/mol, dA/dt - promena apsorbance. Prinos imobilisane aktivnosti je računat po formuli 3.1.

3.2.4.3. Određivanje hidrolitičke aktivnosti proteaza u reakciji hidrolize azokazeina

Za određivanje hidrolitičke aktivnosti komercijalnih preparata proteaza (Flavourzyme i Alcalase) korišćena je metoda po kojoj se kao supstrat koristi azokazein. Kazein je fosfopolipeptidni lanac koji se dobija iz mleka dobija taloženjem kiselinama, isoljavanjem ili ultracentrifugiranjem. Azokazein je kazein hemijski modifikovan sulfanilnom kiselinom. Hidrolizom ovakvog kazeina, dolazi do otpuštanja azo boje u reakcionu smešu što se detektuje praćenjem apsorbance na 440 nm u alkalnoj sredini (slika 3.4.).

Reakcija se izvodi tako što se 150 μ l uzorka (početnog rastvora enzima ili supernatanta) ili 2 mg nanočestica pomeša sa 300 μ l 2% (w/v) rastvora azokazeina u 50mM Tris-HCl puferu pH 9 u ependorfici. Reakciona smeša se inkubira na 30 °C u trajanju od 30 minuta. Nakon toga, reakcija se zaustavlja dodatkom 1200 μ l 10% (w/v) rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA).



Slika 3.4. Hidroliza azo-kazeina katalizovana proteazama.

Ovako pripremljene ependorfice sa reakcionim smešama se ohlade u ledenom kupatilu 10 minuta kako bi se pospešilo uklanjanje precipitata, nakon čega se njihov sadržaj centrifugira 10 minuta pri brzini od 12 000 o/min. Dekantovan supernatant (600 μ l) pomeša se sa 700 μ l 1 M NaOH i meri se apsorbancija na 440 nm u odnosu na slepu probu.

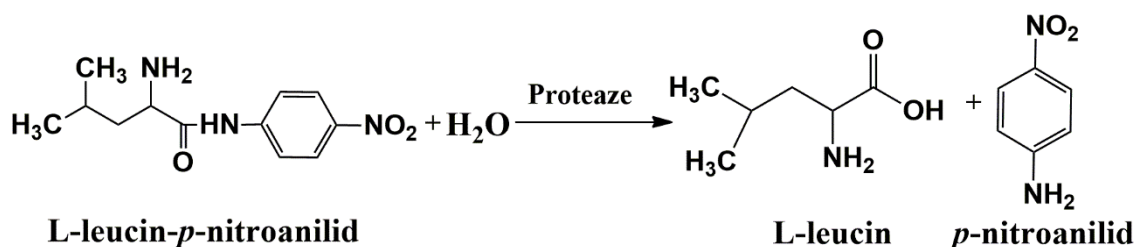
Slepa proba se priprema tako što se umesto rastvora enzima rastvoru azokazeina dodaje destilovana voda u istoj količini (150 μ l). Ovoj smeši se odmah dodaje i rastvor trihlorsirćetne kiseline i ovako pripremljena slepa proba se odmah ostavlja da se ohladi i dalje tretira kao uzorak.

Jedinica proteolitičke aktivnosti definisana je kao količina enzima potrebna za promenu apsorbancije od 1, na 440 nm u kivetu dužine 1 cm pri gore opisanim uslovima.

Prinos imobilizacije aktivnosti je računat po formuli 3.1.

3.2.4.4. Određivanje hidrolitičke aktivnosti proteaza u reakciji hidrolize L-leucin-*p*-nitroanilida

Za određivanje hidrolitičke aktivnosti komercijalnih preparata proteaza Flavourzyme korišćena je i metoda po kojoj se kao supstrat koristi L-leucin-*p*-nitroanilid (L-LPNA) (slika 3.5).



Slika 3.5. Hidroliza L-leucin-*p*-nitroanilida pomoću proteaza.

Rastvor supstrata se priprema tako što se prvo pripremi 50 mM rastvor L-leucin-*p*-nitroanilida u metanolu. Ovaj rastvor se potom razblaži do 24 mM dodavanjem 50 mM

TRIS-HCl pufera pH 8. Ovako pripremljen rastvor L-LPNA se koristi za određivanje proteolitičke aktivnosti proteaza.

Reakciona smeša se priprema sipanjem u kivetu 2,95 ml rastvora L-LPNA i 0,05 ml početnog rastvora enzima ili supernatanta, ili dodavanjem 2 mg imobilisanog enzima. Pripremljena reakciona smeša se inkubira 5 minuta na 30 °C, nakon čega se meri apsorbanca na 405 nm.

Slepa proba se pravi na isti način kao reakciona smeša stim da se umesto enzima dodaje 0,05 ml pufera.

Jedinica proteolitičke aktivnosti je definisana kao količina enzima potrebna da hidrolizuje 1 μmol 24 mM rastvora L-LPNA do L-leucina i *p*-nitroanilida po minuti na pH 8 i temperaturi od 30 °C.

Proteolitička aktivnost slobodnog enzima ili supernatanta u reakciji L-LPNA se preračunava po formuli:

$$\text{Aktivnost} \left(\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Apsorbanca} (405 \text{ nm}) * 3}{9,9 * 0,1}, \text{ gde je 3-ukupna zapremina reakcione}$$

smeše, ε-9,9 i 0,1-ukupna zapremina analiziranog uzorka rastvora enzima.

Proteolitička aktivnost imobilisanog enzima (IU/mg) u reakciji hidrolize L-LPNA se preračunava po istoj formuli s tim da se umesto 0,1 ml uzorka koristi 2 mg imobilisanog enzima.

3.2.5. Određivanje sadržaja proteina

3.2.5.1. Metoda po Loriju

Za određivanje proteina metodom po Loriju pripremljeni su:

1. 2 %-ni rastvor Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH (rastvor A),
2. 1 %-ni rastvor CuSO₄·5H₂O u destilovanoj vodi (rastvor B),
3. 2 %-ni rastvor kalijum, natrijum-tartarata u destilovanoj vodi (rastvor C).

Mešanjem 1 ml rastvora A sa 1 ml rastvora B i dopunjavanjem do 100 ml rastvorom C dobijen je rastvor D. Rastvor D se priprema neposredno pre upotrebe.

Standardna kriva je određena pre prvog merenja. Napravljena su standardna razblaženja osnovnog rastvora BSA (albumin iz goveđeg seruma) koncentracije 1 mg/ml dobijenog rastvaranjem 10 mg BSA u 10 ml destilovane vode. Uzorci su pripremljeni tako što su mikropipetom odmerene zapremine 0,1-0,5 ml osnovnog rastvora BSA, a zatim su dopunjeni do ukupno 1 ml zapremine destilovanom vodom. U svaki uzorak je dodato po

2 ml rastvora D, a nakon 10 min stajanja i 0,2 ml Folinovog reagensa, nakon čega su uzorci vorteksirani i ostavljeni da odstoje tokom 45 min. Određivanjem apsorbanci na 500 i 720 nm dobijene su vrednosti pomoću kojih je konstruisana standardna kriva.

Za ispitivanje uzorka nepoznate koncentracije proteina (rastvora slobodnog enzima i supernatanta odvojenih nakon završene imobilizacije) primenjena je sledeća procedura: U epruvetu je odmeren 1 ml uzorka i dodato je 2 ml rastvora D. Nakon 10 min stajanja, uzorku je dodato 0,2 ml Folinovog reagensa, uzorak je vorteksiran i ostavljen da stoji 45 min. Nakon isteka ovog vremena izmerena je apsorbancia na 500 i 720 nm, pa je na bazi dobijenih vrednosti i nagiba standardne krive određen sadržaj proteina u uzorku.

3.2.5.2. Metoda po Bredfordu

Za određivanje proteina metodom po Bredfordu, koncentrovana boja je pripremljena tako što je 100 mg Coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250) rastvoreno u 50 ml 95 % etanola, a zatim je dodato 100 ml fosforne kiseline i voda do ukupne zapremine od 200 ml. Da bi se dobio Bredfordov reagens, u 100 ml koncentrovane boje se dodaje 400 ml destilovane vode. Ovako pripremljen Bredfordov reagens neophodno je profiltrirati tri puta i čuvati u tamnoj boci, pri čemu se ostaje stabilan 2-3 nedelje.

Kako bi se odredila koncentracija proteina u uzorku, 20 µl rastvora (početnog rastvora enzima ili supernatanta) je odmereno u plastičnu kivetu, a tome je dodat 1ml Bredfordovog reagensa. Nakon 5 minuta spektrofotometrijski se određuje apsorbancia na 595 nm.

Koncentracija proteina se preračunava pomoću standardne krive, koja je pre prvog merenja dobijena sa rastvorom BSA definisane koncentracije na isti način kao što je opisano u metodi po Loriju.

Koncentracija imobilisanih proteina na nanočestice (mg/g nosača) i prinos imobilizacije proteina (%) su računati po formulama:

$$\text{Koncentracija imobilisanih proteina } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ nosača}\right) = \frac{\text{koncentracija unetih proteina} - \text{koncentracija proteina u supernatantu nakon imobilizacije}}{\text{masa nosača}}$$

$$\text{Prinos imobilizacije proteina } (\%) = \frac{\text{koncentracija imobilisanih proteina}}{\text{koncentracija unetih proteina}} \times 100$$

3.2.6. Određivanje termostabilnosti imobilisanih enzima

Da bi se odredila stabilnost imobilisanih enzima na povećanoj temperaturi pripremljeni su, po prethodno opisanim postupcima, odabrani imobilizati:

1. lipaze na FNS, AFNS, CCAFNS i GFNS u 0,1 M i 1 M fosfatnim puferima (pH 7),
2. β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS u 0,1 M acetatnom puferu pH 4,5

Za sve imobilizate je korišćena ista procedura:

U više ependorfa je odmereno po 1 mg imobilisanog enzima i suspendovano u 1 ml odgovarajućeg pufera. Ependorfi su potom stavljeni u termostatirano vodeno kupatilo na odgovarajuću temperaturu (55 °C u slučaju lipaze i 60 °C u slučaju β -galaktozidaze). Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima da bi se odredila njihova aktivnost. Neposredno pre uzimanja uzorka suspenzija je na kratko izmešana na magnetnoj mešalici da bi se dobio reprezentativan uzorak.

Nakon hlađenja uzorka određena je aktivnost imobilizata pomoću *p*-nitrofenil palmitata za imobilisane lipaze ili pomoću *o*-nitrofenil- β -galaktozidaza za imobilisane β -galaktozidaze po prethodno definisanim metodama u poglavljima 3.2.4.1. i 3.2.4.2., a dobijeni rezultati predstavljeni su kao relativna aktivnost (procentualno u odnosu na aktivnost pre izlaganja povišenoj temperaturi).

3.2.7. Određivanje operativne stabilnosti imobilisanih enzima

3.2.7.1. Određivanje operativne stabilnosti imobilisanih lipaza

Operativna stabilnost imobilisane lipaze na FNS, AFNS, CCAFNS i GFNS je testirana u reakciji hidrolize *p*-nitrofenil palmitata. Tokom jednog ciklusa 4 mg imobilisanog enzima je inkubirano sa 2 ml supstrata u trajanju od minut uz mešanje na magnetnoj mešalici (600 o/min). Nakon toga reakciona smeša je centrifugirana na 13000 o/min 2 minuta kako bi se reakcioni medium odvojio od imobilisanog enzima. Aktivnost imobilisanog enzima u svakom ciklusu je određivana merenjem absorbance odvojenog reakcionog medijuma na 410 nm. Imobilisan enzim koji je odvojen od supernatanta je opran sa 2 ml TRIS-HCl pufera i potom korišćen u narednom ciklusu na isti način. Dobijena aktivnost imobilisanog enzima u svakom ciklusu je predstavljena kao relativna aktivnost u odnosu na nulti ciklus.

3.2.7.2. Određivanje operativne stabilnosti imobilisanih β -galaktozidaza

Operativna stabilnost β -galaktozidaze imobilisane na AFNS (pri koncentraciji ponuđenih proteinima od 230 mg/g tokom 3 h u 0,1 M acetatnom puferu pH 4,5) je testirana na 50 °C u sintezi galakto-oligosaharida. Reakciona smeša je sadržala 100 mg imobilisanog enzima i rastvor laktoze koncentracije 400 g/l u 0,1 M acetatnom puferu pH 4,5. Nakon svakog ciklusa (ciklus je trajao 1 h) količina sintetisanih galakto-oligosaharida je utvrđena HPLC metodom. Imobilisan enzim je odvojen od reakcione smeše centrifugiranjem na 13000 rpm 3 minuta i ponovo korišćen na isti način.

3.2.8. Sinteza aroma estara pomoću imobilisanih lipaza

Sinteza aroma estara je izvođena u balonima (50 ml) u koje je odmereno 5 ml izooktana, ekvimolarne koncentracije amil alkohola i kapronske kiseline ($2,5 \times 10^{-3}$ mol), 5 μ L vode i 50 mg suvog imobilisanog enzima. Baloni su potom stavljeni u vodeno kupatilo na temperaturu od 45 °C tokom 24 h uz mešanje brzinom od 150 rpm. Reakcija je prekinuta dodavanjem smeše etanola i dietil etra (1:1) nakon 24 h. Količina sintetisanog estara je određena titracijom reakcione smeše sa 0,1 M NaOH u prisustvu fenoftaleina kao indikatora. Na osnovu zapremine utrošenog NaOH za neutralizaciju zaostale kiseline u reakcionoj smeši može se izračunati količina utrošene kiseline za sintezu estara. Količina sintetisanog estara je proporcionalna količini utrošene kiseline prilikom sinteze estara.

3.2.9. Sinteza galakto-oligosaharida pomoću imobilisanih β -galaktozidaza

Reakcija sinteze galakto-oligosaharida (GOS) je izvedena u balonima (50 ml) koji su stavljeni u termošejker na 200 rpm i 50 °C tokom 8 h. Reakciona smeša se sastojala od rastvora laktoze koncentracije 400 g/l u 0,1 M acetatnom puferu pH 4,5 i 100 mg imobilisanog enzima. Ovi reakcioni uslovi su primenjeni pošto je u okviru doktorske disertacije koja je izvedena na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju optimizovana ova reakcija i utvrđeno da su to optimalni uslovi.¹⁶¹ Prilikom izvođenja reakcije sa slobodanim enzimom njegova koncentracija je podešena da odgovara aktivnosti imobilisane β -galaktozidaze (200 IU mereno u hidrolizi o-NPG-a). Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima i reakcija je prekidana zagrevanjem uzetih uzoraka na 100 °C tokom 10 minuta kako bi se inaktivirao enzim. Potom su uzorci razblaženi 10 puta dejonizovanom vodom, centrifugirani i analizirani pomoću HPLC-a. Paralelno, kontrolni uzorci bez enzima su pripremljeni i tretirani na isti način, nakon analize produkti reakcije nisu detektovani u njima.

3.2.9.1. HPLC analiza

Za kvantativnu analizu uzoraka dobijenih u reakciji sinteze GOS-a korišćen je Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific HPLC system. Određivanje GOS-ova je izvedeno na ugljeničnoj koloni (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca²⁺, 300 mm × 7.7 mm, 8 μm) na 80 °C. Dejonizovana voda je korišćena kao mobilna faza za brzinom elucije od 0,6 ml/min tokom analize. Detekcija proizvoda reakcije je izvedena pomoću Detection RI detektora RefractoMax 520. Svi dobijeni podaci su obrađeni pomoću Chromeleon softvera.

3.2.10. Sinteza galaktozida laktitola pomoću imobilisanih β-galaktozidaza

Reakcije sinteze galaktozida laktitola pomoću slobodnog enzima i imobilisanog na AFNS su izvedene u šlifovanim erlenmajerima na vazdušnoj tresilici na 150 o/min i 45 °C. Reakciona smeša se sastojala od laktoze (koncentracije 200 mM), galaktitola (koncentracije 1,4 M), NaCl (koncentracije 1 M) koji su rastvoreni u 5 ml acetatnog pufera (pH 4,5). U reakcionu smešu je potom dodato 0,2 mg/ml slobodnog enzima ili 5 mg imobilisanog enzima. Reakcija je trajala 4,7 h. Reakcija je prekinuta kuvanjem 10 minuta na 100 °C, uzorci su adekvatno razblaženi, centrifugirani i zatim analizirani korišćenjem HPLC metode (opisanoj u poglavlju 3.2.9.1).

3.2.11. Elektroforeza

Natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE) je korišćena za detektovanje enzima koji čine komercijalni preparat proteaza-Flavourzyme kao i enzima u supernatantima odvojenim nakon imobilizacije ovog preparata na FNS, AFNS i CCAFNS nanočesice.

Princip elektroforeze se sastoji u tome da natrijum dodecilsulfat (SDS), koji je anjonski deteržent, vezuje za sebe molekule proteina svojim hidrofobnim „repom“. Negativno naelektrisanje SDS-a uslovljava međusobno odbijanje tako da se proteini relativno lako odvajaju. U proseku na svake dve aminokiseline molekula proteina se vezuje po jedan molekul SDS-a. Vezivanje SDS-a uslovljava razvijanje proteina u izduženi polipeptidni lanac. Na ovaj način postiže se odvajanje proteina. Svi proteini su prekriveni SDS-om pa su jako negativno naelektrisani. Zato se ovi „kompleksi“ kreću ka pozitivnoj elektrodi kroz poliakrilamidni gel. Manji molekuli se kreću brže i za isto vreme putuju dalje od većih molekula. Na kraju elektroforeze proteini su razdvojeni u diskretne trake po opadajućoj molekulskoj masi od mesta nanošenja do kraja gela. Bojenjem organskim bojama ili srebrom omogućava se da se po pojedinačnoj traci proteina detektuje od 0,5 μg do 0,5

Tabela 3.1. Priprema gradijentnih gelova.

<i>Rastvori</i>	<i>Gel za razdvajanje (10 %)</i>	<i>Gel za koncentrovanje (4 %)</i>
1. Monomerni rastvor (30 % akrilamida, 2,7 % bisakrilamida i voda)	10 ml	0,4 ml
2. Tris pufer (1,5 M, pH 8,8)	7,5 ml	-
3. Tris pufer (0,5 M pH 6,8)	-	0,75 ml
4. Voda	12,5 ml	1,8 ml
5. TEMED	10 µl	8 µl
Dezaeracija 5-10 minuta		
6. SDS (10 % m/V)	0,3 ml	30 µl
7. APS (10 % m/V)	0,15 ml	15 µl
Finalna zapremina	30 ml	3 ml

Tabela 3.2. Priprema pufera za obradu uzoraka.

<i>Sastav pufera za obradu uzoraka</i>	<i>Količina</i>
0,0625 M 0,5 M Tris pufer pH 6,8	9,38 ml
10 % Glicerol	7,5 ml
2 % SDS	1,5 g
0,002 % Brom fenil plavo	1,5 ml
Voda	21,25 ml
5 % β-merkaptetanol	3,75 ml

Kada je puštena elektroforeza voltaža je držana konstantnom (80 V) dok uzorci nisu ušli u gel za razdvajanje, a potom je povišavana se od 150 do 400 V do kraja rada.

Kalibracijom gela (4/10 % koncentrovani odnosno razdvajajući gel) proteinima poznatih masa formira se standardna kriva. Za standardnu krivu je korišćen komercijalni marker.

3.2.11.2. Detekcija proteinskih traka bojenjem srebrom

Proteini na gelu su detektovani bojenjem srebrom. Nakon završene elektroforeze gel je pažljivo prenet u staklenu posudu i ispran destilovanom vodom. Gel je prvo fiksiran a potom ispiran. Postupak fiksiranja i ispiranja je dat u Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Procedura bojenja gelova srebrom.

<i>Rastvori</i>	<i>Vreme (minuti)</i>
<i>1. Ispiranje destilovanom vodom</i>	1
<i>2. 50 % metanol, 20 % TCA, 2 % CuCl₂</i>	15
<i>3. 10 % etanol, 5 % sirćetna kiselina</i>	10
<i>4. 0,01 % KMnO₄</i>	10
<i>Ispiranje destilovanom vodom</i>	1
<i>5. 10 % etanol, 5 % sirćetna kiselina</i>	10
<i>6. 10 % etanol</i>	10
<i>Ispiranje 2 puta destilovanom vodom</i>	1
<i>7. Destilovana voda</i>	10
<i>8. 0,1 % AgNO₃</i>	10
<i>Ispiranje destilovanom vodom</i>	20 sekundi
<i>9. 10 % K₂CO₃</i>	1
<i>10. 2 % K₂CO₃, 0,01 % formaldehid</i>	Do pojave traka
<i>11. 10 % etanol, 5 % sirćetna kiselina</i>	20 sekundi
<i>Ispiranje destilovanom vodom</i>	20 sekundi
<i>12. Čuvanje u 0,02 % K₂CO₃</i>	neograničeno

Nakon završenog bojenja gel sa razdvojenim proteinskim je snimljen digitalnom kamerom.

3.2.12. Hidroliza proteinskog izolata suncokretove sačme pomoću imobilisanih proteaza

3.2.12.1. Frakcionisanje suncokretove sačme

Frakcionisanje suncokretove sačme je izvedeno u destilovanoj vodi, pri čemu dolazi do odvajanja tri frakcije: lignocelulozne (LF), tečne frakcije (TF) i taloga. Procesom sedimentacije dolazi do formiranja taloga, dok LF isplivava na površinu TF frakcije kao najlakša komponenta. Potom je mehanički odvojena LF frakcija. Razdvajanje TF frakcije i taloga je urađeno dekantovanjem. Dobijen talog je frakcija bogata proteinima i nekim nerastvornim komponentama suncokretove sačme. Kako bi se proteini odvojili od nerastvornih jedinjenja, odnosno preveli u rastvoran oblik, pristupljeno je alkalnoj

ekstrakciji. Talog je suspendovan u destilovanoj vodi i potom tretiran koncentrovanim NaOH (30 %) do uspostavljanja pH vrednosti od 10,5. Pri ovoj pH vrednosti svi proteini se nalaze u rastvorenom obliku tj. proteini su iz taloga prešli u formiranu tečnu fazu. Tečna faza se od taloga odvaja dekantovanjem. Potom se proteini suspendovani u tečnoj fazi kiselim precipitacijom izdvajaju iz rastvora podešavanjem njegove pH na izoelektričnu tačku proteina suncokretove sačme koja ima vrednost 4,3. Novodobijeni talog predstavlja proteinski izolat suncokretove sačme. Frakionisanjem suncokretove sačme dobijen je proteinski izolat koji ima 1,98 % suve materije i pH vrednost 4,3. Zatim je izvršena neutralizacija proteinskog izolata 0,1 M fosfatnim puferom pH 7,5 u zapreminskom odnosu 1:1. Dobijen proteinski izolat je imao pH 7 nakon neutralizacije i sadržaj suve materije 1 %.

3.2.12.2. Hidroliza proteinskog izolata pomoću imobilisanih proteaza

Hidroliza dobijenog proteinskog izolata (pH 7) je rađena pomoću imobilisane alkalaze na GFNS nanočestice u 1 M puferu, imobilisanog Flavourzyme-a na CCAFNS nanočestice u 0,01 M puferu kao i kombinacijom ova dva imobilisana preparata. U tri erlenmajera je sipano po 20 ml proteinskog izolata i 30 mg alkalaze u dva erlenmajera i 35 mg Flavourzyme-a u treći erlenmajer. Reakcija je izvođena na 50 °C tokom 8 h. U jedan od dva erlenmajera sa 20 mg alkalaze je nakon 2 h od početka reakcije dodato i 35 mg Flavourzyme-a imobilisanog na CCAFNS.

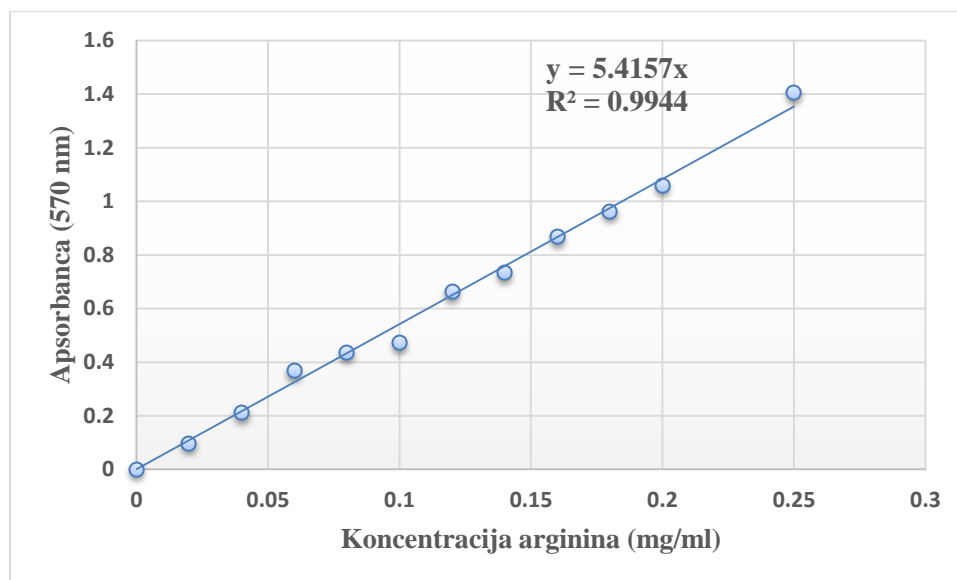
U toku vremena (1, 2, 3, 4, 6 i 8 h) uzimani su uzorci iz sve tri reakcione smeše i potom kuvani 10 minuta na 90 °C kako bi se prekinula reakcija. Potom su uzorci analizirani ninhidrinskom metodom i na HPLC-u kako bi se utvrdio sadržaj proteina i aminoliselina dobijenih hidrolizom pomoću ovih imobilisanih enzima.

3.2.12.2.1. Ninhidrinska metoda

Potrebni reagensi: Ninhidrinski reagens je napravljen tako što je prvo rastvoreno 80 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u 50 ml citratnog pufera (0,2 M; pH 5), a 0,5 g ninhidrina je rastvoreno u 10 ml DMSO-a. Jednake zapremine ova dva rastvora su pomešane neposredno pre upotrebe. Rastvor PEG-a je napravljen rastvaranjem 1,2 ml PEG 6000 u 10 ml destilovane vode.

Postupak: 100 μl 10 puta razblaženog uzorka reakcione smeše (uzimanih u toku trajanja reakcije iz sva tri erlenmajera) pomeša se sa 100 μl rastvora PEG u ependorfu. Zatim se doda 1000 μl ninhidrinskog reagensa i smeša se zagreva u termošejkeru na 80 °C tokom 10 min. Ependorf se zatim ohladi i doda se 1000 μl ddH₂O. Smeša se potom prebaci u

kivetu i meri se apsorbancu spektrofotometrijski na 570 nm. Koncentracija aminokiselina se preračunava pomoću standardne krive, koja je pre prvog merenja dobijena sa vodenim rastvorom arginina definisane koncentracije (slika 3.8.).



Slika 3.8. Standardna kriva za ninhidrinsku metodu.

3.2.12.2.2. HPLC metoda

Za kvantativnu analizu uzoraka dobijenih u reakciji hidrolize proteinskog izolata pomoću imobilisanih enzima korišćen je Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific (Voltam, SAD) HPLC sistem sa reverzno faznom kolonom Hypersil gold C18, 150 mm \times 4,6 mm. Detekcija proizvoda vršena je UV detektorom na 210 nm. Korišćen je gradijentni sistem sa dve mobilne faze: vodeni rastvor 0,1 M trifluorsirćetne kiseline (mobilna faza A) i acetonitril (mobilna faza B). Brzina elucije mobilnih faza je bila 1 ml/min tokom cele analize, a kolona je termostatirana na 30 °C. Mobilne faze su dovođene u kolonu sledećim redosledom: u prvih 10 minuta samo mobilna faza A, potom je od 10 do 45 minuta uspostavljen rastići linearni gradijent od 0 do 100 % po mobilnoj fazi B, i u poslednjih 5 minuta opadajući linearni gradijent od 100 % do 0 % takođe po mobilnoj fazi B.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Hemijska funkcionalizacija nanočestica silike

4.1.1. Vrste i ciljevi hemijskih modifikacija

U sklopu ove doktorske disertacije, komercijalne, pirogene, neporozne nanočestice silike Aerosil® 380 (FNS) su korišćene kao polazni materijal za dizajniranje što adekvatnijih nosača za imobilizaciju enzima. Na osnovu specifikacije dobijene od proizvođača ovih nanočestica, one imaju prečnik 7 nm i specifičnu površinu od $380 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.¹⁰⁸ Mali prečnik i velika specifična površina koje daju mogućnost da se velika količina enzima veže na njihovu površinu, uz osobine kao što su netoksičnost i biokompatibilnost predstavljaju glavne razloge za korišćenje ovih nanočestica.

Optimalna raspodela i vrsta reaktivnih funkcionalnih grupa na površini nosača definiše tip interakcija koje će biti formirane između nosača i molekula enzima (adsorpcija ili kovalentna imobilizacija) i predstavlja jedan od najbitnijih izazova prilikom dizajna nosača. U mnogim slučajevima nosač, kao što su npr. nanočestice silike (FNS), ne poseduju adekvatne funkcionalne grupe koje bi omogućile odgovarajuće interakcije sa molekulima enzima pa hemijska modifikacija postaje imperativ.

Imobilizacija enzima adsorpcijom zasniva se na slabim privlačnim silama između molekula enzima i čvrstog nosača. Osnovne vrste interakcija koje se uspostavljaju između enzima i nosača su dipol-dipol interakcije, disperzne sile, elektrostatičke interakcije, vodonične veze i hidrofobne interakcije. Fizičko-hemijske karakteristike enzima i nosača, kao i postojanje reaktivnih funkcionalnih grupa na enzimu i nosaču određuju koja će od ovih interakcija dati veći doprinos pri interakciji.

Kako se enzimi na nanočestice silike mogu vezati isključivo nespecifičnom adsorpcijom razvijene su dve procedure modifikacije površine nanočestica silike reakcijom silanizacije čiji je cilj uvođenje funkcionalnih grupa (amino i fenilamino grupa) koje će omogućiti specifičnije vezivanje enzima adsorpcijom.

Prva procedura se zasniva na modifikaciji reakcijom silanizacije površine nanočestica silike korišćenjem 3-aminopropiltrimetoksisilana (APTMS-a) radi uvođenja na njihovu površinu primarnih amino grupa. Na amino-modifikovane nanočestice silike (AFNS) enzimi se mogu vezati adsorpcijom i to pre svega formiranjem elektrostatičkih interakcija. Suština drugog primenjenog načina modifikacije površine nanočestica silike pomoću trimetoksi(2-fenilpropil)silana (PAPMS-a) je da se na njihovu površinu

vedu fenilamino grupe. Osnovna ideja uvođenja fenilamino grupa na površinu ovih nanočestica je da se poveća hidrofobnost površine nanočestica silike, i time omogućiti bolje vezivanje enzima adsorpcijom stvaranjem hidrofobnih interakcija.

Ipak kako je krajnji cilj dobijanje modifikovanih nanočestica koje će dati mogućnost stvaranja jakih kovalentnih veza sa enzimima, a kako ni amino ni fenilamino modifikovane nanočestice to ne omogućavaju, amino-modifikovane nanočestice su tretirane aktivirajućim reagensom cijanuril-hloridom. Aktiviranjem amino-modifikovanih nanočestica silike cijanuril-hloridom dobijaju se nanočestice sa slobodnim atomima hlora koje omogućavaju formiranje kovalentne veze sa amino grupama prisutnim na površini molekula enzima. Aktivacija amino-modifikovanih nosača je veoma često korišćena procedura za uvođenje funkcionalnih grupa na površinu nosača koje sa enzimima mogu da formiraju kovalentne veze. Kao aktivirajući reagensi se najčešće koriste epihlorhidrin, glutaraldehyd i dr.¹⁴⁵ U literaturi postoje podaci o procedurama korišćenim za modifikaciju nanočestica silike amino-organosilanima kakvi su 3-aminopropiletoksisilan i 3-aminopropiltrimetilsilan¹¹⁴ ali ne postoje podaci da je primenjivana procedura aktiviranja amino-modifikovanih nanočestica silike cijanuril-hloridom.

Nakon ispitivanja mogućnosti kovalentne imobilizacije enzima na cijanuril-hloridom aktivirane nanočestice silike pokušano je da se jednostavnijom procedurom modifikacije na površinu silika nanočestica uvedu grupe koje mogu isto tako da omogućе kovalentno vezivanje enzima. Izbor je pao na kuplujući bifunkcionalni reagens (3-glicidiloksipropil)trimetoksisilan (GOPTMS) tj. organosilan koji poseduje epoksi grupe na jednom svom kraju i koji se može iskoristiti da u jednostepenom postupku modifikacije nanočestica silike na njihovu površinu budu uvedene veoma reaktivne epoksidne grupe. Generalno, modifikacija površine nosača uvođenjem epoksidnih grupa na njihovu površinu je jedna od najkorišćenijih metoda zbog činjenica da epoksidne grupe poseduju veliku stabilnost na neutralnoj pH, veliku reaktivnost i mogućnost formiranja kovalentnih veza sa različitim grupama enzima kao što su amino, hidroksilne i tiolne.^{162, 163} Iz tog razloga ove grupe se primenjuju u imobilizaciji enzima. Postoje konvencionalni nosači (Eupergit® C, Eupergit® C 250 L, Sepabeads)¹⁶³⁻¹⁶⁵ sa epoksidnim grupama na površini koji se uspešno koriste za imobilizaciju enzima.

4.1.2. Optimizacija hemijske modifikacije nanočestica silike

U prvom delu ove studije, istraživanja su fokusirana na optimizaciju uslova modifikacije površine nanočestica silike reakcijom silanizacije pomoću različitih organosilana (APTMS, GOPTMS i PAPMS) kako bi se dobile nanočestice što boljih fizičko-hemijskih osobina značajnih za njihovu primenu u imobilizaciji enzima. Tokom optimizacije uslova modifikacije kao model enzim je korišćena lipaza iz *C. rugosa* (CRL).

Generalno, lipaze (triacilglicerol-acil hidrolaze, E.C. 3.1.1.3.) su enzimi koji katališu reakciju hidrolize triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina, diacilglicerola, monoacilglicerola i glicerola. Imaju sposobnost i da katališu reakcije esterifikacije, transesterifikacije i interesterifikacije u sredinama sa malim sadržajem vode. Lipaza izolovana iz kvasca *C. rugosa* je jedna od industrijski najkorišćenijih i najproučavanijih lipaza pošto je jeftina i lako dostupna.^{166, 167 20, 168} CRL se koristi za sintezu estara koji su našli primenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, proizvodnji biodizela i deterdženata.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Sve navedene činjenice preporučuju CRL da bude imobilisana u ovoj studiji.

Lipaza je uporedo imobilisana kako na nemodifikovane nanočestica silike tako i na modifikovane i određivan je efekat koji modifikacija ima na osobine imobilisanog enzima koje su značajne za njegovu upotrebu praćenjem sledećih izlaznih veličina: koncentracije imobilisanih proteina (mg/g nosača), koncentracije imobilisane aktivnosti (IU/g nosača), prinosa imobilizacije proteina (%) i prinosa imobilizacije aktivnosti (%). Dobijeni rezultati su iskorišćeni za formiranje hipoteze o vrsti interakcija formiranih između enzima i nanočestica silike. Na osnovu dobijenih vrednosti parametara imobilizacije i karakterizacije imobilisanih preparata izabrani su optimalni uslovi pod kojima bi trebalo modifikovati nanočestice silike kako bi se dobili pogodni nosači za imobilizaciju enzima.

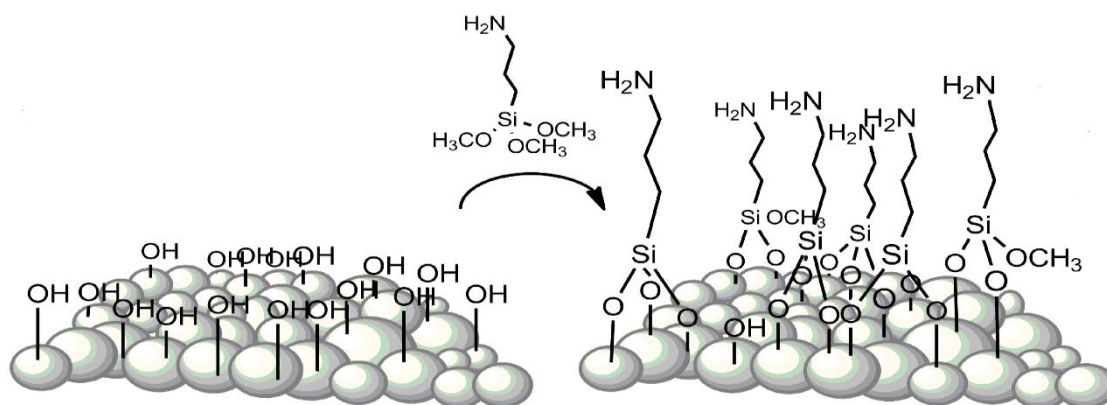
4.1.2.1. Optimizacija uslova reakcije silanizacije amino-organosilanom i aktivacije nanočestica silike

Uslovi reakcije modifikacije nanočestica silike amino-organosilanom (APTMS-om) i kasnije aktivacije amino-modifikovanih nanočestica silike cijanuril-hloridom su optimizovani sa ciljem dobijanja imobilisane lipaze što boljih katalitičkih karakteristika.

4.1.2.1.1. Optimizacija uslova reakcije modifikacije nanočestica silike amino-organosilanom

Na osnovu pregleda literature bifunkcionalni kuplujući reagens organosilan APTMS je izabran za modifikaciju površine nanočestica silike između više modifikujućih agensa zbog činjenice da poseduje aminopropil grupu na jednom kraju molekula i tri hidrazibilne metoksi grupe na drugom kraju.

Modifikacijom nanočestica silike APTMS-om dolazi do reakcije između silanol grupa prisutnih na površini silika nanočestica i hidrazibilnih grupa molekula APTMS pri čemu nastaju Si-O-Si veze, što kao rezultat ima da na nanočestice silike bivaju uvedene slobodne primarne amino grupe (šema 4.1.).

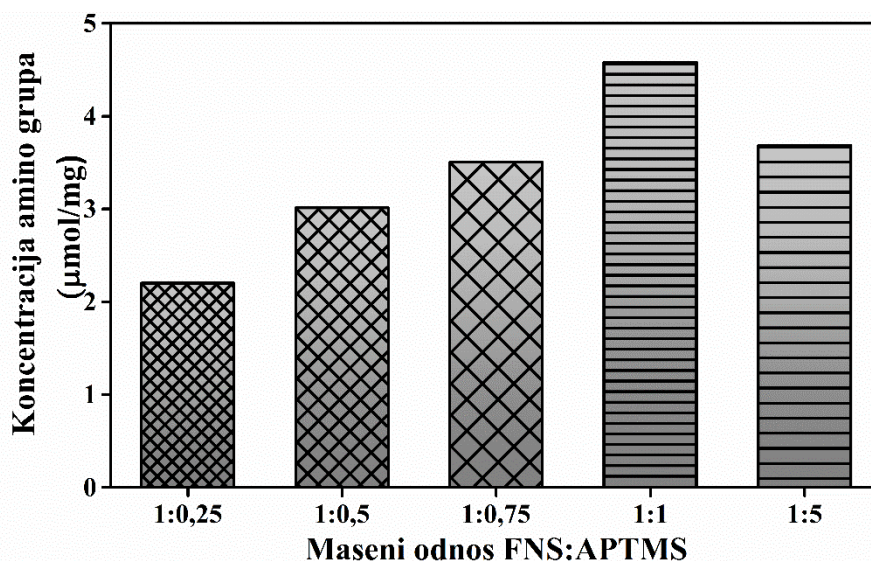


Šema 4.1. Šematski prikaz modifikacije nanočestica silike (FNS) amino-organosilanom APTMS-om.

Uvedene amino grupe predstavljaju pogodne funkcionalne grupe za imobilizaciju enzima adsorpcijom (formiranjem elektrostatičkih interakcija, vodoničnih veza i dr.) ili se mogu koristiti za dalju hemijsku modifikaciju jedinjenjima koja će omogućiti kovalentno vezivanje enzima. Iz ovih razloga je potrebno odrediti količinu uvedenih amino grupa na površinu amino-modifikovanih nanočestica silike.

Koncentracija amino grupa na površini nanočestica silike direktno zavisi od koncentracije amino-organosilana upotrebljenog prilikom modifikacije. Da bi se odredila adekvatna količina amino-organosilana potrebna za modifikaciju, određena količina nanočestica silike (300 mg) je modifikovana pri pet različitih koncentracija APTMS-a (izraženo u masenim odnosima FNS:APTMS 1:0,25; 1:0,5; 1:0,75; 1:1 i 1:5). Reakcija modifikacije je izvedena na 25 °C tokom 48 h u inertnoj atmosferi, a ovi uslovi su izabrani na osnovu dostupnih literaturnih podataka.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Nakon završene modifikacije je određena

koncentracija amino grupa metodom opisanom u poglavlju 3.2.1.1.1., a dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.1.



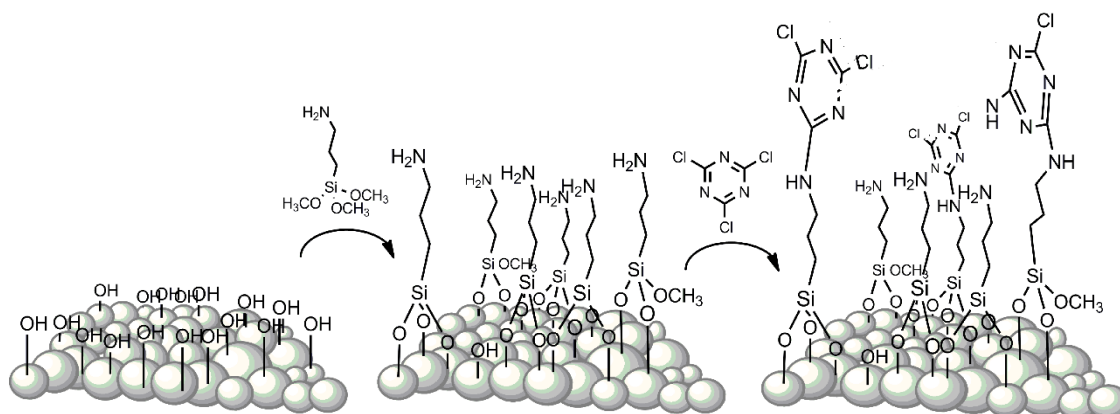
Slika 4.1. Određivanje koncentracije amino grupa na površini APTMS-om modifikovanih nanočestica silike.

Koncentracija amino grupa uvedenih na površinu FNS nanočestica linearno raste sa porastom količine korišćenog APTMS-a za modifikaciju do masenog odnosa FNS:APTMS 1:1. Najviše grupa (4,58 µmol/mg) je uvedeno na FNS površinu kada je korišćen ovaj maseni odnos. Upotreba pet puta veće koncentracije APTMS-a nije dovela do povećanja koncentracije amino grupa na površini FNS nanočestica, pa je ustanovljeno da je optimalni maseni odnos za modifikaciju silika nanočestica 1:1. U daljim eksperimentima biće korišćene amino-modifikovane nanočestice silike dobijene pri masenom odnosu FNS:APTMS 1:1, pa će se termin AFNS odnositi na amino-modifikovane nanočestice silike sintetisane pri masenom odnosu FNS:APTMS 1:1 na 25 °C tokom 48 h u inertoj atmosferi.

Dostupni konvencionalni nosači za imobilizaciju enzima sa amino grupama na površini imaju u proseku oko 1-2 µmol/mg amino grupa, što je skoro upola manje od dobijenih amino-modifikovanih silika nanočestica (AFNS). Izuzetak su čestice silike dimenzija 5 µm modifikovane amino-organosilanom koje u odnosu na AFNS nanočestice (dimenzija 7 nm) imaju čak 1000 puta veću koncentraciju amino grupa na svojoj površini.¹⁷⁵

4.1.2.1.2. Optimizacija uslova aktivacije amino-modifikovanih nanočestica silike

Dobijene APTMS-om modifikovane nanočestice silike (AFNS) poseduju na svojoj površini veliku koncentraciju amino grupa koje mogu biti tretirane aktivirajućim reagensima radi uvođenja grupa sa kojima enzimi mogu formirati kovalentnu vezu na određenom rastojanju od površine čestice. U ovom delu istraživanja kao aktivirajući reagens korišćen je cijanuril-hlorid (CC). Cijanuril-hlorid u svom molekulu poseduje tri slobodna atoma hlora u položaju 2, 4 i 6 *s*-triazinskog prstena, koja se lako mogu supstituisati amino grupama. Prilikom modifikacije AFNS nanočestica sa CC-om slobodne amino grupe ovih čestica će reagovati sa atomima hlora cijanuril-hlorida kao rezultat dobijaju se aktivirane nanočestice silike (CCAFNS) koje na svojoj površini poseduju slobodne atome hlora *s*-triazinskog prstena koji nisu učestvovali u reakciji sa amino grupama AFNS nanočestica (šema 4.2.).



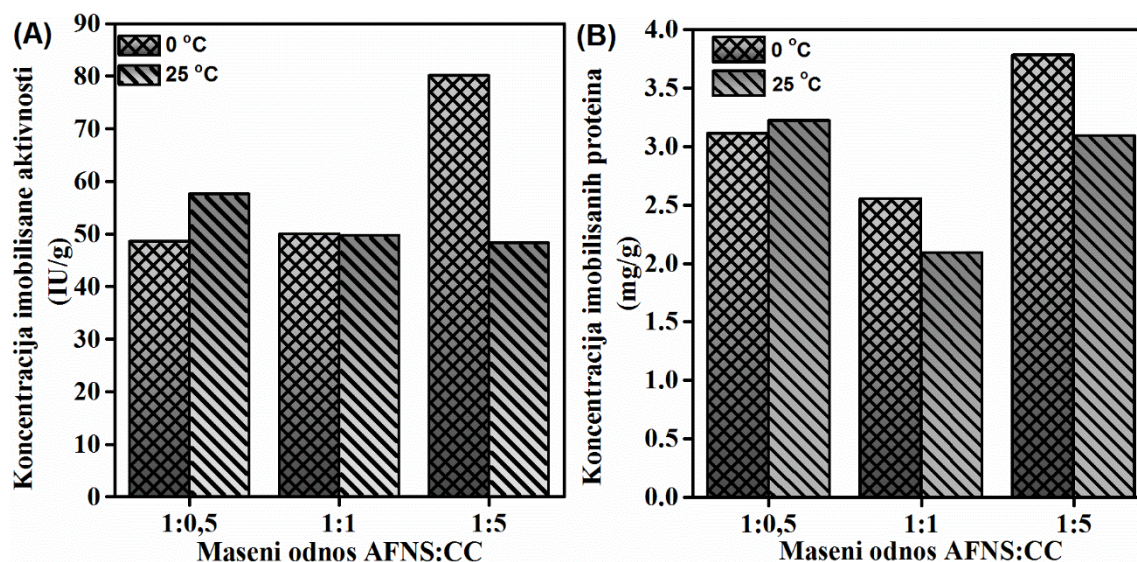
Šema 4.2. Aktivacija amino-modifikovanih nanočestica silike (AFNS) cijanuril-hloridom.

Dobijene aktivirane nanočestice silike, preko preostalih atoma hlora *s*-triazinskog prstena, mogu graditi kovalentne veze sa amino grupama molekula enzima. Način na koji će se vršiti aktivacija AFNS zavisi i od strukture nukleofila, sternih smetnji, supstituenata prisutnih u *s*-triazinskom prstenu, kao i od prirode rastvora u kome se vrši aktivacija. Kontrolom temperature, vremena reakcije i masenih odnosa AFNS i cijanuril-hlorida, u reakciji aktivacije može se postići monosupstitucija atoma hlora u cijanuril-hloridu amino grupama, a da se pri tome izbegne stvaranje disupstituenata jer je potrebno da što više atoma hlora ostane slobodno kako bi moglo da dođe do imobilizacije enzima. ϵ -Amino grupe lizina na površini molekula enzima mogu da supstituišu slobodan atom hlora koji je uveden na površinu aktiviranih nanočestica cijanuril-hloridom i formiraju kovalentnu vezu između enzima i aktiviranih nanočestica. Pri tome se formira stabilna amidna veza

i molekula enzima je odvojen od površine nanočestice „nožicom“ čija je dužina veća od 2 nm.

Iz ovih razloga su optimizovani uslovi aktivacije cijanuril-hloridom amino-modifikovanih nanočestica silike variranjem temperature reakcije aktivacije i masenog odnosa između amino-modifikovanih nanočestica i cijanuril-hlorida. Cilj je da se dobiju aktivirane nanočestice sa optimalnom koncentracijom atoma hlora za vezivanje molekula enzima.

Reakcija aktivacije cijanuril-hloridom je izvedena na dve temperature (0 °C i 25 °C) za tri masena odnosa AFNS i cijanuril-hlorida (1:0,5; 1:1 i 1:5) kako bi se utvrdile optimalne vrednosti ovih parametara za aktivaciju AFNS nanočestica. Na sve dobijene derivate AFNS aktivirane cijanuril-hloridom imobilisana je lipaza. Dobijeni rezultati za imobilizaciju lipaze na aktivirane AFNS derivate su prikazani na slici 4.2.



Slika 4.2. Poređenje uticaja uslova reakcije aktivacije (temperature i masenog odnosa) AFNS cijanuril-hloridom na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i koncentraciju imobilisanih proteina (B) vezane lipaze. Eksperimentalni uslovi imobilizacije lipaze: 5,7 mg/g ponuđenih proteina, 0,1 M fosfatni pufer pH 7; temperatura 25 °C; vreme 3 h.

Imobilisana lipaza ima ubedljivo najveću koncentraciju imobilisane aktivnosti (83 IU/g nanočestica) kada je korišćen maseni odnos AFNS nanočestica i cijanuril-hlorida 1:5, a reakcija aktivacije izvođena na temperaturi od 0 °C (slika 4.2 (A)). Pri ostalim masenim odnosima i temperaturama koncentracije imobilisane aktivnosti lipaze su ujednačene u opsegu od 50-60 IU/g nanočestica.

Koncentracija imobilisanih proteina takođe je najveća kada se reakcija aktivacije izvodi na 0 °C pri masenom odnosu 1:5 i iznosi 3,78 mg proteina/g nanočestica što je gledano iz ugla prinosa imobilizacije proteina 70 % (slika 4.2. (B)). Temperatura od 25 °C se pokazala kao neodgovarajuća po svim dobijenim parametrima imobilisane lipaze. Može se pretpostaviti da je razlog što je u određenoj meri došlo do formiranja disupstituenata između cijanuril-hlorida i amino grupa AFNS nanočestica, pa je imobilizacija lipaze na ove aktivirane derivate AFNS-a otežana sternim smetnjama.¹⁵⁷

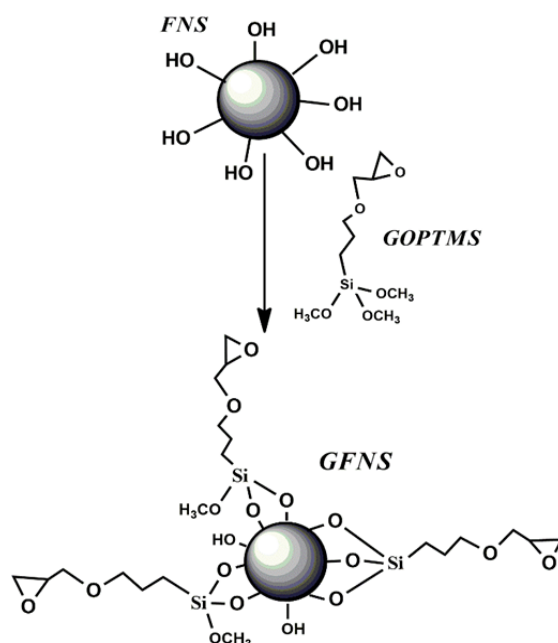
Na osnovu ovih rezultata dolazi se do zaključka da se pri masenom odnosu 1:5 i temperaturi od 0 °C dobijaju aktivirane nanočestice silike sa atomoma hlora na površini koje omogućavaju vezivanje lipaze u aktivnoj konformaciji. U narednim eksperimentima biće korišćene CCAFNS nanočestice dobijene pod ovim uslovima.

4.1.2.2. Optimizacija uslova reakcije silanizacije nanočestica silike epoksi-organosilanom

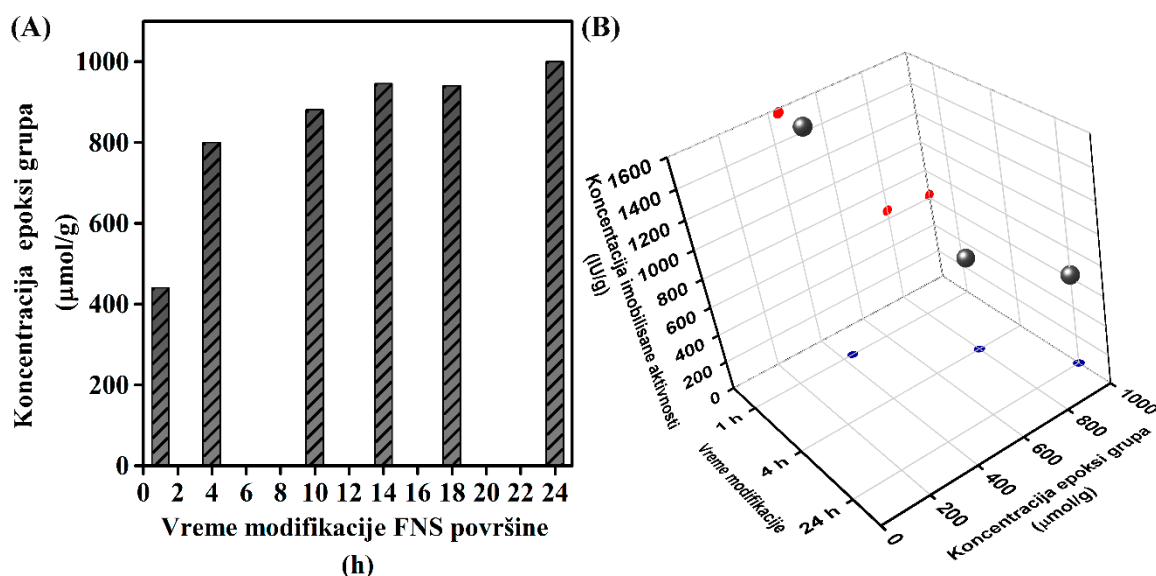
Površina nanočestica silike je modifikovana epoksi-organosilanom (GOPTMS), koji je bifunkcionalni reagens sa tri metoksi grupe na jednom kraju i organofunkcionalnom grupom 3-glicidiloksipropil na drugom kraju, u jednostepenom postupku kako je prikazano na šemi 4.3. Metoksi grupe reaguju za silanol grupama koje se nalaze na površini nanočestica silike čime se dobija uniformna, stabilna i funkcionalizovana površina nanočestica silike sa terminalnim epoksidnim grupama (GFNS) raspoloživim za formiranje kovalentne veze sa enzimima.

Radi razvitka efikasne procedure modifikacije nanočestica silike GOPTMS-om proučavan je uticaj vremena trajanja reakcije modifikacije na količinu uvedenih epoksidnih grupa. Za potrebe definisanja optimalne koncentracije epoksidnih grupa na površini GFNS nanočestica, na dobijene različite GFNS derivate imobilisana je lipaza radi određivanja uticaja koncentracije uvedenih epoksidnih grupa na koncentraciju imobilisane aktivnosti enzima. Imobilizacija lipaze je rađena u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7.⁹

Prvo je ispitivan uticaj vremena modifikacije na koncentraciju uvedenih epoksi grupa na površinu FNS. Vreme trajanja modifikacije je varirano od 1 do 24 h, a rezultati su predstavljeni na slici 4.3. (A). Dobijene koncentracije uvedenih epoksi grupa su varirale od 440 do 1000 $\mu\text{mol/g}$ nanočestica i određene su metodom titracije pomoću HBr/CH₃COOH opisanom u poglavlju 3.2.1.4.1.



Šema 4.3. Jednostepena procedura modifikacije nanočestica silike GOPTMS-om.



Slika 4.3. Uticaj vremena modifikacije površine FNS nanočestica GOPTMS-om na koncentraciju uvedenih epoksi grupa (A). 3D prikaz međusobnog uticaja tri faktora (sive kuglice): vremena modifikacije (1 h, 4 h i 24 h), koncentracije uvedenih epoksi grupa i koncentracije imobilisane aktivnosti lipaze (B). Crvene tačke predstavljaju uticaj koncentracije uvedenih grupa na koncentraciju imobilisane aktivnosti enzima, dok plave predstavljaju uticaj vremena modifikacije na koncentraciju uvedenih grupa.

Evidentno je da sa povećanjem vremena modifikacije količina uvedenih epoksi grupa raste. Većina grupa je uvedena u prvih 4 h modifikacije dok produženje trajanja modifikacije na 24 h nije značajno doprinelo povećanju koncentracije epoksi grupa uvedenih na površinu modifikovanih nanočestica. Bitno je napomenuti da su dobijene koncentracije epoksi grupa značajno veće od koncentracija epoksi grupa na konvencionalnim epoksi nosačima kakvi su npr. Eupergit⁴ i Sepabeads.¹¹

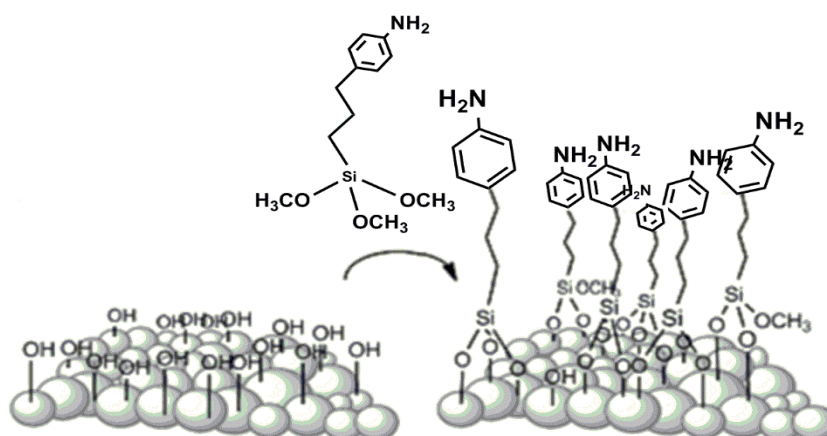
Međutim, ključni parametar za izbor odgovarajućeg derivata GFNS je koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g) lipaze na GFNS derivat. Pa su tako izabrana tri reprezentativna derivata GFNS dobijena modifikacijom FNS nanočestica GOPTMS-om u trajanju od 1 h, 4 h i 24 h na koje je imobilisana CRL kako bi se utvrdio uticaj koncentracije uvedenih epoksi grupa na koncentraciju imobilisane aktivnosti lipaze. Dobijeni rezultati (slika 4.3. (B)) indikuju da je, u pogledu koncentracije imobilisane aktivnosti lipaze, modifikacija nosača duža od 1 h i koncentracija grupa veća od 450 $\mu\text{mol/g}$ neefektivna. Skoro tri puta veća koncentracija imobilisane aktivnosti je dobijena prilikom imobilizacije na nanočestice modifikovane 1 h, iako je na njima koncentracija epoksi grupa upola manja nego na nanočesticama koje su modifikovane 4 h i 24 h. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da visoke koncentracije reaktivnih epoksi grupa na površini nosača pospešuju „multi-point“ kovalentnu imobilizaciju koja u određenim slučajevima doprinosi stabilnosti imobilisanog enzima, ali u nekim slučajevima može da dovede do neželjenih konformacionih promena u molekulima enzima što dovodi do smanjenih koncentracija imobilisane aktivnosti enzima.^{5, 10, 13} Za dalje eksperimente je izabrano da je optimalno vreme modifikacije nanočestica silike GOPTMS-om 1 h.

4.1.2.3. Optimizacija uslova modifikacije nanočestica silike fenilamino-organosilanom

Pošto se lipaze karakterišu velikim afinitetom prema hidrofobnim nosačima, u poređenju sa drugim enzimima, modifikacija nanočestica silike trimetoksi(2-fenilpropil)silanom (PAPMS-om) je rađena u smeru povećanja hidrofobnosti njihove površine uvođenjem odgovarajućih funkcionalnih grupa. Organosilan PAPMS ima hidrofobnu fenilamino grupu na jednom svom kraju i tri hidrazibilne metoksi grupe na drugom kraju. Nakon modifikacije nanočestica silike na njihovu površinu su uvedene fenilamino grupe (šema 4.4.). Za fenilamino grupu se hidrofobnim interakcijama mogu vezati molekuli enzima.

Adsorpcija stvaranjem hidrofobnih interakcija sa nosačem je jedna od najkorišćenijih tehnika za imobilizaciju pre svega lipaza.¹⁷⁶ Usled hidrofobne prirode dela molekula lipaze koji okružuje aktivno mesto i „poklopca“ koji ga prekriva, lipaza adsorbuje na nosače stvaranjem hidrofobnih interakcija u „otvorenoj“ konformaciji zbog čega je aktivnija od slobodnog enzima.¹⁷⁷

Reakcija modifikacije nanočestica silike PAPMS-om je izvedena na isti način kao i modifikacija pomoću APTMS-a. Korišćen je maseni odnos FNS:PAPMS 1:1, reakcija je trajala 48 h i izvođena je u inertnoj atmosferi.

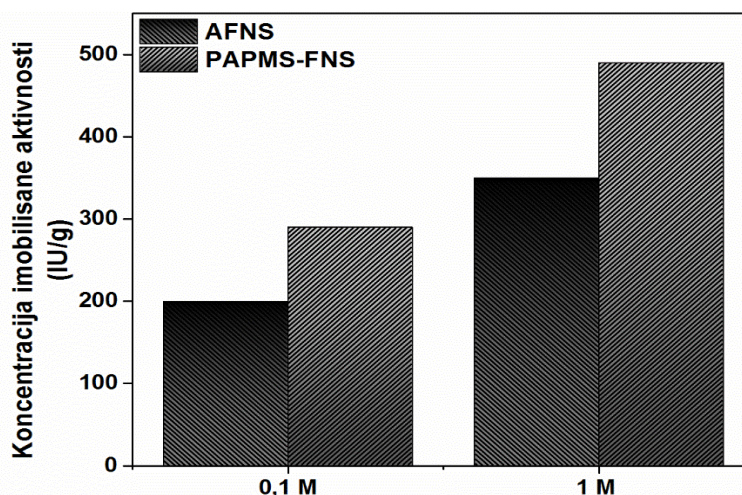


Šema 4.4. Procedura modifikacije nanočestica silike PAPMS-om.

Adekvatnost dobijenih fenilamono-modifikovanih nanočestica pod ovim eksperimentalnim uslovima za primenu u imobilizaciji enzima je proverena imobilizacijom lipaze u 0,1 M i 1 M puferu (pH 7) pri čemu je određivan najvažniji parametar imobilizacije koncentracija imobilisane aktivnosti (slika 4.4.).

Dobijene vrednosti za koncentraciju imobilisane aktivnosti lipaze na PAPMS-om modifikovane nanočestice su upoređenje sa koncentracijama imobilisane aktivnosti dobijenim prilikom imobilizacije lipaze na nanočestice silike modifikovane APTMS-om radi procene kakav uticaj stepen hidrofobnosti modifikovane površine nanočestica silike ima na mehanizam adsorpcije lipaze.

Najveću koncentraciju imobilisane aktivnosti od 490 IU/g ima lipaza na nanočesticama modifikovanim PAPMS-om u 1 M puferu. U 0,1 M puferu koncentracija imobilisane aktivnosti iznosi 300 IU/g. Veća koncentracija imobilisane aktivnosti lipaze u 1 M se može objasniti činjenicom da se pri velikoj jonskoj jačini favorizuje stvaranje hidrofobnih interakcija dok su elektrostatičke interakcije suzbijene.



Slika 4.4. Koncentracija imobilisane aktivnosti lipaze na PAPMS-FNS i AFNS.

Eksperimentalni uslovi imobilizacije: 0,1 i 1 M fosfatni pufer pH 7; inicijalna koncentracija proteina 500 mg/g; vreme 3 h.

S obzirom da je cilj modifikacije nanočestica silike PAPMS-om uvođenje fenilamino grupa radi uspostavljanja hidrofobnih interakcija između lipaze i ovih nanočestica ostvarene veće koncentracije imobilisane aktivnosti na FNS-PAPMS nanočesticama u odnosu na AFNS potvrđuju da lipaza ima veći afinitet ka hidrofobnim nosačima kao i da primenjena modifikacija pospešuje imobilizaciju lipaze u aktivnoj konformaciji.

4.1.3. Karakterizacija funkcionalizovanih nanočestica silike

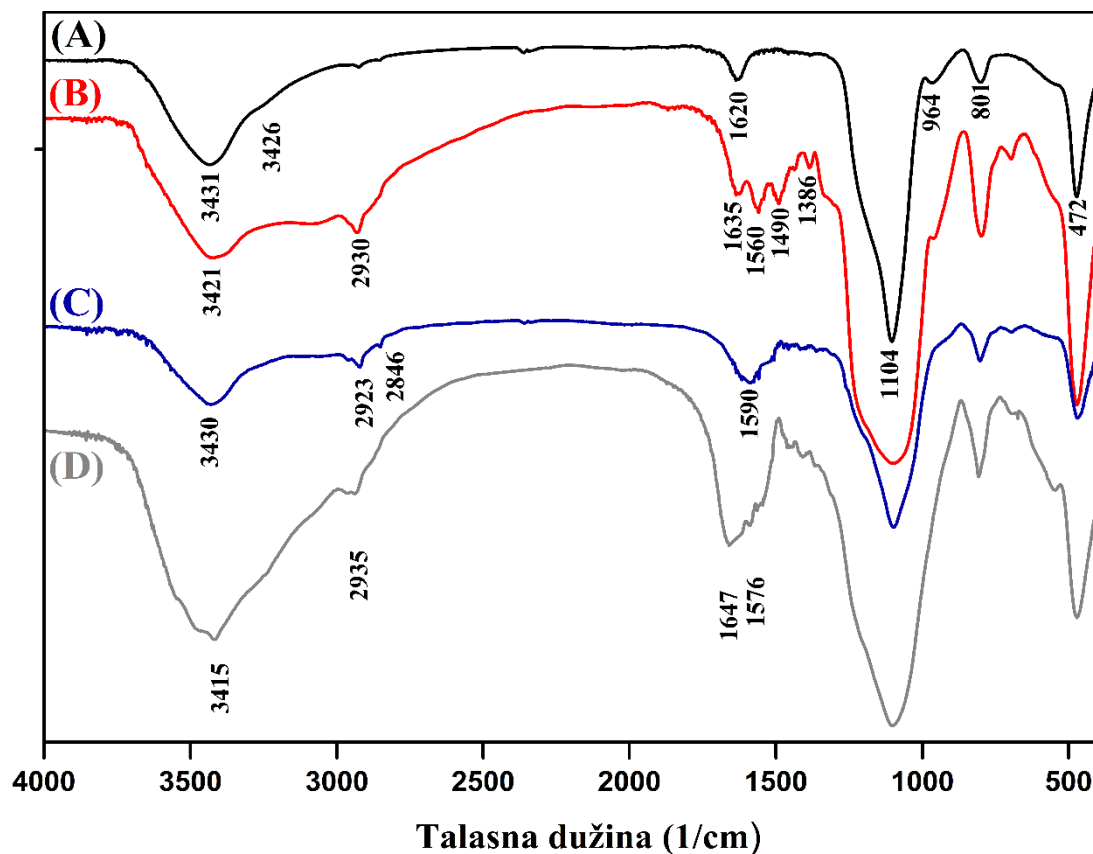
4.1.3.1. Karakterizacija amino-modifikovanih nanočestica silike

4.1.3.1.1. FTIR analiza modifikovanih nanočestica

Nakon optimizacije uslova modifikacije i aktivacije, struktura nemodifikovanih (FNS), amino-modifikovanih (AFNS) i cijanuril-hloridom aktiviranih amino-modifikovanih (CCAFNS) nanočestica silike je analizirana FTIR spektroskopijom. Poređenjem FTIR spektara modifikovanih nanočestica sa nemodifikovanim moguće je utvrditi da li su na površinu nanočestica uspešno uvedene amino, odnosno hloridne grupe. Takođe, snimljen je i FTIR spektar imobilisane lipaze na CCAFNS kako bi se utvrdilo da li je došlo do stvaranja kovalentnih veza između ovih nanočestica i enzima. Dobijeni FTIR spektri su prikazani na slici 4.5.

Spektar nemodifikovanih nanočestica silike prikazan na slici 4.5. (A) ima sve karakteristične apsorpcione trake. Apsorpciona traka koja se javlja na 3431 cm^{-1} sa prevojem na 3426 cm^{-1} i apsorbciona traka na 946 cm^{-1} su posledica valencionih vibracija

OH grupa molekula vode. Apsorpcioni maksimum na 1620 cm^{-1} nastao je usled deformacionih vibracija adsorbovanih molekula vode na površini FNS. Veoma izražena, jaka i široka apsorpciona traka na 1140 cm^{-1} sa prevojem na 1190 cm^{-1} , traka na 801 i traka na 472 cm^{-1} su posledica asimetričnih valencionih, simetričnih valencionih i deformacionih vibracija Si-O-Si grupe, redom.¹⁷⁴



Slika 4.5. FTIR spektri: nemodifikovanih nanočestica silike (FNS) (A), amino-modifikovanih nanočestica silike (AFNS) (B), cijanuril-hloridom aktiviranih amino-modifikovanih nanočestica silike (CCAFNS)(C) i imobilisane CRL na CCAFNS (D).

Ako uporedimo spektre (A) i (B) prikazane na slici 4.5. može se uočiti promena na spektru AFNS (B) koja jasno ukazuje da je došlo do pojave funkcionalnih grupa molekula APTMS-a na površini FNS nanočestica nakon modifikacije. Absorpcione trake na 3421 i 1635 cm^{-1} su posledica valencionih vibracija NH_2 grupa. Dve nove apsorpcione trake na 1560 i 1490 cm^{-1} potiču od NH_2 deformacionih vibracija i indikacija su prisustva slobodnih amino grupa na površini amino-modifikovanih silika nanočestica.³¹ Apsorpcioni maksimum na 2930 cm^{-1} nastao je od C-H simetričnih valencionih vibracija. Takođe, apsorpcioni maksimum na 1386 cm^{-1} nastao je od vibracija Si-C veze. Sve ove

apsorpcione trake koje su prisutne na AFNS spektru (4.5. (B)) potvrđuju da je modifikacija površine nanočestica silike APTMS-om uspešna i da su dobijene AFNS nanočestice prekrivene slobodnim amino grupama.

Spektar cijanuril-hloridom aktiviranih amino-modifikovanih nanočestica silike (CCAFNS) je prikazan na slici 4.5. (C). Na ovom spektru se može videti odsustvo traka koje su karakteristične za prisustvo slobodnih amino grupa, a koje su bile prisutne na AFNS spektru (4.5. (B)) pa se može reći da je aktivacija cijanuril-hloridom pod prethodno optimizovanim uslovima bila uspešna i da su amino grupe nagradile monosupstituisane derivate *s*-triazinskog prstena. Prisustvo *s*-triazinskog prstena na površini CCAFNS nanočestica je potvrđeno apsorpcionom trakom na 1608 cm^{-1} koja je nastala usled valencionih vibracija C=N grupa vezanog cijanuril-hlorida.¹⁷⁸ Apsorpcione trake valencionih vibracija C-Cl veze cijanuril-hlorida se očekuju na $1100\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$, ali zbog prisustva jako široke apsorpcione trake koja nastaje usled valencionih vibracija Si-O-Si grupa na ovom spektru se ne vide.

Kako bi ustanovili da li je došlo do kovalentne imobilizacije CRL na CCAFNS snimljen je spektar koji je prikazan na slici 4.5. (D). Spektar 4.5. (D) jasno pokazuje da je lipaza vezana za površinu CCAFNS i to trakama na $1647\text{ i }1576\text{ cm}^{-1}$ koje su nastale usled valencionih vibracija C=O veze (amidna I traka) i deformacionih vibracija NH grupa (amidna II traka) peptidnih grupa enzima.

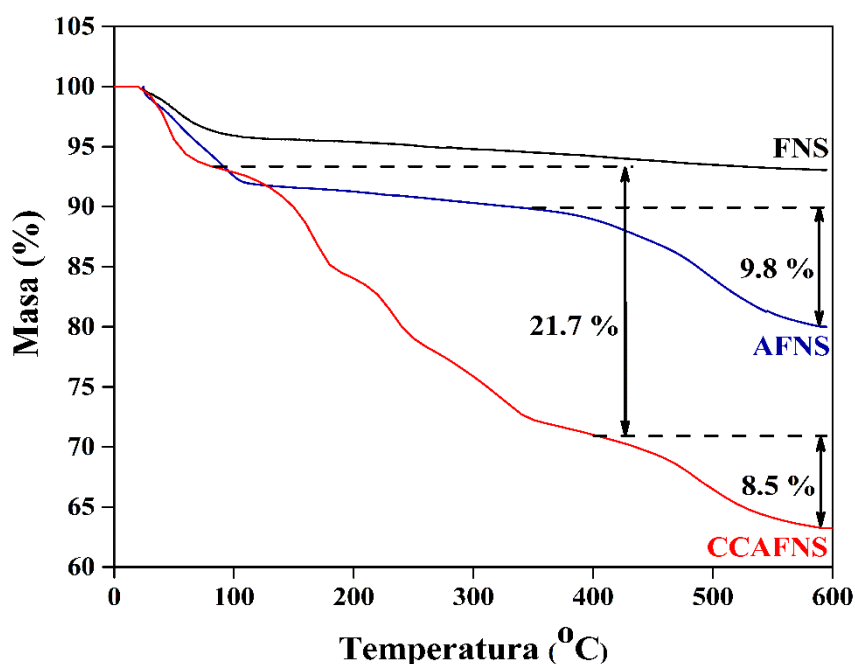
4.1.3.1.2. TGA analiza modifikovanih nanočestica

Uspešnost modifikacije i aktivacije nanočestica silike je potvrđena i TGA analizom. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.6.

TGA krive koje su prikazane na slici 4.6., a odnose se na FNS i AFNS razlikuju se neznatno u temperaturnom opsegu od $350\text{ do }550\text{ }^{\circ}\text{C}$, gubitak mase od $9,8\%$ je nastao usled dekompozicije aminopropil grupa uvedenih na površinu FNS nanočestica nakon modifikacije APTMS-om.¹⁷⁹

TGA kriva CCAFNS nanočestica, pored već pomenutog gubitka mase od $9,8\%$ u temperaturnom opsegu od $300\text{ do }550\text{ }^{\circ}\text{C}$, pokazuje i značajan gubitak mase od $21,7\%$ na temperaturi od $100\text{ do }350\text{ }^{\circ}\text{C}$ koji je posledica dekompozicije cijanuril-hlorida na površini AFNS nanočestica uvedenog nakon reakcije aktivacije. Činjenica da se dekompozicija vezanog cijanuril-hlorida dešava sporije i na višim temperaturama u odnosu

na slobodan cijanuril-hlorid potvrđuje da je veza između cijanuril-hlorida i amino grupa enzima formirana.¹⁸⁰



Slika 4.6. TGA analiza FNS, AFNS i CCAFNS nanočestica.

Interesantno je još zapaziti da je prisustvo kompleksnih interakcija u ovako heterogenom sistemu i usled velikog uticaja površine silika nanočestica na *s*-triazinski prsten vezanog cijanuril-hlorida dovelo do pojave višestepenog degradacionog mehanizma prilikom TGA analize.

4.1.3.2. Karakterizacija epoksi-modifikovanih nanočestica silike

4.1.3.2.1. FTIR analiza epoksi-modifikovanih nanočestica silike

Uspešnost modifikacije nanočestica silike epoksi-organosilanom je takođe analizirana FTIR spektroskopijom. Poređenjem FTIR spektara epoksi-modifikovanih nanočestica sa nemodifikovanim moguće je utvrditi da li su na površinu nanočestica uspešno uvedene epoksi grupe (slika 4.7.). Takođe, snimljen je i FTIR spektar imobilisane lipaze na GFNS kako bi se utvrdilo da li je došlo do stvaranja kovalentnih veza između ovih nanočestica i enzima.

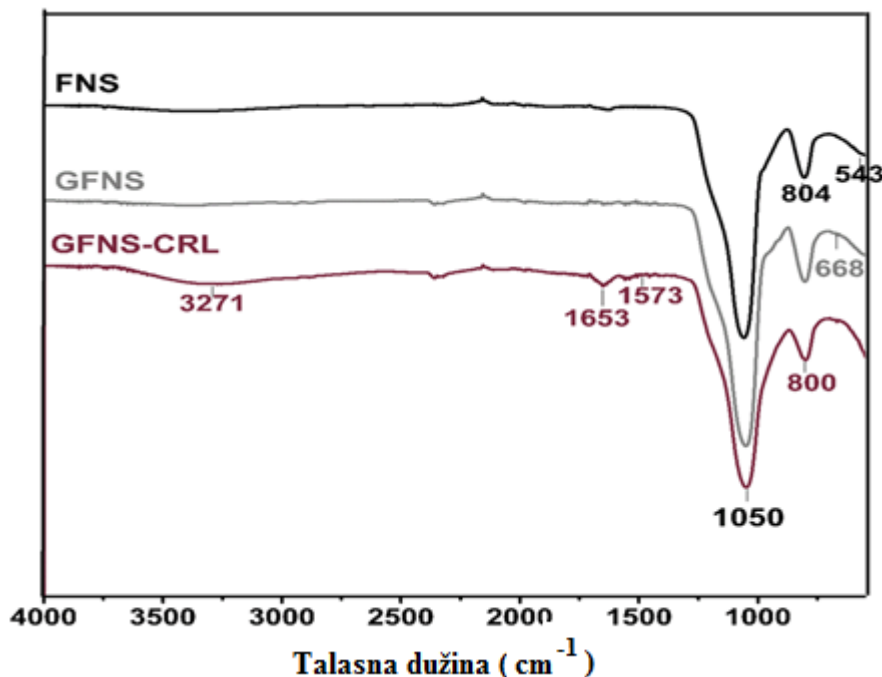
Na prvom spektru koji je predstavljen na slici 4.7. i koji je indentičan spektru (A) na slici 4.5. nalaze se sve karakteristične apsorpcione trake za nemodifikovane nanočestice silike (apsorpciona traka na 1050 cm^{-1} , traka na 804 cm^{-1} i traka na 543 cm^{-1}).¹⁷⁴

Ako uporedimo spektre nanočestica silike i epoksi-modifikovanih nanočestica silike (drugi spektar prikazan na slici 4.7.) može se uočiti da nema promena na spektru GFNS

u odnosu na FNS spektar, što jasno ukazuje da FTIR analiza nije adekvatna metoda za analizu uspešnosti epoksi-modifikacije nanočestica silike.

Na osnovu literaturno dostupnih podataka poznato je da se karakteristične apsorbcione trake koje indikuju prisustvo slobodnih epoksi grupa pojavljuju na 915 cm^{-1} i 3050 cm^{-1}

181



Slika 4.7. FTIR spektri nanočestica silike, epoksi-modifikovanih nanočestica silike (GFNS) i lipaze imobilisane na nanočestice silike.

Apsorpciona traka na 915 cm^{-1} je posledica deformacionih vibracija C-O grupa, dok je traka na 3050 cm^{-1} posledica valencionih vibracija C-H grupa koje čine epoksidni prsten. Međutim, zbog veoma široke trake na 1100 cm^{-1} , koja je posledica prisustva Si-O-Si grupa u osnovi strukture nanočestica silike, traka na 915 cm^{-1} karakteristična za epoksi grupe je preklopljena i ne može se videti na GFNS spektru. Takođe, traka na 3050 cm^{-1} je veoma malog intenziteta i najčešće je preklopljena jakom trakom OH grupa prisutnih na površini silika nanočestica.

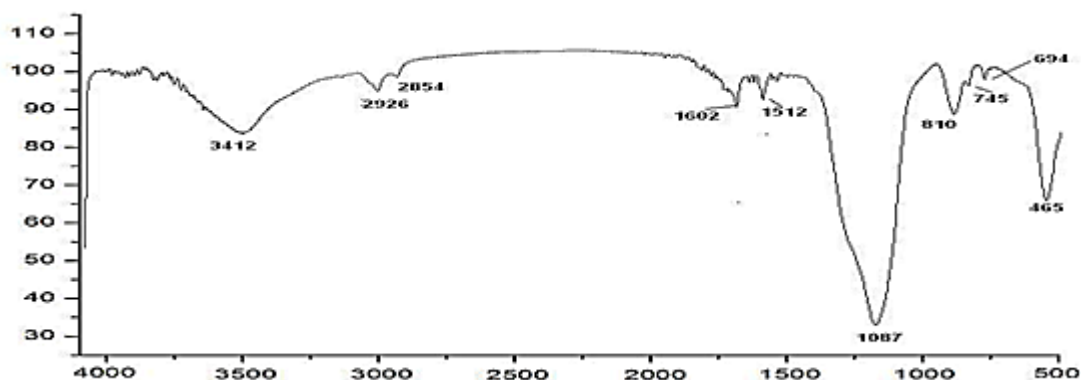
Dodatno je snimljen spektar imobilisane lipaze na GFNS nanočestice koji je prikazan kao treći na slici 4.7. Ovaj spektar jasno pokazuje da je lipaza vezana za površinu GFNS kao i na površinu CCAFNS (slika 4.5. (D)) i to trakama na 1653 i 1576 cm^{-1} koje su nastale usled valencionih vibracija C=O veze (amidna I traka) i deformacionih vibracija NH grupa (amidna II traka) peptidnih grupa enzima.

4.1.3.3. Karakterizacija nanočestica silike modifikovanih fenilamino-organosilanom

4.1.3.3.1. FTIR analiza fenilamino-modifikovanih nanočestica silike

Nakon reakcije modifikacije PAPMS-om struktura dobijenih nanočestica je proučavana FTIR-spektroskopijom (slika 4.8.).

Na spektru prikazanom na slici 4.8. se vide karakteristične apsorbcione trake za strukturu silika nanočestica (1087 , 810 , i 465 cm^{-1}) koje su prisutne i na spektru nemodifikovanih nanočestica silike prikazanom na slikama 4.5. i 4.7. Trake na 1602 cm^{-1} i 1512 cm^{-1} se javljaju kao posledica asimetričnih i simetričnih valencionih vibracija sp^2 hibridizovanih ugljenikovih atoma fenilnog jezgra, dok je traka na 694 cm^{-1} posledica deformacionih vibracija ovih ugljenikovih atoma.



Slika 4.8. FTIR spektar fenilamino-modifikovanih nanočestica silike.

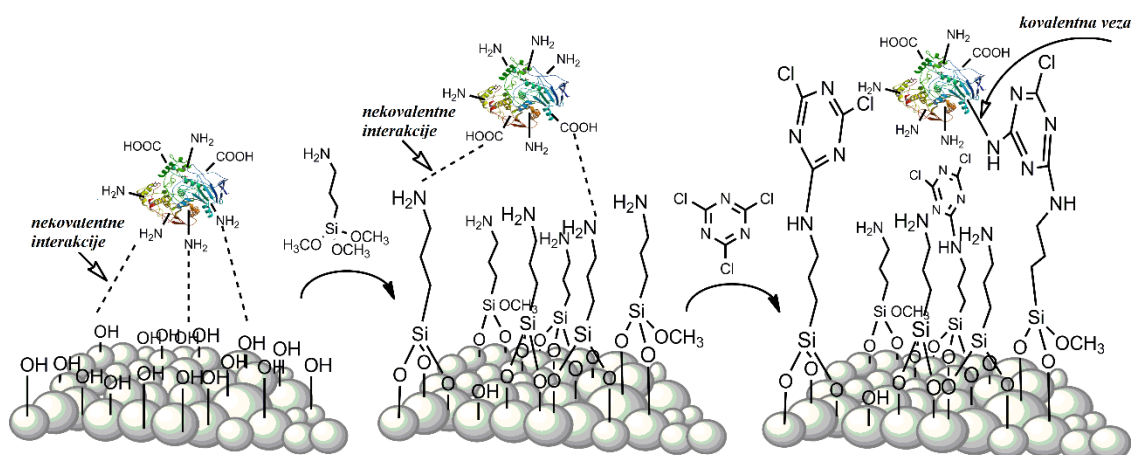
Ove tri karakteristične apsorpcione trake dokaz su prisustva monosupstituisanog fenilnog jezgra na površini PAPMS-om modifikovanih nanočestica silike. Apsorbcione trake na 2922 i 2844 cm^{-1} su posledica asimetričnih odnosno simetričnih deformacionih vibracija sp^3 hibridizovanih ugljenikovih atoma propil grupa preko kojih je fenilamino grupa vezana za površinu nanočestica silike.¹⁸² Široka apsorbciona traka na 3412 cm^{-1} govori o prisustvu slobodnih amino grupa vezanih za fenilno jezgro.¹⁸³ Na osnovu analize FTIR spektra PAPMS-om modifikovanih silika nanočestica može se konstatovati da je modifikacija bila uspešna i da su na površinu ovih nanočestica uvedene slobodne fenilamino grupe.

4.2. Imobilizacija lipaze na funkcionalizovane nanočestice silike

4.2.1. Imobilizacija lipaze na amino-modifikovane nanočestice silike

Nakon optimizacije uslova reakcije modifikacije APTMS-om i aktivacije amino-modifikovanih silika nanočestica cijanuril-hloridom kao i karakterizacije dobijenih modifikovanih nanočestica pristupljeno je optimizaciji imobilizacije lipaze kako na nemođifikovane tako i na modifikovane nanočestice silike (šema 4.5.).

Optimizacija imobilizacije lipaze je izvedena variranjem početne koncentracije proteina (izražene po g nanočestica) kao i variranjem jonske jačine pufera koji je korišćen za imobilizaciju. Praćeni su parametri imobilizacije: koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nanočestica), koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g), prinos imobilizacije proteina (%), prinos imobilizacije aktivnosti (%) i specifična aktivnost imobilisane lipaze (IU/mg proteina)) u toku vremena. Imobilizacija je izvođena na temperaturi od 25 °C u fosfatnom puferu pH 7 po proceduri koja je opisana u poglavlju 3.2.3.1.



Šema 4.5. Šematski prikaz imobilizacije lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice.

4.2.1.1. Adsorpcija lipaze na nanočestice silike

Prvo je analiziran proces adsorpcije lipaze na modifikovane i nemođifikovane nanočestice silike praćenjem koncentracije imobilisanih proteina. Primenjene su jednačine koje opisuju kinetiku procesa adsorpcije, kao i adsorpcione izoterme u cilju boljeg razumevanja procesa imobilizacije lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS, procene stepena imobilizacije u vremenu kao i radi definisanja prirode imobilizacionog procesa. Kinetika adsorpcije u sistemu tečno-čvrsto može biti pod kontrolom nekoliko nezavisnih procesa kao što su spoljašnja difuzija, unutrašnja difuzija, hemijska reakcija i dr.

Za određivanje kinetike adsorpcije lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice dobijene vrednosti za koncentraciju imobilisane lipaze su fitovane reakciono/difuzionim kinetičkim modelom pseudo-prvog reda koji pretpostavlja da je brzina adsorpcije proporcionalna broju slobodnih mesta za vezivanje na adsorbentu. Ovaj model se može opisati na osnovu Lagergrenove jednačine ¹⁸⁴ i njen nelinearni oblik glasi:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (4.1)$$

gde je q_e -ravnotežna koncentracija adsorbovanog enzima (mg/g), q_t -koncentracija adsorbovanog enzima u bilo kojem vremenu t , k_1 -konstanta brzine adsorpcije pseudo-prvog reda (1/min) i t -vreme trajanja adsorpcije (min).

Primenljivost ovog modela na eksperimentalne podatke je procenjivana na osnovu koeficijenta korelacije R^2 i prosečne relativne greške (na engl. *Average relative error* (ARE)) koja je računata po formuli:

$$ARE(\%) = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{q_t^{exp} - q_t^{teo}}{q_t^{exp}} \right|, \quad (4.2)$$

gde je N -ukupan broj uzoraka, q_t^{exp} , q_t^{teo} su eksperimentalne odnosno teorijske koncentracije imobilisanog enzima na nanočestice (mg/g).

Što je vrednost koeficijenta korelacije veća, tj. bliža jedinici, a vrednost prosečne relativne greške manja, to je slaganje bolje, odnosno može se reći da se adsorpcija odigrava po matematičkom modelu sa najvišim koeficijentom korelacije.

Nosači koji se koriste za imobilizaciju imaju limitiranu površinu na koju mogu da se adsorbuju enzimi. Koncentracija imobilisanih proteina zavisi od veličine molekula enzima, specifične površine nosača i broja aktivnih mesta za vezivanje enzima. Površina dostupna proteinu za vezivanje i ravnotežno ponašanje sistema tečno-čvrsto zavise od fizičkih i strukturnih karakteristika nosača koji se koristi za imobilizaciju (kao što su npr. poroznost, specifična površina, veličina pora i dr.) kao i od fizičkih i hemijskih karakteristika enzima.

Iz ovih razloga nakon utvrđivanja kinetike adsorpcije, ispitivani su ravnotežni parametri adsorpcije lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice i „fitovani“ pomoću Langmirovog (Langmuir) i Frojndlihovog (Freundlich) modela za adsorpcionu izotermu. Modeli adsorpcionih izoterma mogu da pruže uvid da li dolazi do promena na površini čestica tokom modifikacije.

Langmirova izoterma se bazira na pretpostavci da postoji tačan broj aktivnih mesta koja su homogeno raspoređena na površini adsorbata za koje mogu da se vežu molekuli adsorbensa. Ova aktivna mesta imaju isti afinitet ka adsorpciji monomolekulskog sloja i ne postoji interakcija između adsorbovanih molekula. Drugim rečima, prema ovom modelu na površini adsorbenta postoji tačno određen broj mesta za vezivanje molekula lipaze pri čemu dolazi do formiranja monomolekulskog sloja enzima na njihovoj površini. Nelinearni oblik Langmirove jednačine glasi ¹⁸⁵:

$$q_e = \frac{q_m b C_e}{1 + b C_e}, \quad (4.3)$$

gde je q_e -ravnotežna koncentracija imobilisanih proteina (mg/g), C_e -ravnotežna koncentracija proteina preostalih u rastvoru (mg/l), q_m -maksimalni kapacitet za formiranje kompletnog monosloja enzima na površini nanočestica pri uspostavljenoj ravnoteži (mg/g) i b -Langmirova ravnotežna konstanta (l/mg).

Dodatno, na osnovu separacionog koeficijenta (R_L) izvedenog na osnovu Langmirovog modela i koji glasi ¹⁸⁵:

$$R_L = \frac{1}{1 + q_m b C_0} \quad (4.4)$$

gde je C_0 -početna koncentracija proteina (mg/ml), može se utvrditi da li je adsorpcija favorizovana, nefavorizovana, ireverzibilna ili reverzibilna. Ako su vrednosti za $R_L > 1$ takva adsorpcija je nefavorizovana i reverzibilna, a ako je $0 < R_L < 1$ adsorpcija je favorizovana i ireverzibilna.

Frojnđlihov model izoterme je empirijski model koji opisuje adsorpciju enzima na heterogenu površinu nosača kroz formiranje više slojeva molekula enzima i pogodan je za veći opseg početnih koncentracija adsorbata.

Frojnđlihov model je definisan jednačinom¹⁸⁵:

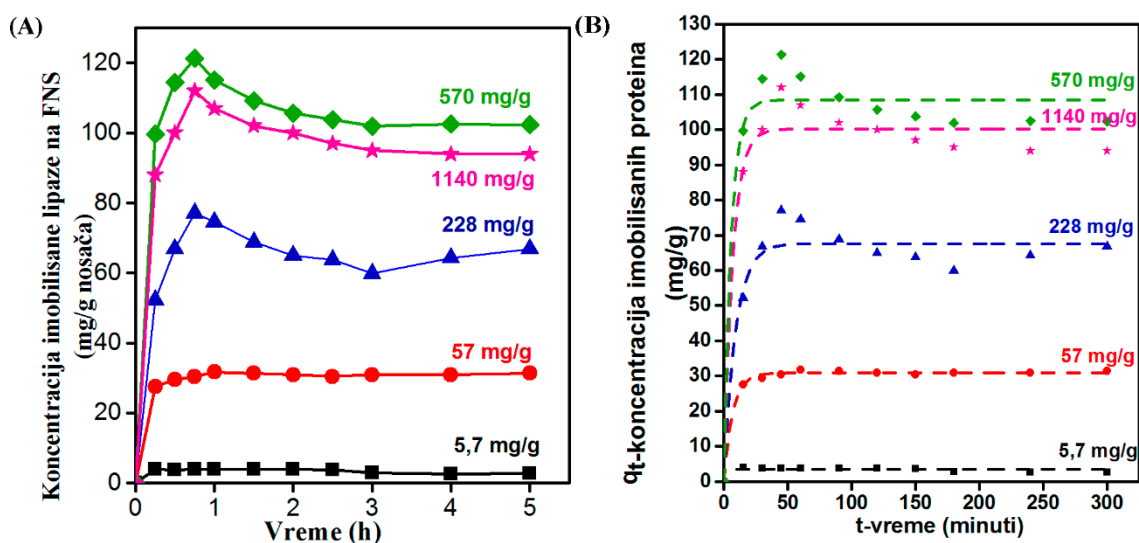
$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (4.5)$$

gde je q_e -ravnotežna koncentracija imobilisanih proteina (mg/g), K_f -konstanta koja opisuje kapacitet adsorpcije na heterogeni nosač, $1/n$ - predstavlja raspodelu aktivnih mesta na nosaču, C_e -ravnotežna koncentracija molekula lipaze u rastvoru (mg/l).

4.2.1.1.1. Adsorpcija lipaze na FNS

Uticaj koji početna koncentracija proteina (mg/g nanočestica) ima na kinetiku vezivanja lipaze na FNS nanočestice predstavljen je na slici 4.9. (A).

Koncentracija imobilisanih proteina raste konstantno do početne koncentracije proteina od 570 mg/g nanočestica. Dalje povećanje do 1140 mg/g nanočestica ne dovodi do značajnog povećanja koncentracije imobilisanih proteina po g nanočestica. Adsorpcija enzima je veoma brza jer se veći deo enzima (od 70-90 %) vezao za prvih 15 minuta na površinu FNS nanočestica (slika 4.9. (A)). Maksimumi koncentracije imobilisanih proteina su dostignuti najkasnije nakon 45 minuta od početka imobilizacije, dok posle toga dolazi do uspostavljanja ravnoteže između imobilisanih i preostalih rastvorenih molekula enzima.



Slika 4.9. Kinetika vezivanja lipaze na FNS nanočestice (A). Krive nastale nakon „fitovanja“ dobijenih eksperimentalnih rezultata za kinetiku imobilizacije lipaze na FNS nanočestice kinetičkim modelom pseudo-prvog reda (B). Eksperimentalni uslovi imobilizacije: početna koncentracija proteina: 5,7; 57, 228, 570 i 1140 mg /g nanočestica; 0,1 M fosfatni pufer pH 7; vreme 0-5 h.

Uzrok ovakvom odvijanju procesa imobilizacije lipaze na FNS nanočestice leži u činjenici da na početku procesa imobilizacije postoji velika koncentracija enzima u rastvoru i velika slobodna specifična površina nanočestica za vezivanje enzima što povoljno utiče na brzinu procesa koji se u ovoj početnoj fazi pretežno odvija pod difuzionom kontrolom. Zasićenjem površine nanočestica enzimima sa vremenom smanjuje verovatnoću vezivanja enzima, a samim tim i ukupnu brzinu adsorpcije enzima na nanočestice.

Dobijene eksperimentalne vrednosti za kinetiku vezivanja lipaze na ove nanočestice su „fitovane“ kinetičkim modelom pseudo-prvog reda (jednačina 4.1.). Krive nastale

„fitovanjem“ su prikazane na slici 4.9. (B), dok su kinetički parametri dobijeni na osnovu ovog modela prikazani u Tabeli 4.1.

Prilikom upotrebe kinetičkog modela pseudo-prvog reda vrednosti koeficijenta korelacije (R^2) za sve početne koncentracije proteina kreću u opsegu od 0,9363 do 0,9980 što govori o dobrom poklapanju ovog modela sa dobijenim eksperimentalnim vrednostima za koncentraciju imobilisanih proteina u toku vremena (Tabela 4.1).

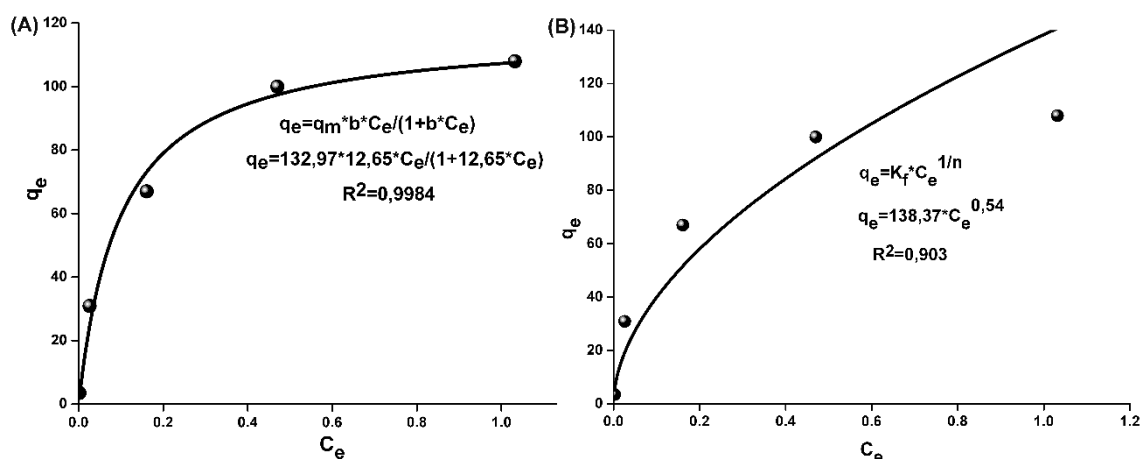
Tabela 4.1. Kinetički parametri imobilizacije lipaze na FNS.

<i>FNS</i>	<i>Kinetički model pseudo-prvog reda</i>			
<i>Početna koncentracija proteina (mg/g)</i>	k_1 (1/min)	q_e (mg/g)	R^2	ARE (%)
5,7	0,1577	3,52	0,9980	1,48
57	0,1430	30,91	0,9966	0,05
228	0,1085	67,60	0,9363	0,56
570	0,1447	100,19	0,9632	0,27
1140	0,1768	108,42	0,9596	0,29

Teorijske ravnotežne vrednosti koncentracije imobilisanih proteina (q_e , mg/g) koje se dobijaju primenom kinetičkog modela pseudo-prvog reda su bliske ostvarenim ravnotežnim vrednostima za koncentraciju imobilisanih proteina sa razlikom od 1-10 % za sve početne koncentracije proteina.

Na osnovu vrednosti R^2 i ARE prikazanih u Tabeli 4.1. može se zaključiti da adsorpcija lipaze na FNS nanočestice odgovara kinetičkom modelu pseudo-prvog reda što podrazumeva da je raspodela molekula lipaze na površini FNS nanočestica homogena i da je adsorpcija kontrolisana spoljašnjom difuzijom enzima do površine nanočestica. Dobijeno slaganje sa kinetičkim modelom pseudo-prvog reda prilikom adsorpcije lipaze na FNS je u skladu sa drugim studijama u kojima je lipaza imobilisana fizičkom adsorpcijom preko slabih van der Valsovih sila i vodoničnih veza na različite čestice.¹⁸⁶⁻

¹⁸⁸ U cilju utvrđivanja koja adsorpciona izoterma najbolje opisuje adsorpciju lipaze na FNS nanočestice primenjena su dva modela izoterma Langmirova i Frojndlihova (slika 4.10. ((A) i (B))).



Slika 4.10. Langmirova izoterma (A) i Frojndlihova izoterma (B) za adsorpciju lipaze na FNS nanočestice.

Vrednosti za parametre Langmirovog modela izoterme (q_m i b) iznose 132,97 mg/g odnosno 12,65 l/mg. Što znači da maksimalni kapacitet FNS nanočestica za formiranje monosloja lipaza na njihovoj površini iznosi 132,97 mg po g nanočestica. Prilikom primene ovog modela dobijena je visoka vrednost koeficijenta korelacije ($R^2=0,9984$), dok je pri „fitovanju“ Frojndlihovim modelom vrednost dobijenog koeficijenta korelacije dosta manja i iznosi $R^2=0,903$.

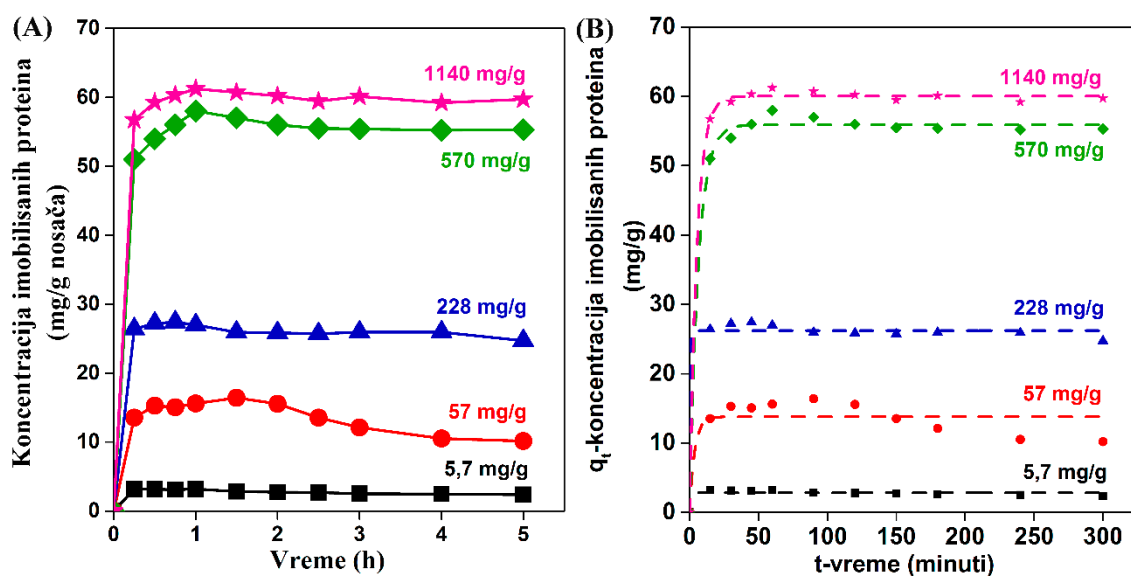
Dakle, može se usvojiti da se imobilizacija lipaze na FNS odigrava u skladu sa Langmirovim modelom, tj. lipaza se imobilize na FNS putem fizičke adsorpcije pri čemu dolazi do formiranja monosloja molekula lipaze na njihovoj površini. Izvedeni zaključci su u skladu sa literaturnim podacima koji objašnjavaju adsorpciju lipaze na više različitih nosača upravo po ovom modelu u vidu monosloja.^{188, 189} S obzirom da u slučaju adsorpcije lipaze na FNS nanočestice za sve početne koncentracije proteina R_L ima vrednost oko nule, možemo zaključiti da je adsorpcija lipaze na ove nanočestice favorizovana i irevezibilna.

Sumiranjem prethodno iznetih tvrdnji može se reći da se imobilizacija lipaze na FNS nanočestice odigrava u skladu sa kinetičkim modelom pseudo-prvog reda i da se maksimumi koncentracije imobilisanih proteina dostižu 45 minuta od početka imobilizacije nakon čega dolazi do uspostavljanja ravnoteže između imobilisanih molekula enzima i preostalih molekula u rastvoru. Lipaza se favorizovano na FNS čestice imobilize fizičkom adsorpcijom. Maksimalna koncentracija imobilisanih proteina od 108 mg/g se dostiže pri početnoj koncentraciji proteina od 1140 mg/g, a maksimalni kapacitet FNS nanočestica za vezivanje molekula lipaze iznosi 132,97 mg/g.

4.2.1.1.2. Adsorpcija lipaze na AFNS

Nakon izučavanja kinetike imobilizacije lipaze na FNS nanočestice proučavana je kinetika imobilizacije na amino-modifikovane FNS nanočestice (AFNS). Uticaj početne koncentracije proteina na kinetiku imobilizacije lipaze na AFNS nanočestice predstavljena je na slici 4.11.(A).

Kao i u slučaju imobilizacije lipaze na FNS nanočestice i prilikom imobilizacije lipaze na AFNS nanočestice koncentracija imobilisanih proteina raste konstantno sa porastom inicijalne koncentracije proteina do 570 mg/g nanočestica (slika 4.11. (A)). Povećanje početne koncentracije proteina do 1140 mg/g nanočestica dovodi do povećanja koncentracije imobilisanih proteina po g nanočestica od svega 5 %. Kinetika imobilizacije lipaze na AFNS nanočestice ima isti trend kao i pri imobilizaciji na FNS nanočestice što znači da se oko 90 % proteina veže u prvih 15 minuta, dok se ravnoteža uspostavlja nakon 45 minuta od početka imobilizacije.



Slika 4.11. Kinetika vezivanja lipaze na AFNS (A). Krive nastale nakon „fitovanja“ dobijenih eksperimentalnih rezultata za kinetiku imobilizacije lipaze na AFNS nanočestice modelom pseudo-prvog reda (B). Eksperimentalni uslovi imobilizacije: početna koncentracija proteina: 5,7; 57, 228, 570 i 1140 mg /g nanočestica; 0,1 M fosfatni pufer pH 7; vreme 0-5 h.

Isprekidane krive na slici 4.11. (B) su nastale kao rezultat „fitovanja“ eksperimentalnih vrednosti za koncentraciju imobilisanih proteina modelom pseudo-prvog reda. Dobijeni parametri modela su prikazani u Tabeli 4.2.

Prilikom upotrebe kinetičkog modela pseudo-prvog reda za „fitovanje“ eksperimentalnih rezultata kinetike imobilizacije lipaze na AFNS nanočestice vrednosti koeficijenta korelacije (R^2) za sve početne koncentracije proteina kreću se u opsegu od 0,977 do 0,9988 što govori o dobrom poklapanju ovog modela sa dobijenim eksperimentalnim vrednostima za koncentraciju imobilisanih proteina u toku vremena.

Tabela 4.2. Kinetički parametri imobilizacije lipaze na AFNS.

<i>AFNS</i>	<i>Kinetički model pseudo-prvog reda</i>			
<i>Početna koncentracija proteina (mg/g)</i>	<i>k₁ (1/min)</i>	<i>q_e (mg/g)</i>	<i>R²</i>	<i>ARE (%)</i>
5,7	4,15	2,83	0,987	1,1
57	0,277	13,8	0,977	2,6
228	2,51	26,21	0,9988	0,08
570	0,191	55,9	0,996	0,01
1140	0,176	60,03	0,9988	0,01

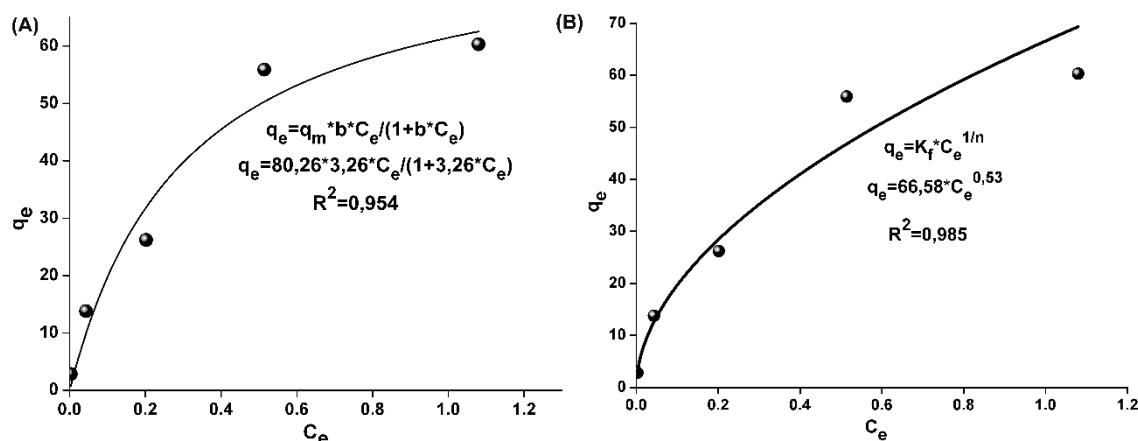
Teorijske vrednosti za ravnotežne koncentracije imobilisanih proteina (q_e , mg/g) koje se dobijaju primenom ovog kinetičkog modela se razlikuju od eksperimentalnih vrednosti za 1 %. Prosečna relativna greška (ARE) ima vrednosti od 0,01 do 1 %. Na osnovu vrednosti za R^2 i ARE može se reći da adsorpcija lipaze na AFNS nanočestice odgovara kinetičkom modelu pseudo-prvog reda.

Imobilizacija lipaze na AFNS nanočestice na osnovu modela pseudo-prvog reda podrazumeva da je homogena distribucija molekula enzima na površini AFNS nanočestica kao i da je kontrolisana difuzijom molekula enzima do površine AFNS nanočestica. Kao i u slučaju FNS nanočestica, lipaza se na AFNS nanočestice imobilizuje putem fizičke adsorpcije.

Langmirova i Frojndlihovala izoterma za adsorpciju lipaze na AFNS nanočestice je prikazana na slici 4. 12. (A) odnosno (B).

Vrednosti Langmirovih parametara q_m i b iznose 80,26 mg/g odnosno 3,26 l/mg. Koeficijent korelacije za ovaj model ima vrednost od 0,954.

Primenjen je i Frojndlihov model izoterme (slika 4.12. (B)), na osnovu koga se dobija da je maksimalni kapacitet AFNS nanočestica za vezivanje lipaze 66,58 mg/g, a vrednost koeficijenta $1/n$ iznosi 0,53. Koeficijent $1/n$ se odnosi na distribuciju i energetska jačinu aktivnih mesta na površini amino-modifikovanih nanočestica.



Slika 4.12. Langmirova izoterma (A) i Frojndlihova izoterma (B) za adsorpciju lipaze na AFNS nanočestice.

Koeficijent korelacije za ovaj model ima veću vrednost od 0,985 u odnosu na vrednost koeficijent korelacije za Langmirov model (0,954) pa se može konstatovati da je bolje slaganje eksperimentalnih vrednosti sa Frojndlihovim modelom. Znači da se adsorpcija lipaze na AFNS nanočestice odigrava u skladu sa Frojndlihovim modelom.

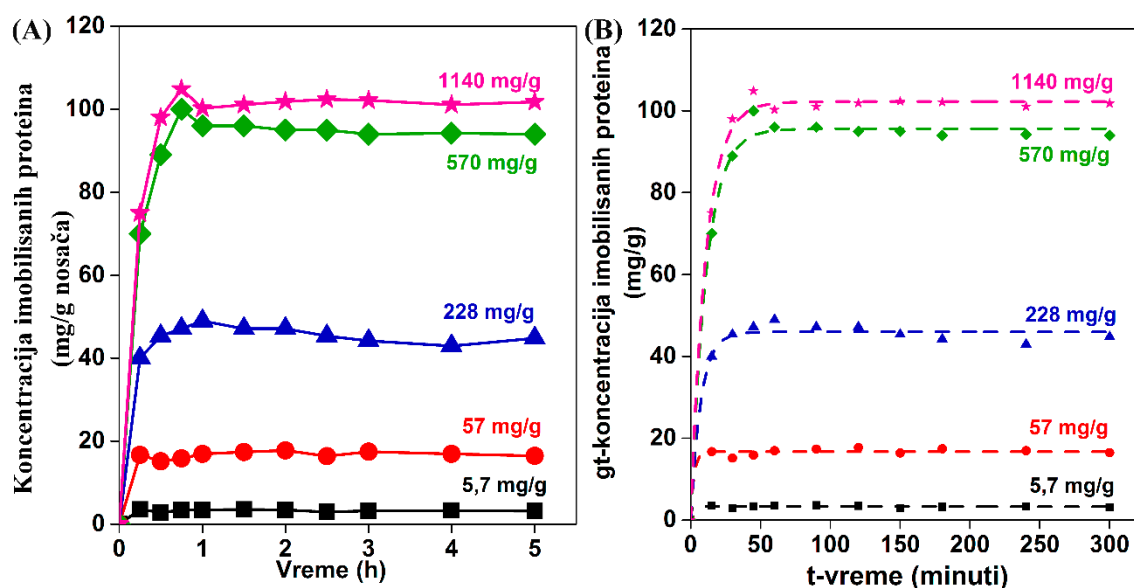
Ako dobijene rezultate za adsorpciju lipaze na AFNS uporedimo sa rezultatima dobijenim za adsorpciju lipaze na FNS koje se odvijaju po istom kinetičkom modelu uočava se da FNS nanočestice imaju 2 puta veći teorijski kapacitet za vezivanje ovog enzima kao i da je ostvarena maksimalna koncentracija imobilisanih proteina dva puta manja što znači da postoje razlike u mehanizmu adsorpcije lipaze na ove dve vrste nanočestica. Mora se istaći da je površina FNS nanočestica homogena za razliku od AFNS nanočestica koje nakon modifikacije pored uvedenih amino grupa imaju i neproreagovale silanol grupe. Verovatno je ovo i glavni razlog što Frojndlihov model koji dobro opisuje nosače sa heterogenom površinom odgovara više od Langmirovog modela u slučaju imobilizacije na AFNS nanočestice. Mehanizam adsorpcije lipaze na FNS i AFNS nanočestice biće diskutovan u poglavlju 4.2.1.2.2.

Na osnovu svih prethodno izloženih rezultata možemo zaključiti da se imobilizacija lipaze na AFNS nanočestice odigrava u skladu sa kinetičkim modelom pseudo-prvog reda

i da se maksimumi koncentracije imobilisanih proteina dostižu 45 minuta od početka imobilizacije nakon čega dolazi do uspostavljanja ravnoteže između imobilisanih molekula enzima i preostalih molekula u rastvoru. Maksimalna koncentracija imobilisanih proteina od 60,03 mg/g se dostiže pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 1140 mg/g.

4.2.1.1.3. Adsorpcija lipaze na CCAFNS nanočestice

Na isti način kao u prethodna dva slučaja analizirana je i imobilizacija proteina na CCAFNS. Iako je ovaj nosač konstruisan sa osnovnom namenom da omogući kovalentnu imobilizaciju enzima, mora se očekivati da će se proteini bar delimično i adsorbovati pošto su na površini nosača i neproreagovale primarne amino grupe, sekundarne amino grupe preko kojih je formirana veza sa cijanuril-hloridom i neproreagovale silanolne grupe (šema 4.5.). Kao i za FNS i AFNS nanočestice kinetika imobilizacije lipaze na CCAFNS je izučavana variranjem inicijalne koncentracije proteina (mg/g) i dobijeni rezultati su prezentovani na slici 4.13. (A). Sa povećanjem početne koncentracije proteina raste i koncentracija imobilisanih proteina na CCAFNS nanočestice (slika 4.13. (A)). S tim da povećanje početne koncentracije proteina iznad 570 mg/g dovodi do povećanja koncentracije imobilisanih proteina za manje od 5 %.



Slika 4.13. Kinetika imobilizacije lipaze na CCAFNS nanočestice (A). Krive nastale nakon „fitovanja“ dobijenih eksperimentalnih rezultata za kinetiku imobilizacije lipaze na CCAFNS nanočestice modelom pseudo-prvog reda (B). Eksperimentalni uslovi imobilizacije: početna koncentracija proteina: 5,7; 57, 228, 570 i 1140 mg/g nanočestica; 0,1 M fosfatni pufer pH 7; vreme 0-5 h.

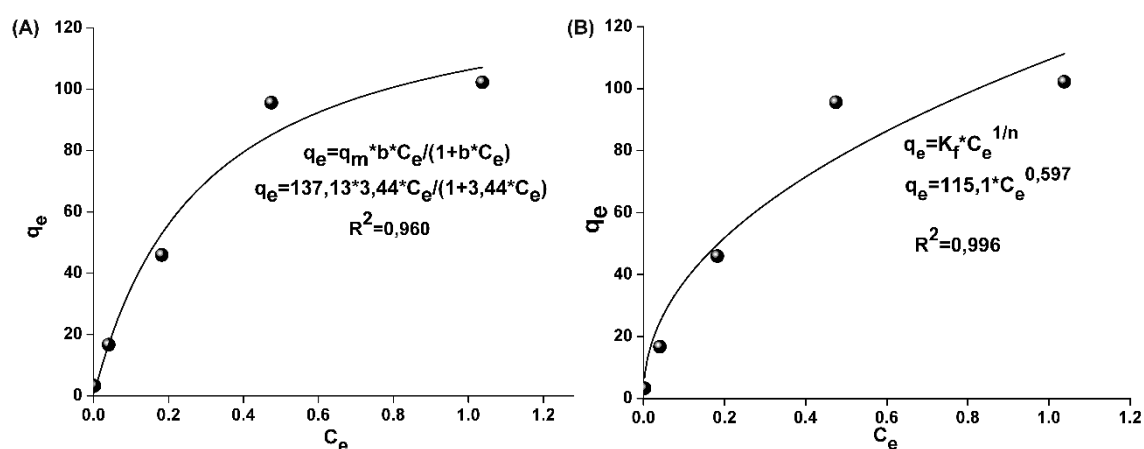
Kako bi odredili kinetički model imobilizacije lipaze na CCAFNS nanočestice dobijene eksperimentalne vrednosti su „fitovane“ modelom pseudo prvog reda (jednačina 4.1.). Prikazane isprekidane krive na slici 4.13. (B)) su nastale kao rezultat „fitovanja“ eksperimentalno dobijenih vrednosti za koncentraciju imobilisanih proteina modelom pseudo-prvog reda. Dobijeni parametri modela su predstavljeni u Tabeli 4.3. „Fitovanjem“ krivih koncentracija imobilisanih proteina-vreme sa kinetikom pseudo-prvog reda dobijaju se koeficijenti korelacije od 0,938 do 0,996. Ravnoteža između imobilisanih proteina i preostalih proteina u rastvoru se uspostavlja 45 minuta od početka imobilizacije. Ravnotežne koncentracije imobilisanih proteina predviđene modelom i eksperimentalno dobijene koncentracije imobilisanih proteina se razlikuju za manje od 5 % (Tabela 4.3.). Kako se i prosečna relativna greška (ARE) kreće u opsegu 0,14-1,66 možemo reći da je poklapanje eksperimentalnih vrednosti za koncentracije imobilisanih proteina sa vrednostima dobijenim nakon „fitovanja“ kinetikom pseudo-prvog reda zadovoljavajuće. Zaključak je da se imobilizacija lipaze na CCAFNS nanočestice odigrava u skladu sa kinetikom pseudo-prvog reda.

Tabela 4.3. Kinetički parametri imobilizacije lipaze na CCAFNS.

<i>CCAFNS</i>	<i>Kinetički model pseudo-prvog reda</i>			
<i>Koncentracija ponuđenih proteina (mg/g)</i>	<i>k₁ (1/min)</i>	<i>q_e (mg/g)</i>	<i>R²</i>	<i>ARE (%)</i>
5,7	2,62	3,28	0,938	0,5
57	0,418	16,69	0,976	0,14
228	0,137	45,96	0,984	1,66
570	0,09	95,63	0,993	0,04
1140	0,0925	102,25	0,996	0,15

Takođe, i za imobilizaciju lipaze na CCAFNS ispitivano je koji model adsorpcione izoterme najviše odgovara eksperimentalno dobijenim vrednostima. Langmirova i Frojndlihova izoterma za adsorpciju lipaze na CCAFNS su prikazane na slici 4.14.

Kao i u slučaju adsorpcije lipaze na AFNS nanočestice i u ovom slučaju se pokazalo da Langmirov model ne odgovara vezivanju lipaze (slika 4.14. (A)). Koeficijent korelacije za ovaj model iznosi 0,96. Drugim rečima lipaza se za CCAFNS nanočestice ne vezuje u potpunosti fizičkom adsorpcijom u vidu monosloja. Na slici 4.14. (B) je prikazan Frojndlihov model adsorpcione izoterme za vezivanje lipaze na CCAFNS, na osnovu koga je dobijeno da je vrednost maksimalnog kapaciteta (K_f) CCAFNS nanočestica 115,1 mg/g, a da je vrednost konstante $1/n$ 0,597. Koeficijent korelacije za ovaj model iznosi 0,996 što je zadovoljavajuće slaganje eksperimentalnih vrednosti sa ovim modelom.



Slika 4.14. Langmirova izoterma adsorpcije lipaze na CCAFNS nanočestice (A).

Frojndlihova izoterma adsorpcije lipaze na CCAFNS nanočestice (B).

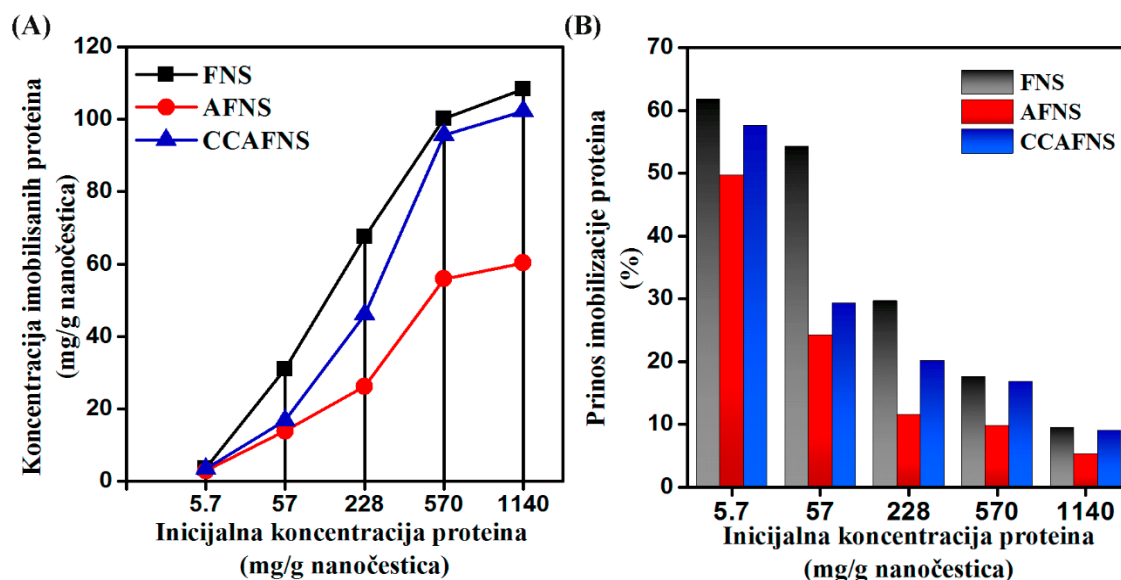
Nameće se zaključak da se imobilizacija lipaze na CCAFNS nanočestice odigrava mehanizmom hemijske adsorpcije i da se pri tom formira više slojeva enzima na površini ovih nanočestica. Pregledom dostupne literature pronađeno je još primera imobilizacije lipaze po Frojndlihovom modelu za adsorpcionu izotermu i to na heterogeni nosač EP-100¹⁸⁹ i na glutaraldehidom aktivirane hitozan čestice.¹⁸⁵ Još je značajno istaći da je imobilizacija lipaze na CCAFNS po Frojndlihovom modelu u skladu sa rezultatima za imobilizaciju lipaze na nosače aktivirane cijanuril-hloridom koje su objavili u svojoj studiji Moreno i sar.¹⁹⁰ U ovoj studiji je dokazano da se na cijanuril-hloridom aktivirane nosače imobilizacija enzima odigrava mehanizmom hemijske adsorpcije i to formiranjem više slojeva enzima na njihovoj površini.

Na kraju se može zaključiti da se imobilizacija lipaze na CCAFNS nanočestice odigrava u skladu sa kinetičkim modelom pseudo-prvog reda i da se maksimumi koncentracije imobilisanih proteina dostižu 45 minuta od početka imobilizacije nakon čega dolazi do

uspostavljanja ravnoteže između imobilisanih molekula enzima i preostalih molekula u rastvoru. Lipaza se favorizovano na CCAFNS čestice imobilise hemijskom adsorpcijom. Maksimalna koncentracija imobilisanih proteina od 102 mg/g se dostiže pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 1140 mg/g.

4.2.1.1.4. Poređenje efikasnosti imobilizacije proteina na FNS, AFNS i CCAFNS

Najveći kapacitet od 108,42 mg/g za vezivanje lipaze imaju nemođifikovane nanočestice silike, dok najmanji imaju amino-modifikovane nanočestice silike od 60,03 mg/g (slika 4.15. (A)). Drastično smanjenje kapaciteta nosača nakon modifikacije ukazuje na promenu mehanizma imobilizacije enzima. Očigledno je da se modifikacijom menja naelektrisanje površine nosača (šema 4.5.).



Slika 4.15. Kapacitet FNS, AFNS i CCAFNS nanočestica za vezivanje lipaze (A). Prinos imobilizacije proteina na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice (B).

Visoka koncentracija amino grupa na površini nosača (slika 4.1.), verovatno ometa formiranje interakcija između grupa na površini enzima i preostalih nemođifikovanih silanolnih grupa silike koje su bile ključne za imobilizaciju na FNS. Pored toga, uvođenje amino grupa, koje su u uslovima imobilizacije disosovane, nesporno dovodi do većeg uticaja elektrostatičkih uticaja (privlačnih ili repulzivnih) na efikasnost imobilizacije. Potrebno je napomenuti da se često dešava da koncentracija imobilisanih proteina nije proporcionalna dobijenim koncentracijama imobilisane aktivnosti enzima jer njihova specifična aktivnost zavisi od mikrookoline, orijentacije, konformacione fleksibilnosti i koncentracije imobilisanog enzima, pa će zaključci o uticaju modifikacije na

imobilizaciju lipaze biti upotpunjeni analizom koncentracija imobilisanih aktivnosti enzima.

Prinos imobilizacije proteina na FNS, AFNS i CCAFNS, kao što je i očekivano, opada sa povećanjem početne koncentracije proteina (slika 4.15. (B)). Značaj ovog parametra u optimizaciji imobilizacije enzima zavisi od cene enzima i brzine imobilizacije. Ukoliko se imobilizuje skup enzim, mali prinos imobilizacije proteina ukazuje na neophodnost ponovne imobilizacije enzima iz supernatanta ako je neophodna ili visoka koncentracija imobilisanih proteina ili aktivnosti. S druge strane, ni sporo dostizanje visokog prinosa pri malim koncentracijama proteina nije poželjno rešenje jer nakon dužeg perioda može doći do značajnog smanjenja aktivnosti enzima u rastvoru.

Najveći prinos imobilizacije proteina je utvrđen za lipazu imobilisanu na FNS koji raste od 9,5 % do 61,5 % sa smanjenjem „ponuđene“ koncentracije proteina. Isti trend je primećen i pri imobilizaciji na modifikovane nosače, a maksimalne vrednosti prinosa imobilizacije proteina su 57,54 % na CCAFNS i 49,64 % na AFNS.

Dobijeni rezultati sugerišu da hemijski modifikovane nanočestice silike imaju dobre šanse za primenu u imobilizaciji enzima s obzirom da su ostvareni kapaciteti za vezivanje lipaze značajno veći u odnosu na veliki broj studija u kojima su za imobilizaciju korišćeni konvencionalni nosači.¹⁹¹

U studiji koju su objavili Li i sar.¹⁸⁰ lipaza imobilisana na polistirenske nosače sa porama veličine od 14,7 do 314 nm, maksimum od 25,2 mg/g imobilisane lipaze je postignut prilikom imobilizacije na čestice sa porama veličine 14,7 nm čija je ukupna specifična površina iznosila 745 m²/g čestica. Na čestice sa veličinom pora od 314 nm i specifičnom površinom od 19,3 m²/g vezalo svega 16,4 mg/g enzima.

Ako ovaj rezultat uporedimo sa FNS, AFNS i CCAFNS nanočesticama čija specifična površina iznosi 380 m²/g vidimo da je na njih imobilisano 5 puta više proteina. U studiji Minovske i sar.¹⁹² imobilisano je 15,7 mg lipaze iz *C. rugosa* na siliku veličine 0,1 mm što znači da je na AFNS imobilisano 4, na FNS 7 i na CCAFNS 8 puta više enzima. Prlainović i sar.¹⁹³ su ostvarili prilikom imobilizacije CRL na Sepabeads[®] EC-ER slične koncentracije imobilisanih proteina (oko 100 mg/g) kao što su dobijene prilikom imobilizacije ovog enzima na nanočestice silike korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji. Pored toga što su ovi rezultati potvrdili podobnost FNS, AFNS i CCAFNS nanočestica za korišćenje kao nosača za imobilizaciju enzima oni su još jednom istakli prednost

nanočestica u odnosu na čestice većih dimenzija, a to je pre svega odsustvo difuzionih limitacija koje se javljaju prilikom imobilizacije enzima u pore i veća površina dostupna enzimu za vezivanje.

U studijama koje se odnose na proučavanje imobilizacije enzima na nanomaterijale samo u nekoliko slučajeva su dobijene vrednosti koncentracije imobilisanih proteina veće nego pri imobilizaciji lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS i one su iznosile oko 250 mg/g nosača.^{162 194} U većini drugih studija vrednosti su značajno manje ili slične ostvarenim vrednostima na nanočestice silike i iznose od 37,6 do 129 mg/g nosača.^{31, 163-165, 195}

Ipak i pored svih do sada iznetih činjenica, za potpunu evaluaciju primenjivosti ovih nanočestica kao nosača za imobilizaciju lipaze i optimizaciju procesa imobilizacije potrebno je ispitati kakav uticaj koncentracija imobilisanih proteina ima na koncentraciju imobilisane aktivnosti lipaze.

4.2.1.2. Efikasnost imobilizacije enzimske aktivnosti lipaze na nanočestice silike

Ispitivan je uticaj početne koncentracije proteina i tipa nanočestica silike na osnovne parametre koji karakterišu efikasnost imobilizacije enzimske aktivnosti: koncentraciju imobilisane aktivnosti (IU/g) i specifičnu aktivnost (IU/mg proteina) dobijenih imobilisanih preparata. Koncentracija imobilisane aktivnosti CRL je određivana u reakciji hidrolize *p*-nitrofenil palmitata na način opisan u poglavlju 3.2.4.1.

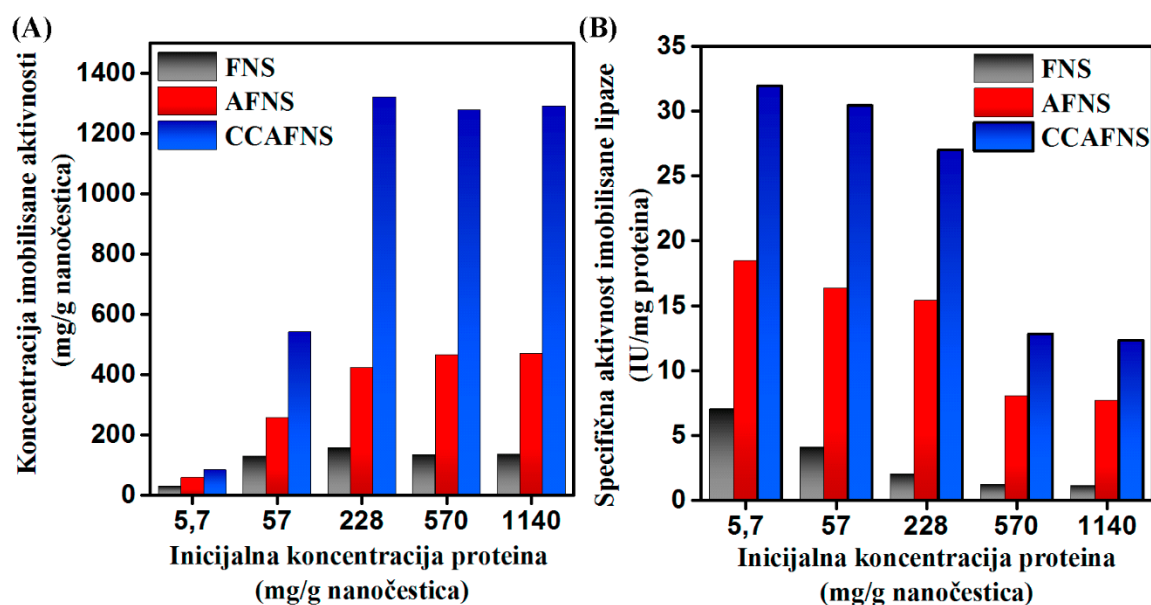
4.2.1.2.1. Uticaj hemijske modifikacije nanosilike na imobilizaciju enzimske aktivnosti

Efikasnost imobilizacije enzimske aktivnosti lipaze iz *C. rugosa* na FNS, AFNS i CCAFNS upoređena je na slici 4.16.

Za razliku od koncentracije imobilisanih proteina, može se primetiti da koncentracija imobilisane aktivnosti lipaze ima suprotan trend, pa je tako najbolji rezultat postignut u imobilizaciji na CCAFNS, dok je najmanja aktivnost ovog enzima imobilisana na FNS iako se na FNS vezalo najviše proteina (108,42 mg/g). Može se primetiti i da koncentracija imobilisane aktivnosti lipaze na sve tri vrste nanočestica raste sa porastom „ponuđene“ koncentracije proteina do 228 mg/g, dok pri višim vrednostima nema značajnih promena u koncentraciji imobilisane aktivnosti enzima. S druge strane, specifična aktivnost opada na sva tri nosača u celom opsegu koncentracija proteina (slika 4.16. (B)), što upućuje na zaključak da, iako raste koncentracija imobilisanih proteina na nanočestice, sve manji je udeo enzima vezanih u aktivnoj konformaciji jer je moguće da

je došlo do interakcija između susjednih molekula enzima zbog njihovog gustog pakovanja na površini nanočestica (slike 4.9., 4.11. i 4.13.).

Iz ugla svih praćenih parametara imobilizacije (koncentracije imobilisanih proteina (slika 4.15. (A)), koncentracije imobilisane aktivnosti (slika 4.16. (A)) i specifične aktivnosti (slika 4.16. (B))) može se zaključiti da se najefikasnija imobilizacija na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice odigrava sa „ponuđenih“ 228 mg proteina po g nanočestica. Kako sa povećanjem ponuđenih proteina iznad ove vrednosti količina imobilisanih proteina raste, a koncentracija imobilisane aktivnosti stagnira ukupno rezultujući padom specifičnih aktivnosti za 50 %, znači da se sa povećanjem koncentracije ponuđenih proteina iznad 228 mg/g već ostvarena količina aktivno vezanih molekula lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS ne menja.



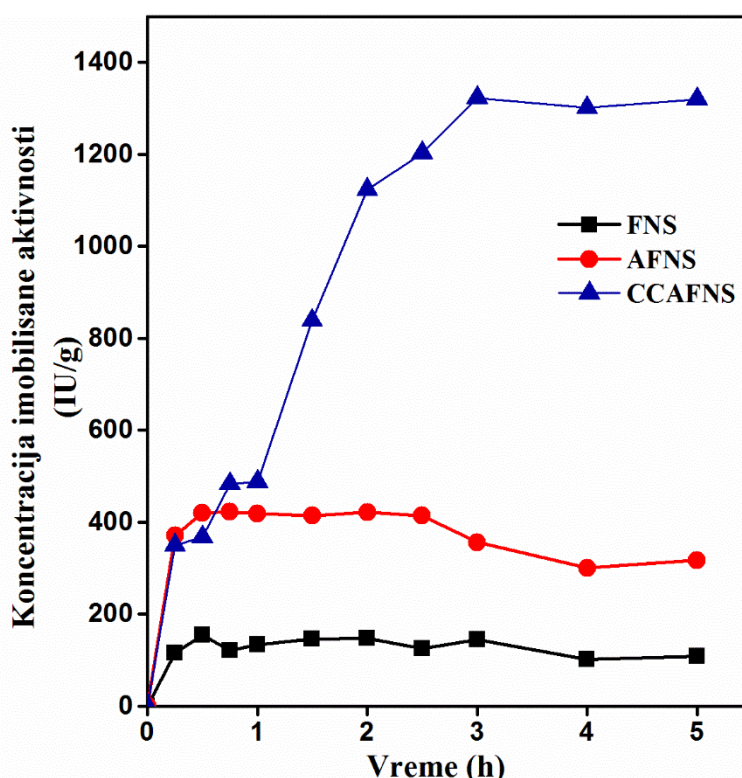
Slika 4.16. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na aktivnost (A) i specifičnu aktivnost (B) imobilisane lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalne koncentracije proteina 5,7, 57, 228, 570 i 1140 mg/g; 0,1 M fosfatni pufer pH 7; vreme imobilizacije 3 h.

Iz svih navedenih razloga u narednim eksperimentima biće korišćeni imobilisani preparati dobijeni pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 228 mg/g.

U cilju dalje optimizacije imobilizacije lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS praćen je uticaj vremena imobilizacije na koncentraciju imobilisane aktivnosti i specifičnu aktivnost lipaze (slika 4.17.).

Najveću koncentraciju imobilisane aktivnosti od 1320 IU/g je ispoljila lipaza imobilisana na CCAFNS nakon 3 h od početka imobilizacije. Iako se najviše lipaze imobilisalo na FNS, koncentracija imobilisane aktivnosti je najmanja i iznosi oko 155 IU/g nanočestica. Koncentracija imobilisane aktivnosti CRL na AFNS nanočestice dostiže maksimum nakon 45 minuta od početka imobilizacije i iznosi 422 IU/g nanočestica.

U prvih 45 minuta koncentracija imobilisane aktivnosti lipaze na CCAFNS ima podjednaku vrednost kao na AFNS, da bi nakon 1 h došlo do postepenog skoka koncentracije imobilisane aktivnosti na CCAFNS do maksimalne vrednosti od 1320 IU/g koliko je iznosila koncentracija imobilisane aktivnosti nakon 3 h.

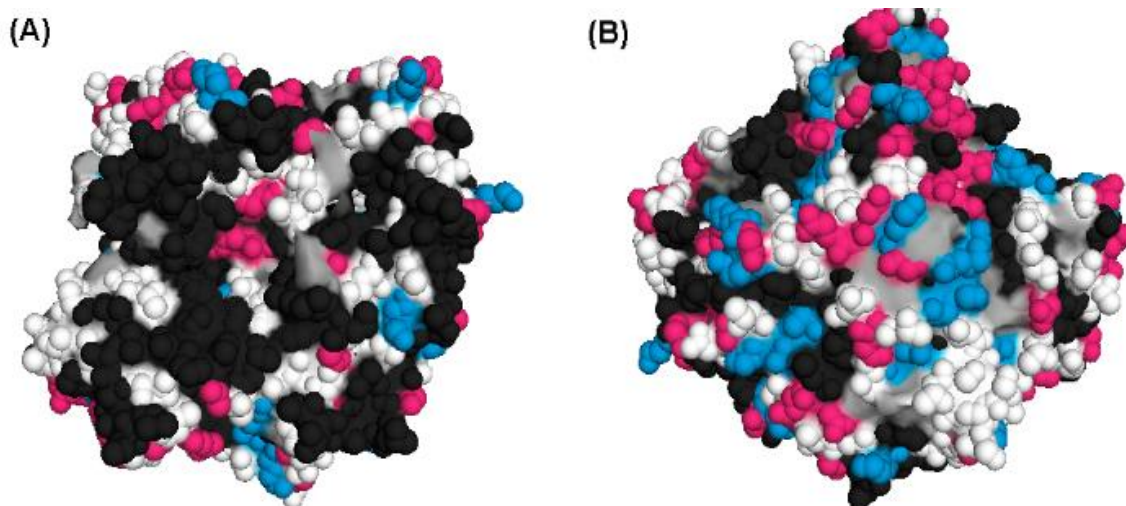


Slika 4.17. Uticaj vremena na koncentraciju imobilisane aktivnosti lipaze imobilisane na FNS, AFNS i CCAFNS. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: ponuđena koncentracija proteina 228 mg/g; 0,1 M, fosfatni pufer pH 7; vreme 0-5 h.

4.2.1.2.2. Diskusija o mehanizmu imobilizacije lipaze na nanočestice silike

Ogromne razlike u koncentraciji imobilisane aktivnosti dobijenih imobilisanih preparata ukazuju da se mehanizmi imobilizacije razlikuju i da imaju veliki uticaj na konformaciju i orijentaciju enzima na površini nosača. Na nanočestice silike lipaza se može vezati isključivo adsorpcijom i to formiranjem slabih Van der Waals-ovih interakcija, vodoničnih veza i elektrostatičkih interakcija (šema 4.5.).⁷⁹ CRL je globularni

glikoprotein sa 31 kiselim, 18 baznih i 7 nepolarnih aminokiselinskih ostataka na površini sa izoelektričnom tačkom pI 4,65 (slika 4.18.).¹⁹⁶ Molekul lipaze je na pH 7 negativno naelektrisan jer su dominantni kiseli aminokiselinski ostaci negativno naelektrisani (glutaminska i asparaginska aminokiselina, pKa <5; crveno obojeni segmenti na slici 4.18.). Kako je na pH 7 površina nanočestica silike takođe značajno negativno naelektrisana može se zaključiti da se između lipaze i FNS nanočestica javljaju dominantno odbojne elektrostatičke interakcije.



Slika 4.18. Raspored kiselih, baznih, polarnih i nepolarnih aminokiselinskih ostataka na površini molekula lipaze. Kiseli aminokiselinski ostatci su obojeni crveno, bazni plavo, polarni belo i nepolarni crno. Frontalni pogled na molekul lipaze (A). Rotiran molekul lipaze za 180 °C u x-y ravni (B). 3D struktura je dobijena pomoću Pymol-a i na osnovu podataka iz banke proteina (na engl. Protein Data Bank, PDB). PDB broj za CRL je 1CRL.

Međutim, nipošto se ne sme zanemariti mogućnost reorijentisanja molekula enzima kako bi došlo do stvaranja lokalizovanih privlačnih elektrostatičkih interakcija između pozitivno neelektrisanih aminokiselinskih ostataka lizina, arginina i histidina (pKa lizina i arginina je >9,5) molekula lipaze (plavo obojeni segmenti na slici 4.18.) i negativno naelektrisane površine FNS nanočestica. Vodonične veze se stvaraju između polarnih aminokiselinskih ostataka koje se nalaze u blizini aktivnog centra molekula CRL (belo obojeni segmenti na slici 4.18.) i nedisosovanih Si-OH grupa na površini silika nanočestica.

Sumiranjem ovih činjenica možemo zaključiti da su formirane privlačne elektrostatičke interakcije kao i formirane vodonične veze odgovorne za imobilizaciju lipaze na FNS što

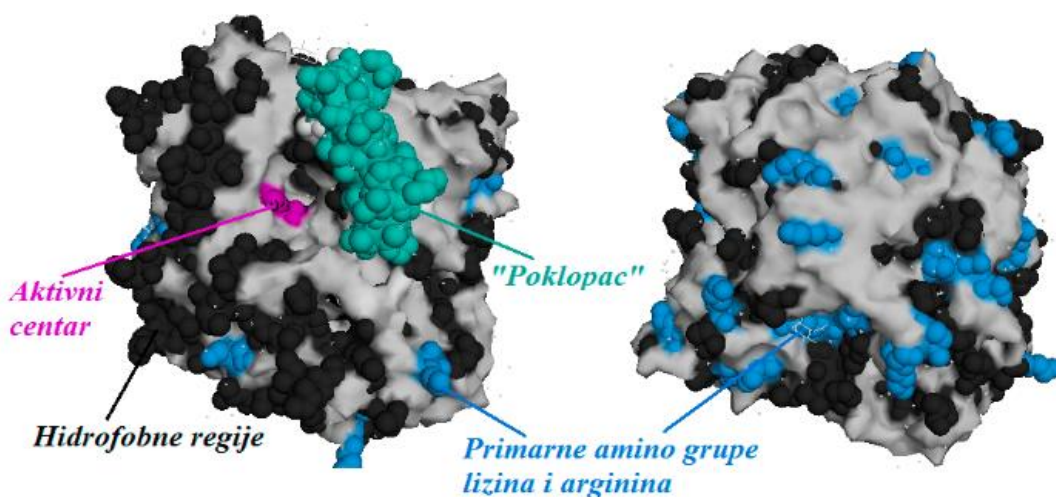
je rezultiralo da se velika količina enzima (67,6 mg/g) veže za površinu ovih nanočestica. Nproporcionalno mala koncentracija imobilisane aktivnosti (155 IU/g) lipaze na FNS u odnosu na veliku koncentraciju imobilisanog enzima se može objasniti da upravo vodonične veze koje se stvaraju između hidrofilne površine silika nanočestica i molekula lipaze mogu da dovedu do narušavanja α -heliksa molekula enzima što dovodi do gubitka aktivnosti.¹⁹⁷

Modifikacija FNS nanočestica APTMS-om je izmenila fizičko-hemijske osobine površine nanočestica pa iako je na FNS vezano dva puta više proteina (slika 4.15.) lipaza imobilisana na AFNS je ispoljila tri puta veću koncentraciju imobilisane aktivnosti (slika 4.16.) što je ukupno rezultiralo šest puta većom specifičnom aktivnošću (IU/mg) (slika 4.16. (B)). Uzimajući u obzir da su pri pH 7 amino-modifikovane nanočestice silike pozitivno naelektrisane, dominantne interakcije koje se javljaju prilikom imobilizacije lipaze su privlačne elektrostatičke interakcije između negativno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka molekula enzima i pozitivno naelektrisane površine nanočestica. Na slici 4.18. zapaža se da se najveći deo negativno naelektrisanih grupa nalazi na strani molekula enzima suprotnoj od aktivnog centra (segmenti molekula lipaze obojeni crveno na slici 4.18. (B)) dok je njihova prisutnost na frontalnoj strani molekula, gde je aktivni centar, mnogo manja (slika 4.18. (A)). Zato se može pretpostaviti da je prilikom imobilizacije aktivni centar ostao okrenut ka spolja u odnosu na površinu čestica što je omogućilo lakši prilaz supstrata aktivnom centru, a samim tim i veću aktivnost (422 IU/g) ovako imobilisanih molekula lipaze.

CCAFNS je nosač konstruisan sa osnovnom namenom da se omogući kovalentna imobilizacija molekula lipaze zasnovana na reakciji između amino grupa koje se nalaze na površini molekula enzima i reaktivnih atoma hlora *s*-triazinskog prstena vezanog cijanuril-hlorida za površinu CCAFNS nanočestica (šema 4.5.). Najaktivniji biokatalizatori su dobijeni upravo prilikom imobilizacije lipaze na CCAFNS nanočestice, ali se može primetiti da je dostizanje maksimalne aktivnosti bilo značajno sporije. Lipaza imobilisana na FNS i AFNS nanočestice je ispoljila maksimalnu koncentraciju imobilisane aktivnosti i maksimalnu koncentraciju imobilisanih proteina nakon 45 minuta od početka imobilizacije, dok je aktivnost lipaze imobilisane na CCAFNS nastavila da raste i nakon što je uspostavljena ravnoteža između vezanih molekula enzima i preostalih

u rastvoru (slika 4.17.). Maksimum koncentracije imobilisane aktivnosti lipaza je dostigla nakon 3 h od početka imobilizacije na CCAFNS.

Može se postaviti hipoteza da u prvoj fazi dolazi do adsorpcije molekula lipaze na CCAFNS nanočestice nakon čega se formiraju kovalentne veze između već adsorbovanih molekula lipaze i CCAFNS nanočestica. Prilikom adsorpcije lipaze na CCAFNS, pored elektrostatskih interakcija sa sekundarnim amino grupama nastalim formiranjem veze sa cijanuril-hloridom ili neproreagovalim primarnim amino grupama (šema 4.5.), moguće su i hidrofobne interakcije između hidrofobnih segmenata molekula enzima (crno obojeni segmenti na slici 4.18.) i hidrofobnih *s*-triazinskih prstena cijanuril-hlorida prisutnih na površini CCAFNS nanočestica. Poznato je da je okolina aktivnog centra molekula lipaze bogata hidrofobnim aminokiselinskim ostacima i da dolazi do pomaranja polipeptidnih lanaca („poklopca“) koji prekrivaju aktivno mesto kada je lipaza adsorbovana na hidrofobnu površinu pri čemu molekuli lipaze zauzimaju aktivnu konformaciju (takozvanu „otvorenu konformaciju“) (slika 4.19.).¹⁶⁸



Slika 4.19. Otvorena konformacija molekula CRL. Molekul lipaze sa frontalne strane (levo) i rotiran molekul lipaze za 180 °C u x-y ravni (desno). 3D struktura je dobijena pomoću Pymol-a i na osnovu podataka iz banke proteina (na engl. Protein Data Bank).

PDB broj za CRL je 1CRL.

Može se pretpostaviti da nakon adsorpcije lipaze u aktivnoj konformaciji (prva faza na krivoj za CCAFNS slika 4.17.) dolazi do postepenog reorijentisanja molekula kako bi došlo do formiranja kovalentne veze između primarnih amino grupa prisutnih na površini molekula lipaze i slobodnih sekundarnih i tercijarnih atoma hlora cijanuril-hlorida vezanog za površinu CCAFNS (faza dva na krivoj za CCAFNS na slici 4.17.). Nakon

stvaranja kovalentnih veza molekuli enzima ostaju fiksirani na površini CCAFNS u aktivnoj konformaciji pri čemu je omogućen slobodan pristup molekulima supstrata aktivnom centru enzima.

4.2.1.2.3. Desorpcija lipaze imobilisane na CCAFNS

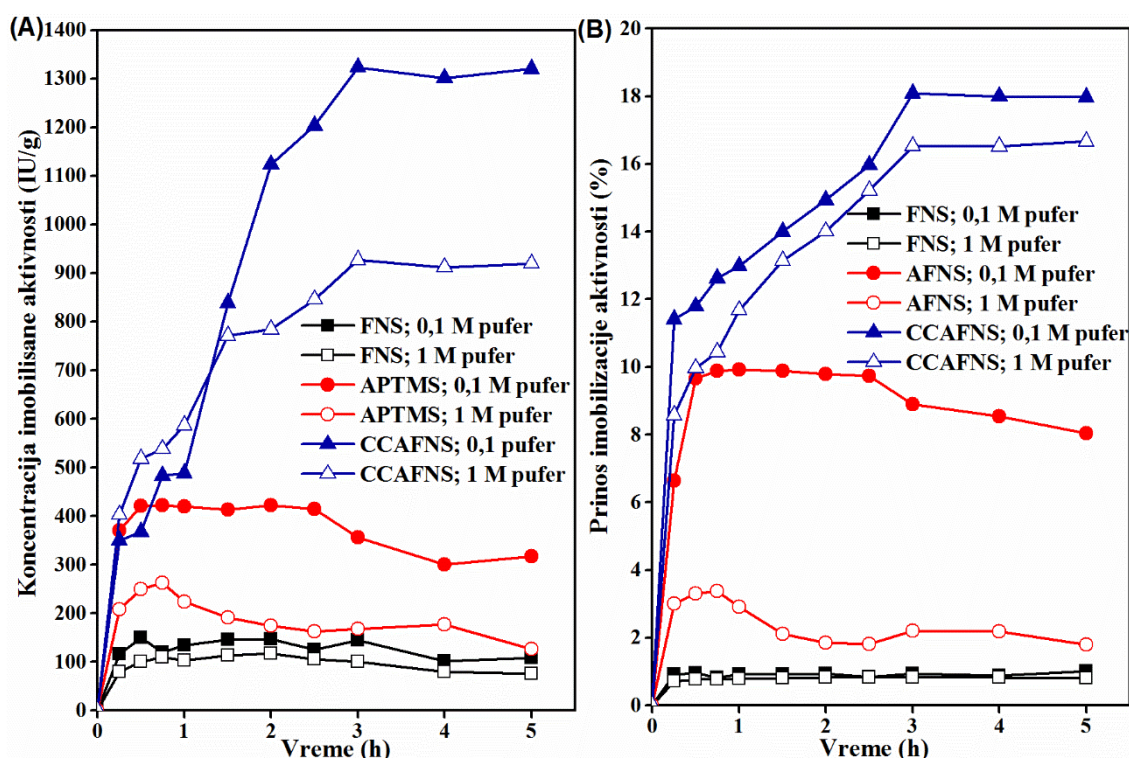
Kako bi testirali ovu hipotezu izvedena je desorpcija molekula lipaze sa CCAFNS nanočestica u različitim fazama imobilizacije. Desorpcija je izvršena tako što su preparati dobijeni imobilizacijom lipaze na CCAFNS nakon 1 h, 1,5 h i 5 h tretirani 1 M CaCl₂ i Tritonom X-100 kako bi se uklonili adsorbovani molekuli enzima i procenili udeli kovalentno vezanih molekula enzima. Lipaza imobilisana na CCAFNS tokom 1 h nakon tretmana sa CaCl₂ i Tritonom X-100 je zadržala samo 9,6 % početne koncentracije imobilisane aktivnosti (izmerene koncentracije imobilisane aktivnosti pre tretmana) što znači da se tokom prvog sata skoro sav enzim vezao adsorpcijom. Nakon imobilizacije od 1,5 h zadržana koncentracija imobilisane aktivnosti nakon desorpcije je 35,6 %, a nakon 5 h se popeo na čak 72,5 % što govori da su već nakon jednog sata od početka imobilizacije počele da se dešavaju konformacione promene adsorbovanih molekula i da enzimi inicijalno vezani adsorpcijom na kraju petog sata imobilizacije bivaju vezani jakim kovalentnim vezama za CCAFNS. Ovaj eksperiment je definitivno dokazao da se imobilizacija lipaze na CCAFNS odigrava u dve faze i da je značajan broj adsorbovanih molekula enzima uspostavio kovalentne veze sa CCAFNS nanočesticama. Takođe, potvrđeno je da dobro slaganje rezultata imobilizacije proteina sa adsorpcionom izotermom nije iznenađujuće jer se pre formiranja kovalentne veze između proteina i nosača odigrava adsorpcija proteina koja je u skladu sa zakonitostima koje opisuju ovu površinsku pojavu.

4.2.1.2.4. Uticaj jonske jačine pufera na imobilizaciju lipaze na nanočestice silike

Imobilizacija enzima u puferima velike jonske jačine je jedna od najkorišćenijih strategija za povećavanje aktivnosti i/ili stabilnosti imobilisanih enzima jer se tada pospešuje stvaranje hidrofobnih interakcija i kovalentnih veza zahvaljujući suzbijanju elektrostatičkih interakcija.³

Radi utvrđivanja uticaja jonske jačine pufera na koncentraciju imobilisane aktivnosti i prinos imobilizacije aktivnosti lipaze imobilisane na FNS, AFNS i CCAFNS, imobilizacija lipaze na ove nanočestice rađena je u 0,1 M i 1 M fosfatnom puferu pH 7 (slika 4.20.).

Lipaza imobilisana na FNS, AFNS i CCAFNS u 1 M puferu je ispoljila niže koncentracije imobilisane aktivnosti u odnosu na enzim imobilisan u 0,1 M puferu. Povećanje jonske jačine pufera smanjuje adsorpciju preko elektrostatičkih interakcija pa niže koncentracije imobilisane aktivnosti enzima na FNS i AFNS u odnosu na dobijene koncentracije imobilisane aktivnosti u 0,1 M puferu jasno pokazuju da su ove interakcije ključne za imobilizaciju lipaze na ove nanočestice. Smanjenje koncentracije imobilisane aktivnosti je najuočljivije kod imobilizacije lipaze na AFNS gde se koncentracija imobilisane aktivnosti smanjila sa 422 IU/g u 0,1 M puferu na 262 IU/g u 1 M puferu, što je jasan znak da elektrostatičke interakcije dominiraju prilikom imobilizacije lipaze na AFNS.



Slika 4.20. Uticaj jonske jačine na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) lipaze imobilisane na FNS, AFNS i CCAFNS.

Ekperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 228 mg/g; 0,1 i 1M fosfatni pufer (pH 7); vreme 0-5 h.

Interesantno je zapaziti da vrednosti za koncentracije imobilisane aktivnosti lipaze imobilisane na AFNS i FNS u 1 M puferu iznose 250 odnosno 110 IU/g, a za prinos imobilizacije aktivnosti 9,9 i 1,2 %, redom. Pa se može zaključiti da je modifikacija FNS nanočestica sa APTMS-om doprinela imobilizacionom kapacitetu FNS nanočestica samo

kroz omogućavanje formiranja privlačnih elektrostatičkih interakcija između enzima i nanočestica.

Imobilizacija lipaze na CCAFNS u 1 M puferu dala je znatno veće koncentracije imobilisane aktivnosti (920 IU/g) i veći prinos imobilizacije aktivnosti (17 %) u odnosu na FNS i AFNS čime je potvrđeno da je aktivacija cijanuril-hloridom doprinela imobilizacionom kapacitetu FNS nanočestica omogućujući da se formiraju kovalentne veze između enzima i nanočestica.

Takođe, kako lipaza ima afinitet ka hidrofobnim nosačima, moguće je da je prisutnost hidrofobnih funkcionalnih grupa na površini CCAFNS nanočestica doprinela stabilizaciji strukture imobilisanog enzima što je imalo za posledicu da aktivnost ovih imobilisanih enzima bude veća.

4.2.1.2.5. Poređenje karakteristika dobijenih nano-biokatalizatora

Sumirane karakteristike lipaze imobilisane na FNS, AFNS i CCAFNS u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7) su predstavljene u Tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Poređenje parametara imobilizacije lipaze u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7) na FNS, AFNS i CCAFNS pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 228 mg/g. Imobilizacija trajala 3 h.

<i>Nanočestice</i>	<i>Prinos imobilizacije proteina (%)</i>	<i>Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g)</i>	<i>Specifična aktivnost (IU/ mg proteina)</i>	<i>Prinos imobilizacije aktivnosti (%)</i>
FNS	30,1	155,2	2,44	1,02
AFNS	12,02	422,16	16,31	9,91
CCAFNS	21,45	1320	30,87	18,07

Na osnovu parametara imobilizacije koji su praćeni možemo zaključiti da je dobijen imobilisan enzim najboljih karakteristika prilikom imobilizacije lipaze na CCAFNS nanočestice. Lipaza imobilisana na CCAFNS je pokazala ubedljivo najveću koncentraciju imobilisane aktivnosti (1320 IU/g), specifičnu aktivnost od 30, 87 IU/mg proteina i prinos imobilizacije aktivnosti od 18,07 % pa se može konstatovati da su nanočestice sa uvedenim reaktivnim atomima hlora *s*-triazinskog prstena najbolji izbor za imobilizaciju lipaze koja se vezuje preko površinskih amino grupa. Prilikom kovalentne imobilizacije lipaze na CCAFNS dobija se 2 i 15 puta veća specifična aktivnost odnosno procenat

vezane aktivnosti u odnosu na adsorpciju lipaze na nanočestice sa amino, odnosno silanol grupama na površini (AFNS i FNS).

Imobilizacija molekula lipaze je najpovoljnija ako se dešava formiranjem kovalentne veze sa amino grupama aminokiselinskih ostataka na površini molekula enzima što je potvrđeno i prilikom imobilizacije ovog enzima u 1 M fosfatnom puferu pH 7 (Tabela 4.5.) jer su najbolje vrednosti parametara imobilizacije (koncentracija imobilisane aktivnosti, specifična aktivnost i prinos imobilizacije aktivnosti) ostvarene prilikom imobilizacije ovog enzima na CCAFNS nanočestice.

Tabela 4.5. Poređenje parametara imobilizacije lipaze u 1 M puferu (pH 7) na FNS, AFNS i CCAFNS pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 228 mg/g. Imobilizacija je trajala 3 h.

<i>Nanočestice</i>	<i>Prinos imobilizacije proteina (%)</i>	<i>Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g)</i>	<i>Specifična aktivnost (IU/mg proteina)</i>	<i>Prinos imobilizacije aktivnosti (%)</i>
<i>FNS</i>	29,59	117	1,79	0,83
<i>AFNS</i>	10,04	262,54	11,46	3,38
<i>CCAFNS</i>	20,93	920	16,84	16,66

4.2.1.3. Stabilnost dobijenih nano-biokatalizatora

Za kompletnu procenu katalitičkog potencijala novog biokatalizatora neophodna je evaluacija njegove stabilnosti zbog čega su ispitane termička i operativna stabilnost dobijenih lipaza imobilisanih na različite nanočestice silike.

4.2.1.3.1. Ispitivanje termičke stabilnosti lipaze imobilisane na nanočestice silike

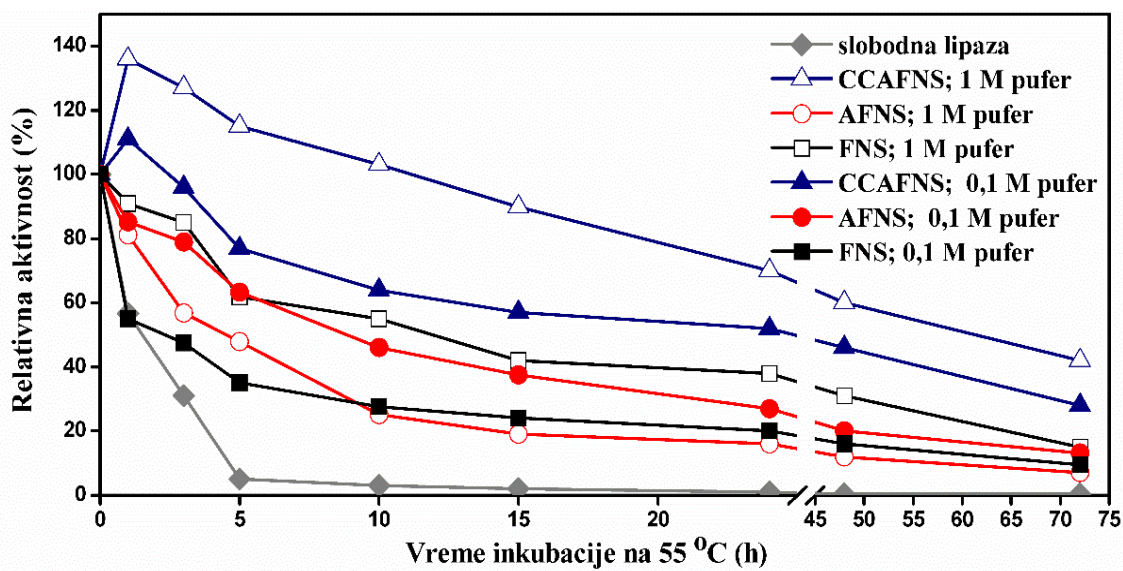
Nakon optimizacije imobilizacije lipaze na nanočestice silike ispitana je termička stabilnost svih dobijenih imobilisanih preparata i slobodnog enzima na 55 °C. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.21.

Lipaza imobilisana na CCAFNS nanočestice u 0,1 M i 1 M puferu je zadržala 42 % odnosno 28 % od početne aktivnosti nakon inkubacije na 55 °C tokom 72 h.

Polu-život je vreme za koje koncentracija imobilisane aktivnosti enzima padne na 50 % u odnosu na početnu koncentraciju aktivnosti tokom tretmana visokom temperaturom, pa su polu-životi svih imobilisanih preparata na temperaturi od 55 °C prikazani u Tabeli 4.6. U poređenju sa slobodnom lipazom polu-život lipaze imobilisane na CCAFNS u 1 M puferu se povećao 48 puta, a 36 puta kada je imobilizacija izvedena u 0,1 M puferu. Na

osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je imobilizacijom lipaze na CCAFNS značajno povećana termička stabilnost imobilisanog enzima.

Dokazano je da je stabilnost imobilisanog enzima proporcionalna broju kovalentnih veza formiranih između enzima i nosača jer se tako povećava rigidnost molekula enzima.⁶³ Povećanjem rigidnosti molekula enzima teže podleže denaturaciji usled tretmana toplotom.



Slika 4.21. Termička stabilnost lipaze imobilisane na FNS, AFNS i CCAFNS u 0,1 i 1 M puferu.

Tabela 4.6. Polu-život slobodne i imobilisane lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS prilikom tretmana na 55 °C.

$t_{1/2}$ (h)

Vrsta nanočestice	0,1 M pufer	1 M pufer
FNS	3	15
AFNS	10	5
CCAFNS	55	70
CRL	1,5	-

Kako jedino CCAFNS nanočestice nude mogućnost formiranja kovalentnih veza i dobijeni imobilisani preparati na CCAFNS su pokazali najveću termičku stabilnost na 55 °C u odnosu na sve ispitivane imobilisane preparate.

Krive inaktivacije lipaze imobilisane adsorpcijom na FNS i AFNS u 0,1 M i 1 M puferu su veoma slične (slika 4.21.), a polu-životi imobilisane lipaze na ove nanočestice kreću

se u opsegu od 3 h do 15 h (Tabela 4.6.). S obzirom da lipaza imobilisana na FNS i AFNS nije pokazala značajno povećanje termičke stabilnosti u odnosu na slobodan enzim, može se zaključiti da imobilizacija lipaze na ove dve vrste nanočestica nije dovela do sprečavanja denaturacije enzima zaštitom specifičnog mesta.¹⁹⁸

Skok aktivnosti u početnoj fazi odrađivanja termičke stabilnosti je primećen samo kod CCAFNS derivata. Fernandez i sar.¹⁹⁹ su primetili da hidrofobne interakcije između enzima i nosača mogu biti pospešene na višim temperaturama, što ima za posledicu povećanje stabilnosti imobilisanog enzima do određene granice. Dodatna aktivacija imobilisane lipaze na CCAFNS u 0,1 i 1 M puferu u prvih 30 minuta inkubacije na 55 °C može se objasniti prisustvom hidrofobnog *s*-triazinskog prstena cijanuril-hlorida vezanog za površinu CCAFNS i uspostavljanju dodatnih hidrofobnih interakcija sa hidrofobnim segmentima molekula lipaze. Kao rezultat ovih dodatnih interakcija došlo je do povećanja aktivnosti imobilisanih lipaza na CCAFNS u 0,1 i 1 M puferu na 55 °C u početnoj fazi tretmana.

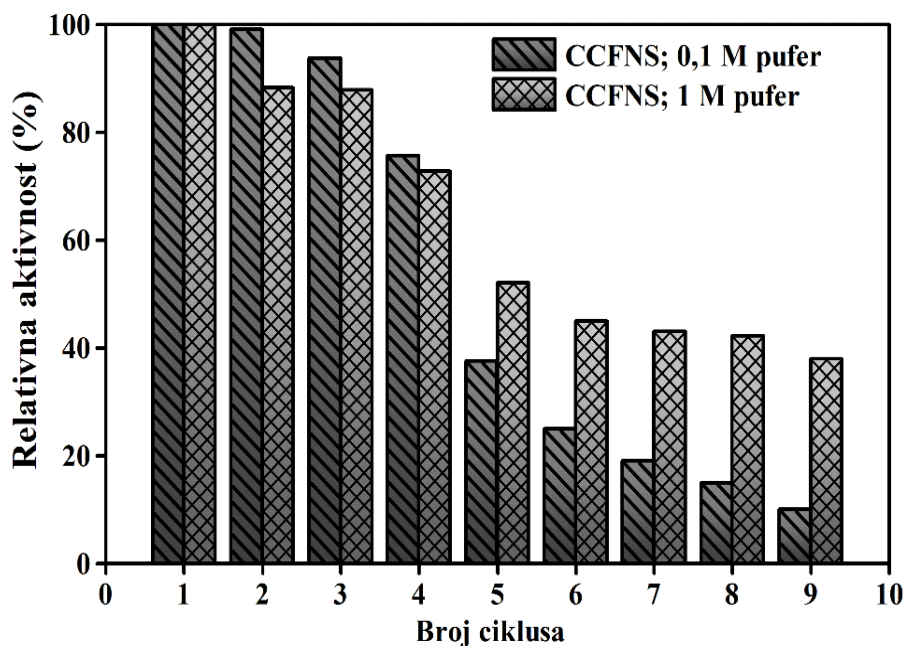
4.2.1.3.2. Ispitivanje operativne stabilnosti lipaze imobilisane na nanočestice silike

Ključni parametar koji preporučuje primenu određenog imobilisanog preparata je mogućnost njegove višestruke upotrebe pa je analizirana operativna stabilnost svih dobijenih imobilisanih preparata na 25 °C u reakciji hidrolize *p*-nitrofenil palmitata.

Nakon 9 ponovljenih ciklusa lipaza imobilisana na CCAFNS u 0,1 M puferu zadržala je 10 % početne aktivnosti, dok je imobilisan preparat dobijen u 1 M puferu zadržao čak 38 % početne aktivnosti čime je još jednom potvrđena efikasnost kovalentne imobilizacije lipaze (slika 4.22.).

Za razliku od lipaze imobilisane na CCAFNS, lipaza imobilisana na FNS i AFNS su već tokom prve ponovne upotrebe izgubile 90 % inicijalne aktivnosti verovatno zbog slabih i nestabilnih veza koje su formirane između enzima i ovih nanočestica što je dovelo do spiranja enzima sa ovih nanočestica.

Sumiranjem svih predstavljenih rezultata vezanih za imobilizaciju lipaze na nanočestice silike može se zaključiti prvenstveno da korišćene nanočestice silike imaju veliki potencijal za primenu u imobilizaciji enzima imajući u vidu ostvarene kapacitete za vezivanje lipaze koji su znatno veći u odnosu na druge nanočestice koje se koriste za imobilizaciju enzima.



Slika 4.22. Opeativna stabilnost CRL imobilisane na CCAFNS u 0,1 M i 1 M puferu.

Aktivacija amino-modifikovanih silika nanočestica dala je mogućnost kovalentnog imobilisanja enzima što je rezultiralo dobijanjem imobilisanih preparata dobrih koncentracija imobilisane aktivnosti, ali i povećane termičke i operativne stabilnosti.

S obzirom da je lipaza iz *C. rugosa* korišćena kao enzim-model za optimizaciju uslova modifikacije i aktivacije nanočestica silike i da su dobijene nanočestice dale dobre rezultate za imobilizaciju ovog enzima u narednim poglavljima biće optimizovana i analizirana mogućnost imobilizacije komercijalne β -galaktozidaze (*A.oryzae*) i komercijalnih preparata proteaza (Flavourzyme i Alcalase) na ove nanočestice.

4.2.2. Imobilizacija lipaze na epoksi-modifikovane nanočestice silike

U ovom delu doktorske disertacije biće proučavan mehanizam vezivanja lipaze na epoksi-modifikovane nanočestice silike (GFNS) i upoređen sa mehanizmom koji je ustanovljen prilikom imobilizacije ovog enzima na amino-modifikovane (AFNS) i cijanuril-hloridom aktivirane amino-modifikovane nanočestice silike (CCAFNS). Takođe, uticaj koji formirane interakcije između epoksi-modifikovanih nanočestica silike i lipaze imaju na termičku i operativnu stabilnost dobijenog imobilisanog preparata biće izučavan i upoređen sa rezultatima dobijenim kada su korišćene AFNS i CCAFNS nanočestice.

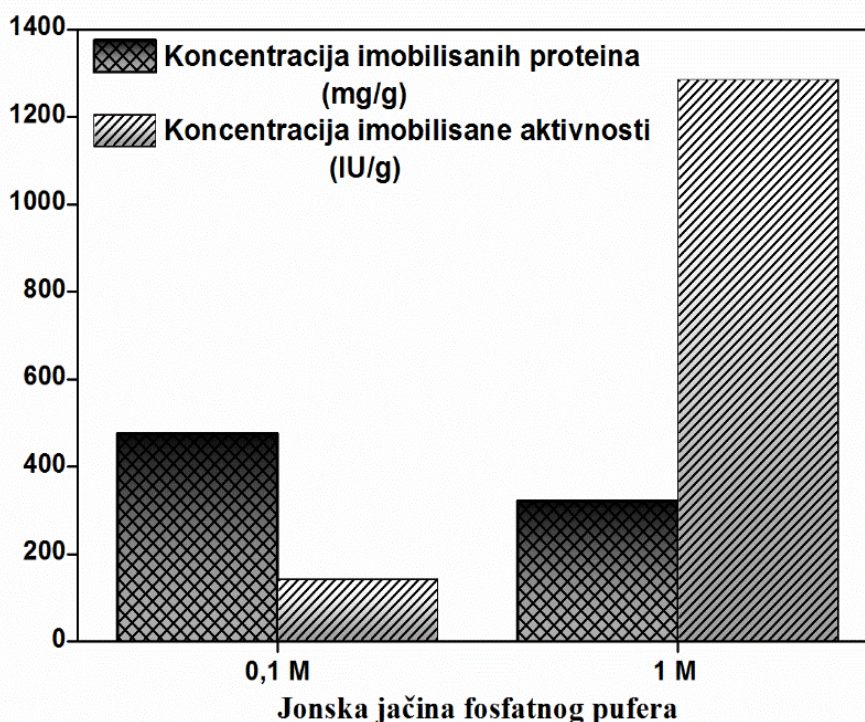
4.2.2.1. Uticaj jonske jačine pufera na proces imobilizacije lipaze

U cilju određivanja optimalnih uslova imobilizacije lipaze na FNS nanočestice modifikovane GOPTMS-om (GFNS), proučavan je uticaj jonske jačine fosfatnog pufera

upotrebljenog u imobilizaciji na koncentraciju imobilisanih proteina i koncentraciju imobilisane aktivnosti lipaze (slika 4.23.).

U ispitivanje procesa imobilizacije lipaze na GFNS derivat je uključen 1 M pufer iz razloga što visoka jonska jačina može da pospeši kovalentnu imobilizaciju suzbijanjem elektrostatičke adsorpcije. Iako u reakciji modifikacije učestvuje većina silanol grupa nanočestica, određeni deo ovih hidrofilnih negativno naelektrisanih grupa ostaje netaknut i dostupan da se za njih enzim veže elektrostatičkim interakcijama preko pozitivno naelektrisanih ϵ -amino grupa lizina kada se imobilizacija izvodi u puferima niskih jonskih jačina.

Prilikom imobilizacije lipaze na GFNS nanočestice dobijena je 1,5 puta veća koncentracija imobilisanih proteina u puferu manje jonske jačine. Imajući u vidu da su u puferu velike jonske jačine elektrostatičke interakcije suzbijene nije iznenađujuće da se na GFNS nanočestice vezalo manje proteina, tj. maksimalno se vezalo 322 mg proteina po g nanočestica (slika 4.23.).



Slika 4.23. Uticaj jonske jačine pufera na koncentraciju imobilisanih proteina i koncentraciju imobilisane aktivnosti lipaze prilikom imobilizacije na GFNS nanočestice. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 600

mg/g; 0,1 i 1 M fosfatni pufer pH 7; vreme 3 h. Eksperimentalni uslovi modifikacije

FNS nanočestica: maseni odnos FNS/GOPTMS 1:1; vreme 1 h.

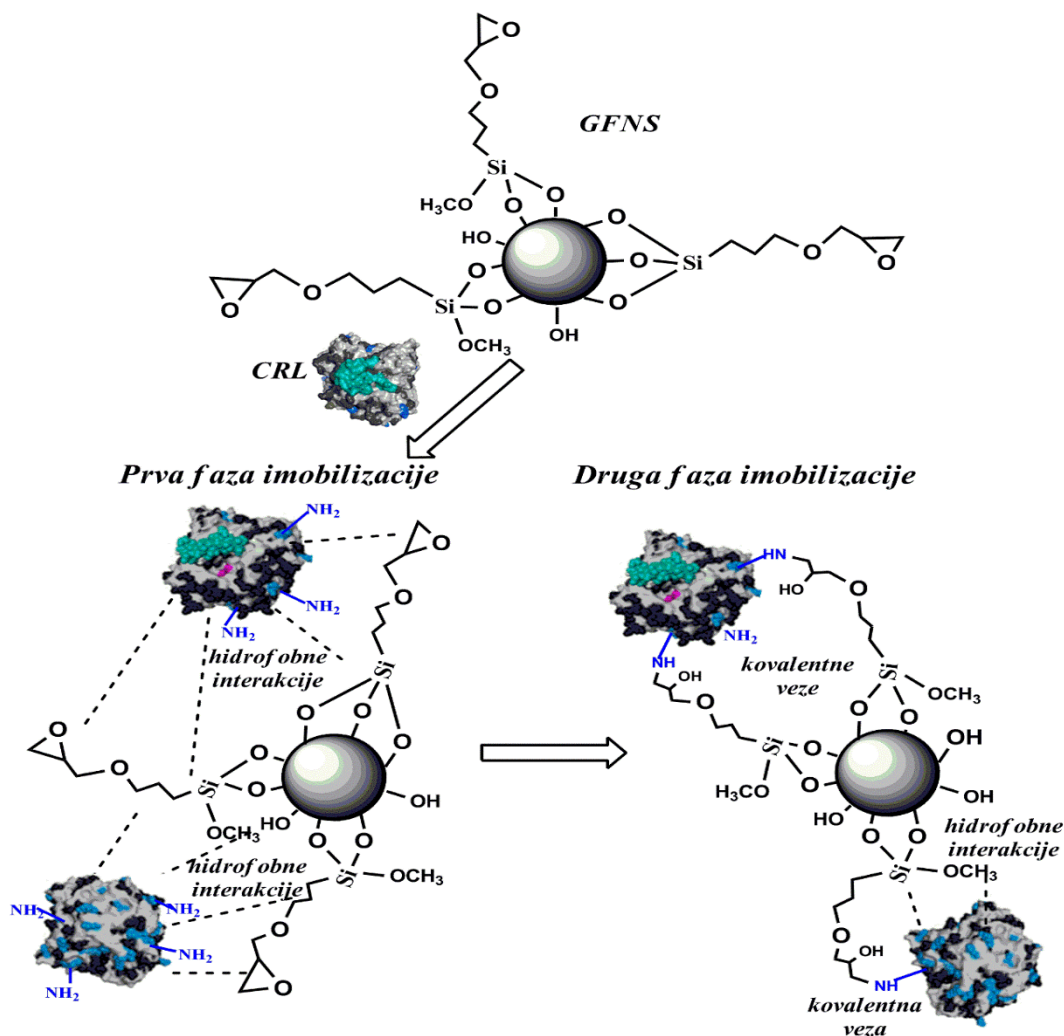
Što se tiče koncentracije imobilisane aktivnosti sa slike 4.23. se vidi da je koncentracija imobilisane aktivnosti u 1 M puferu 10 puta veća u odnosu na ostvarenu koncentraciju imobilisane aktivnosti u 0,1 M puferu. Stoga, može se zaključiti da imobilizacija lipaze u uslovima koji pospešuju kovalentno vezivanje omogućava da se dobije aktivniji imobilisan enzim, verovatno zahvaljujući činjenici da molekuli enzima prilikom imobilizacije u 1 M puferu zauzimaju povoljniju konformaciju i orijentaciju što dovodi do povećanja aktivnosti.

Postignuta bolja koncentracija imobilisane aktivnosti lipaze na GFNS u 1 M puferu može biti objašnjena i činjenicom da nakon modifikacije površina silika nanočestica postaje hidrofobnija, a kako se u 1 M puferu pospešuju hidrofobne interakcije moguće je da su imobilisani enzimi dodatno stabilizovani i ovim interakcijama što se direktno odrazilo na postignutu koncentraciju imobilisane aktivnosti.

Takođe bi trebalo pomenuti da pri velikim koncentracijama imobilisanih proteina može da dođe do difuzionih limitacija i sternih smetnji prilikom prilaza supstrata aktivnim mestima imobilisanih enzima što dovodi do smanjene aktivnosti kao što se desilo prilikom imobilizacije lipaze na GFNS u 0,1 M puferu.

Na osnovu pregleda literature, može se pretpostaviti da se imobilizacija enzima na nosače sa epoksi grupama na površini odigrava u dva koraka jer je formiranje kovalentne veze sa epoksi grupama spor proces (šema 4.6.).

Prvo dolazi do adsorpcije enzima formiranjem hidrofobnih i/ili elektrostatičkih interakcija, nakon čega dolazi do formiranja kovalentnih veza između adsorbovanih enzima i epoksi grupa u njihovoj okolini.¹³ Kako su u slučaju imobilizacije enzima u 1 M puferu elektrostatičke interakcije suzbijene, a hidrofobne pospešene, molekuli lipaze se verovatno na GFNS nanočestice prvo adsorbuju formiranjem hidrofobnih interakcija¹ da bi potom došlo do formiranja kovalentnih veza između amino, hidroksilnih i tiolnih grupa prisutnih u molekulu CRL i epoksi grupa GFNS nanočestica (šema 4.6.).



Šema 4.6. Imobilizacija lipaze na GOPTMS-om modifikovane nanočestice silike.

4.2.2.2. Uticaj koncentracije epoksi grupa na proces imobilizacije lipaze

Radi potpunije optimizacije procesa imobilizacije lipaze, uticaj koncentracije epoksi grupa je ispitan tako što su sintetisana 4 GFNS derivata i primenjena u imobilizaciji lipaze u 1 M puferu.

U ovom poglavlju će fokus biti na pronalaženju optimalnog masenog odnosa FNS/GOPTMS koji je potrebno koristiti prilikom modifikacije silika nanočestica da bi se dobio nosač sa uniformnom prekrivenošću površine epoksi grupama. Broj uvedenih epoksi grupa pri različitim korišćenim masenim odnosima FNS/GOPTMS je dat u Tabeli 4.7.

Povećanje upotrebljene koncentracije GOPTMS-a za modifikaciju FNS nanočestica dovodi do smanjenja koncentracije epoksi grupa uvedenih na površinu FNS (Tabela 4.7.).

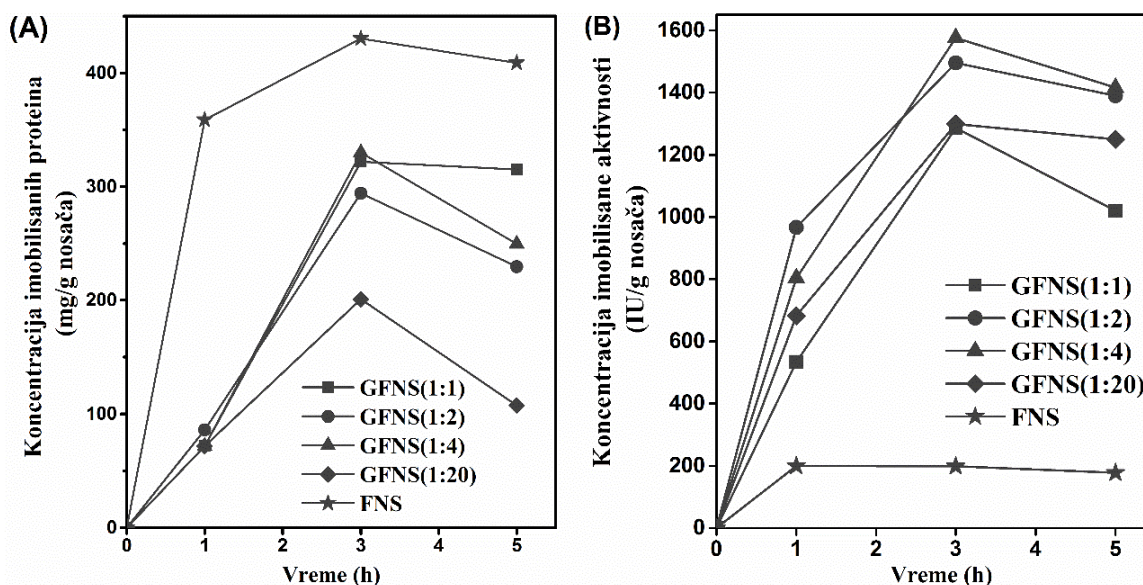
Tabela 4.7. Uticaj masenog odnosa FNS/GOPTMS na koncentraciju uvedenih epoksi grupa na površinu modifikovanih silika nanočestica (GFNS). Modifikacija FNS nanočestica trajala 1 h pri svim masenim odnosima FNS/GOPTMS.

<i>Nanočestica</i>	<i>Koncentracija epoksi grupa ($\mu\text{mol/g}$ nosača)</i>
<i>FNS</i>	0
<i>GFNS(1:1)</i> (<i>maseni odnos FNS/GOPTMS=1:1</i>)	560
<i>GFNS(1:2)</i> (<i>maseni odnos FNS/GOPTMS=1:2</i>)	520
<i>GFNS(1:4)</i> (<i>maseni odnos FNS/GOPTMS=1:4</i>)	440
<i>GFNS(1:20)</i> (<i>maseni odnos FNS/GOPTMS=1:20</i>)	360

Ovaj rezultat je u skladu sa objavljenim studijama koje su se bavile optimizacijom reakcije silanizacije u kojima je zapaženo da visoke koncentracije organosilana mogu da dovedu do reakcije polimerizacije između samih molekula organosilana pri čemu nastaju oligomeri, umesto da dođe do reakcije kondenzacije između hidrazibilnih grupa organosilana i silanol grupa čestica silike.² Nastali oligomeri se vezuju na površinu čestica silike formirajući veliku polimernu mrežu sa smanjenom koncentracijom slobodnih epoksi grupa, a samim tim i sa smanjenim brojem mesta na koja se mogu vezati proteini prilikom imobilizacije.¹⁵ Ovako dobijene čestice silike nemaju uniformnu i stabilnu površinu čime je još dodatno otežano vezivanje enzima.

Kako bi utvrdili koji je od četiri sintetisana GFNS derivata najpogodniji za imobilizaciju lipaze praćena su dva najznačajnija parametra imobilizacije (koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nanočestica) i koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g) u toku 5 h. Paralelno je praćena i imobilizacija lipaze na nemodifikovane nanočestice silike kako bi se procenio efekat koji modifikacija sa GOPTMS-om ima na kapacitet ovih nanočestica za vezivanje enzima (slika 4.24.).

Koncentracija imobilisanih proteina i koncentracija imobilisane aktivnosti lipaze na sva četiri GFNS derivata i FNS raste u toku vremena i dostižu maksimum nakon 3 h od početka imobilizacije (slika 4.24. (A)).



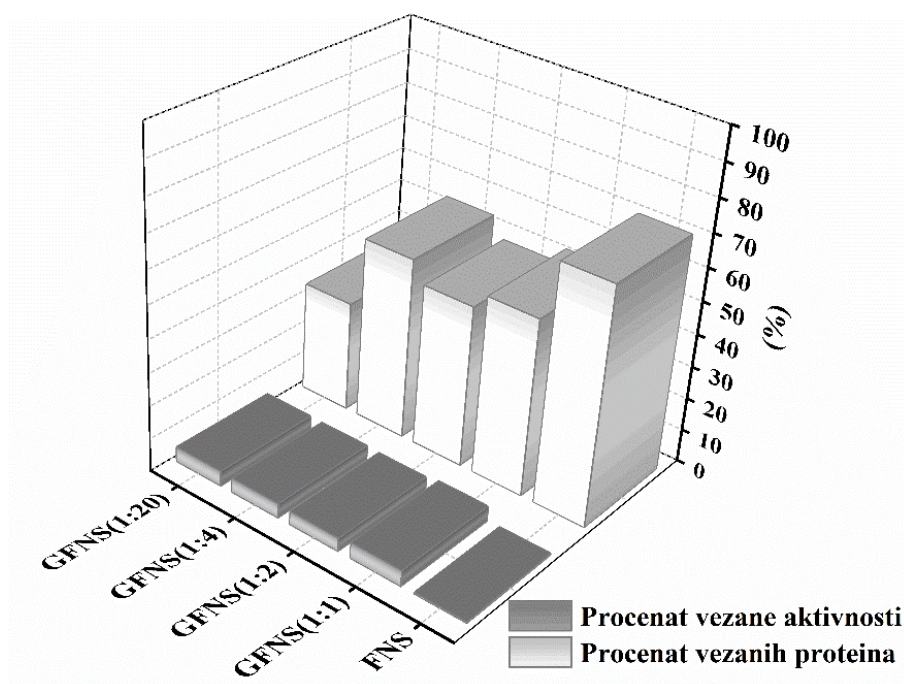
Slika 4.24. Proces imobilizacije lipaze na četiri GFNS derivata i FNS: koncentracija imobilisanih proteina (A) i koncentracija imobilisane aktivnosti (B). Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 600 mg/g; 1 M fosfatni pufer pH 7; vreme 0-5 h.

Adsorpcija lipaze na FNS je bila brza jer se već u prvih sat vremena vezalo 85 % od ukupno imobilisanih proteina. Što se tiče GFNS derivata, kovalentna imobilizacija lipaze odigrava se nešto sporije i nakon jedan sat u proseku je vezano na sve derivate oko trećine kapaciteta koji je dostignut tek nakon 3 h. Posle toga na svim korišćenim nanočesticama dolazi do naglog pada koncentracije imobilisanih proteina od 5-20 %, u zavisnosti od korišćene nanočestice.

Najveća koncentracija imobilisanih proteina (430 mg/g nanočestica) je postignuta kada je lipaza imobilisana na FNS nanočestice (slika 4.24. (A)). Na derivate GFNS(1:1), GFNS(1:2) i GFNS(1:4) se imobilisalo oko 300 mg enzima po g nanočestica, dok se na derivat GFNS(1:20) imobilisalo najmanje enzima, oko 200 mg/g. Odnosno, iz aspekta prinosa imobilizacije proteina, 71 % inicijalne koncentracije proteina se imobilisalo na FNS, oko 50 % na GFNS(1:1), GFNS(1:2) i GFNS(1:4), dok se 33 % imobilisalo na GFNS(1:20) (slika 4.25.).

Na osnovu prezentovanih rezultata može se zaključiti da modifikacija FNS nanočestica GOPTMS-om delom redukuje kapacitet modifikovanih nanočestica za vezivanje lipaze, verovatno jer visoka koncentracija epoksi grupa na površini nosača ometa formiranje

interakcija između grupa na površini enzima i preostalih nemodifikovanih silanolnih grupa silike koje su bile ključne za imobilizaciju na FNS.

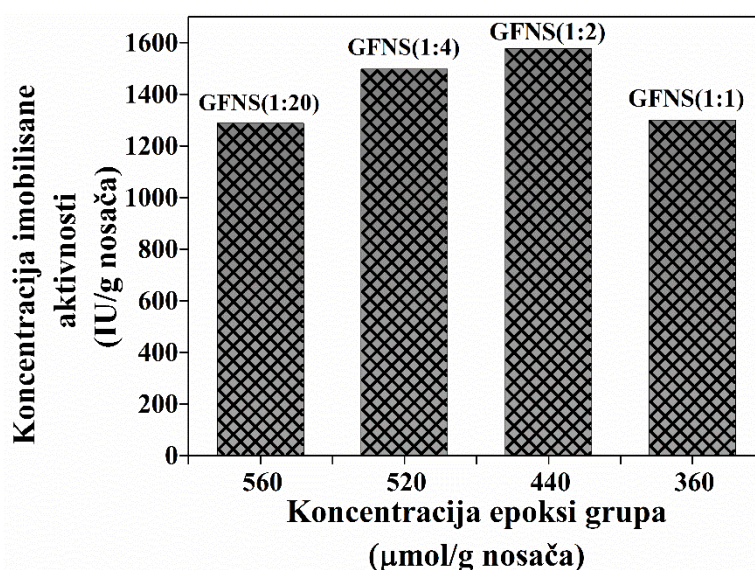


Slika 4.25. Poređenje prinosa imobilizacije aktivnosti i proteina na različite GFNS derivate i nemodifikovane nanočestice silike.

Međutim, koncentracije imobilisanih proteina koje su dobijene na svim GFNS derivatima su i dalje mnogo veće od koncentracija koje su dobijene prilikom imobilizacije ovog enzima na druge epoksi-čestice,^{14, 17, 18, 200} pa se može reći da modifikovane GFNS nanočestice imaju dobar potencijal za primenu u imobilizaciji enzima.

Sa druge strane, ako se analiziraju koncentracije imobilisane aktivnosti lipaze na GFNS derivate i FNS (slika 4.24. (B)), može se videti da je imobilisana lipaza na GFNS derivate pokazala drastično veće aktivnosti u odnosu na lipazu imobilisanu na FNS. Lipaza imobilisana na FNS ima koncentraciju imobilisane aktivnosti od samo 200 IU/g, dok lipaza imobilisana na GFNS derivate ima aktivnosti od 1286 do 1576 IU/g. Sa svim GFNS derivatima maksimalne vrednosti koncentracije imobilisane aktivnosti su postignute 3 h od početka imobilizacije nakon čega je došlo do pada aktivnosti proporcionalno padu koncentracije imobilisanih proteina. Kod primene FNS, koncentracija imobilisane aktivnosti se nije promenila nakon trećeg sata imobilizacije uprkos padu koncentracije imobilisanih proteina. Prilikom analize prinosa imobilizacije aktivnosti (slika 4.24.) uočava se da su imobilisani enzimi na GFNS derivate dali iste rezultate (oko 4 %), dok je na FNS imobilisano 10 puta manje aktivnosti.

Imobilisan enzim ima najveće koncentracije imobilisane aktivnosti (1495 i 1576 IU/g) kada su kao nosači korišćeni GFNS(1:4) i GFNS(1:2) derivati sa srednjim vrednostima koncentracija epoksi grupa (440 i 520 $\mu\text{mol/g}$) (slika 4.26.). Najverovatnije je da su pri ovim koncentracijama epoksi grupa na površini GFNS derivata one pravilno raspoređene po površini čime su smanjene neželjene interakcije između vezanih molekula enzima i drugih grupa prisutnih na površini modifikovanih nanočestica. Značajno niže koncentracije imobilisane aktivnosti (oko 1300 IU/g) dobijene su prilikom imobilizacije na derivat GFNS(1:20) sa najmanjom koncentracijom epoksi grupa (360 $\mu\text{mol/g}$) i derivat GFNS(1:1) sa najvećom koncentracijom epoksi grupa (560 $\mu\text{mol/g}$).



Slika 4.26. Uticaj koncentracije epoksi grupa na koncentraciju imobilisane aktivnosti lipaze prilikom imobilizacije na GFNS derivate. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 600 mg/g; 1 M fosfatni pufer pH 7; vreme 3 h.

Na derivatu GFNS(1:20) sa koncentracijom epoksi grupa od 360 $\mu\text{mol/g}$ veliki deo silanol grupa ostaje nemođifikovan i imajući u vidu i kratku nožicu epoksi linkera kovalentno vezani enzimi mogu da reaguju sa tim silanol grupama što direktno utiče na strukturu imobilisanog enzima. S obzirom da dolazi do pada koncentracije imobilisane aktivnosti enzima očito je da ove interakcije nepovoljno utiču na sekundarnu strukturu imobilisanih molekula lipaza.²⁰¹ Najveća koncentracija epoksi grupa (560 $\mu\text{mol/g}$) omogućuje da dođe do „multi-point“ kovalentne imobilizacije koja isto tako u nekim slučajevima može da dovede do neželjene deformacije sekundarne strukture enzima i do gubitka aktivnosti.

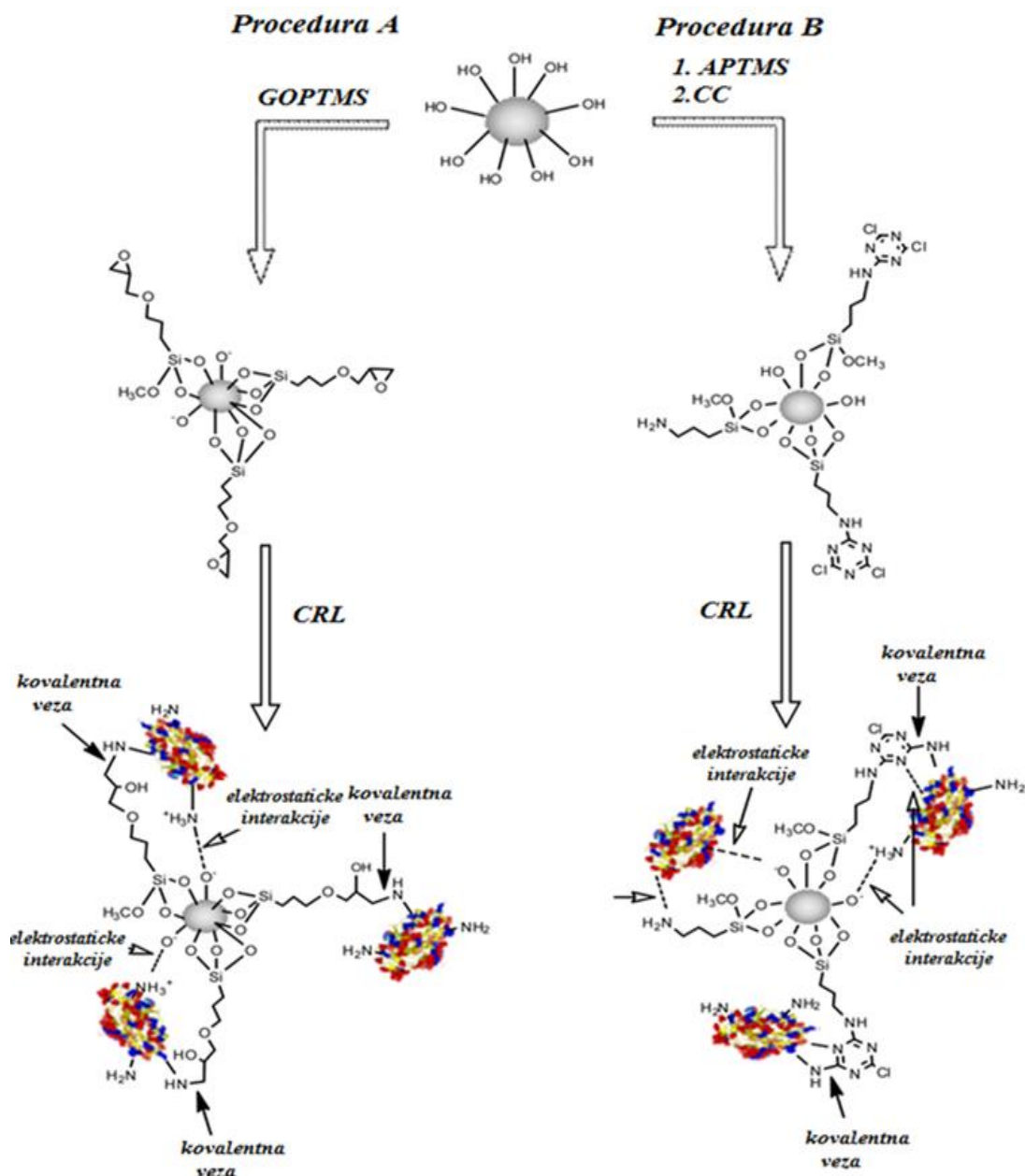
4.2.2.3. Desorpcija lipaza imobilisanih na epoksi-modifikovane nanočestice

Sumirajući sve prethodno iznete tvrdnje, postavljena je hipoteza da se imobilizacija lipaze na GOPTMS-om modifikovane nanočestice silike prvo dešava adsorpcijom preko elektrostatičkih ili hidrofobnih interakcija, a da potom dolazi do formiranja kovalentnih veza između nukleofilnih grupa molekula enzima i epoksi grupa modifikovanih nanočestica (šema 4.6.). Kako bi testirali da li je ova hipoteza tačna, izveden je eksperiment u kome su preparati dobijeni imobilizacijom lipaze na četiri GFNS derivata tretirani 1 M CaCl₂ i Tritonom X-100, radi desorpcije nekovalentno imobilisanih molekula enzima. Dobijeni rezultati su pokazali da su svi imobilisani enzimi nakon tretmana sa CaCl₂ i Tritonom X-100 zadržali oko 40 % od početne koncentracije imobilisane aktivnosti, što upućuje na zaključak da je oko 60 % enzima adsorbovano na površinu GFNS derivata formiranjem hidrofobnih i elektrostatičkih interakcija, a 40 % je formiralo kovalentne veze sa epoksi grupama GFNS derivata. Ovo znači da se sa povećanjem količine GOPTMS-a koja je korišćena za modifikaciju nije povećao udeo kovalentno vezanih enzima, verovatno zato što je broj mesta za vezivanje na površini GFNS derivata limitiran.

Sumiranjem svih iznetih rezultata i zaključaka može se konstatovati da je GFNS derivat GFNS(1:2) najpogodniji za imobilizaciju lipaza. Iako se derivat GFNS(1:4) pokazao kao najbolji u pogledu koncentracije imobilisane aktivnosti radi ekonomske efikasnosti postupka modifikacije i imobilizacije izabran je derivat (GFNS(1:2)) za čiju je pripremu bila potrebna duplo manja količina GOPTMS-a, a pri čemu je imobilisan enzim pokazao za svega 10 % manju koncentraciju imobilisane aktivnosti.

4.2.3. Poređenje aktivnosti i stabilnosti lipaza imobilisanih na funkcionalizovane nanosilike

Jasno je na osnovu svih prethodno izloženih rezultata da primenjena dva postupka modifikacije silika nanočestica kojima su na površinu ovih nanočestica uvedene različite grupe - amino i hlridne u prvom postupku, (šema 4.7. B) i epoksi grupe u drugom postupku (šema 4.7. A) - promovišu formiranje kovalentnih interakcija između lipaze i dobijenih modifikovanih nanočestica. Kako bi potpuno procenili uspešnost kovalentne imobilizacije lipaze na nanočestice silike dobijene pomoću ova dva postupka neophodno je uporediti njihove katalitičke osobine (koncentraciju imobilisane aktivnosti, termičku stabilnost i operativnu stabilnost).



Šema 4.7. Uporedni prikaz korišćenih metoda modifikacije nanočestica silike i kovalentne imobilizacije CRL na modifikovane nanočestice silike.

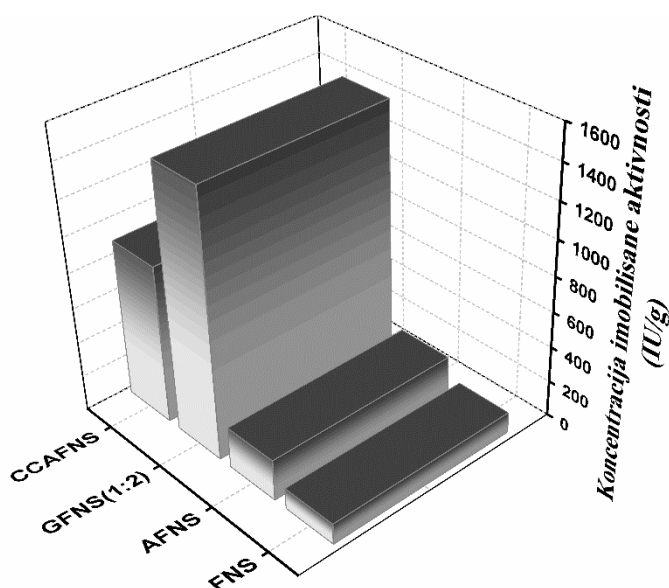
4.2.3.1. Poređenje aktivnosti imobilisane lipaze na različite nanočestice silike

Prvo je poređena koncentracija imobilisane aktivnosti lipaze imobilisane na FNS, AFNS, CCAFNS i GFNS (GFNS(1:2)) kako bi se procenilo koji od ovih imobilisanih preparata je moguće primeniti u sintezi estara na industrijskom nivou.

CCAFNS i GFNS su se pokazali efikasniji najmanje 4 puta što se tiče koncentracije imobilisane aktivnosti u odnosu na FNS i AFNS nanočestice na koje je ovaj enzim

imobilisan adsorpcijom. Sumirani rezultati koncentracija imobilisanih aktivnosti dobijenih reprezentativnih imobilisanih preparata su prezentovani na slici 4.27.

Prilikom imobilizacije enzima teži se razvitku metode koja će omogućiti kovalentnu imobilizaciju enzima s obzirom da ovaj način imobilizacije omogućava dobijanje imobilisanih enzimskih preparata povećane stabilnosti i/ili aktivnosti. Formirane kovalentne veze između enzima i nosača omogućavaju da ne dođe do spiranja enzima prilikom njegove višestruke upotrebe, pospešuju rigidnost strukture molekula vezanih enzima čime oni postaju otporni na tretman visokim temperaturama i tako omogućavaju širu primenu imobilisanih enzima u industriji.



Slika 4.27. Poređenje koncentracije imobilisane aktivnosti lipaze: imobilisane adsorpcijom na FNS i AFNS tokom 1 h u 1 M fosfatnom puferu pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 228 mg/g; kovalentno imobilisane na GFNS(1:2) i CCAFNS tokom 3 h u 1 M fosfatnom puferu pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 600 mg/g odnosno 228 mg/g.

Iz svih ovih razloga veoma je značajno da su primenjene modifikacije nanočestica silike omogućile kovalentnu imobilizaciju lipaze, a da nisu dovele do inaktivacije enzima (što je česta pojava tokom kovalentne imobilizacije).²⁰² Baš suprotno, došlo je do značajnog povećanja koncentracije imobilisane aktivnosti u odnosu na rezultate dobijene prilikom adsorpcije na FNS i AFNS (slika 4.27.).

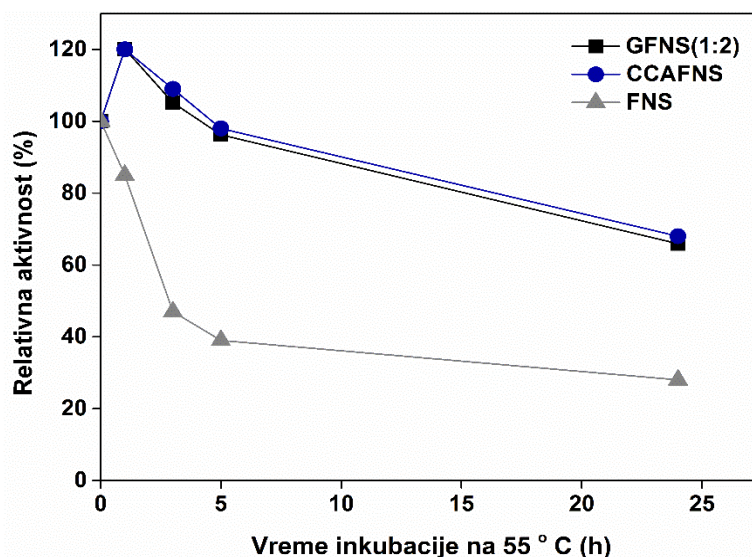
Uočava se da je koncentracija imobilisane aktivnosti na GFNS(1:2) 1495 IU/g skoro duplo veća od koncentracije imobilisane aktivnosti na CCAFNS (890 IU/g) u 1 M fosfatnom puferu. Kako se ove dve modifikacije ne razlikuju u dužini linkera, uzrok

razlike u koncentraciji imobilisane aktivnosti ne može biti u formiranim interakcijama između enzima i ovih nanočestica nego je verovatno posledica u različitoj hemiji formiranja kovalentnih veza. Na oba nosača lipaza se vezuje preko amino grupa prisutnih na površini molekula enzima. Međutim, velika je verovatnoća da postoji razlika u konformaciji vezanih molekula enzima i da su one povoljnije u slučaju vezivanja na epoksi-modifikovane nanočestice silike, što je dovelo do manjih sternih smetnji pri prilazu supstrata aktivnom centru a posledično do većih aktivnosti.

Prema tome iz ugla koncentracije imobilisane aktivnosti najefikasniji imobilisani preparat se dobija kovalentnom imobilizacijom lipaze u 1 M fosfatnom puferu na epoksi-modifikovane nanočestice silike (GFNS(1:2)).

4.2.3.2. Poređenje termičke stabilnosti kovalentno imobilisane lipaze na CCAFNS i GFNS

Opšte je poznato da kovalentna imobilizacija najčešće doprinosi stabilnosti imobilisanih enzima, a kako bi ustanovili da li je to tačno u slučajevima kovalentne imobilizacije lipaze na GFNS i CCAFNS izvedena je serija eksperimenata u kojima je proučavan uticaj temperature na stabilnost dobijenih imobilisanih preparata (slika 4.28.). Dobijena termička stabilnost kovalentno imobilisanih lipaza na GFNS i CCAFNS je upoređena sa termičkom stabilnošću adsorpcijom vezane lipaze na FNS.



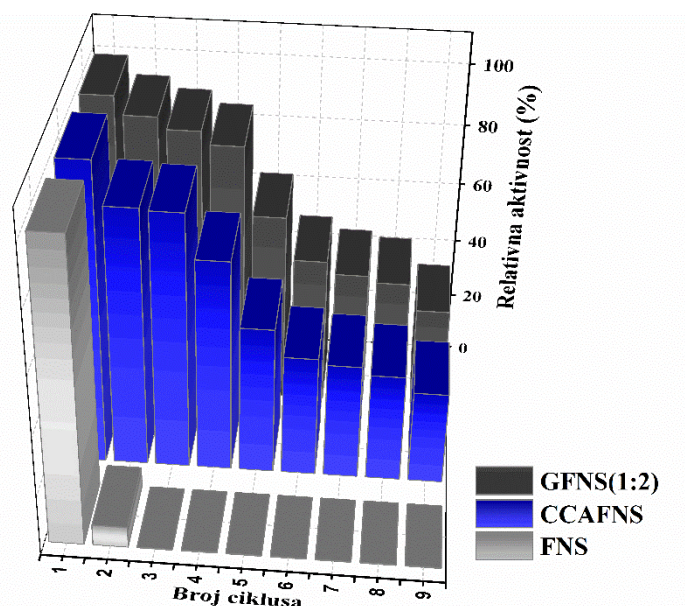
Slika 4.28. Ispitivanje termičke stabilnosti imobilisane lipaze na FNS, GFNS i CCAFNS na 55 °C. CRL je imobilisana na FNS, GFNS i CCAFNS u 1 M fosfatnom puferu 1 h za FNS, 3 h za CCAFNS i GFNS.

Na osnovu prikazanih rezultata na slici 4.28. vidi se da su kovalentno imobilisani enzimi na GFNS i CCAFNS pokazali značajno veću stabilnost nego prilikom adsorpcije na nemodifikovane nanočestice silike čime je potvrđena teza da kovalentnom imobilizacijom dolazi do stabilizacije molekula imobilisanih enzima u odnosu na one vezane adsorpcijom.²⁰³ Nakon inkubacije u trajanju od 24 h lipaza adsorbovana na FNS zadržala je 28 % od početne koncentracije imobilisane aktivnosti, dok je lipaza kovalentno imobilisana na CCAFNS i GFNS zadržala 68 % odnosno 65 % početne aktivnosti.

Može se još zaključiti da nema značajne razlike u termičkoj stabilnosti kovalentno imobilisanih enzima na CCAFNS i GFNS jer su formirane kovalentne veze u oba slučaja jednako stabilizovale strukturu imobilisanog enzima ne dozvoljavajući da dođe do njenog narušavanja prilikom tretmana toplotom.

4.2.3.3. Poređenje operativne stabilnosti kovalentno imobilisane lipaze na CCAFNS i GFNS

Nakon ispitivanja termičke stabilnosti ispitivana je i operativna stabilnost kovalentno imobilisanih preparata (slika 4.29.).



Slika 4.29. Operativna stabilnost imobilisane lipaze na FNS, GFNS i CCAFNS. CRL imobilisana na FNS u 1 M fosfatnom puferu tokom 1 h; na GFNS(1:2) i CCAFNS u 1 M puferu tokom 3 h.

S obzirom da je operativna stabilnost još jedna od značajnih karakteristika imobilisanih enzima koja definiše mogućnost njihove primene na industrijskom nivou.

Dobijeni rezultati za operativnu stabilnost su potvrdili kao i u slučaju termičke stabilnosti da je kovalentno imobilisana lipaza mnogo stabilnija u odnosu na adsorbovanu lipazu na FNS. Lipaza imobilisana na FNS je izgubila 83 % aktivnosti već nakon prve ponovne upotrebe dok je imobilisana na GFNS i CCAFNS zadržala 35 % aktivnosti nakon 9 ponovljenih upotreba (slika 4.29.).

Na kraju se može zaključiti da oba imobilisana preparata, lipaza imobilisana na CCAFNS kao i lipaza imobilisana na GFNS(1:2) u 1 M puferu, imaju visoke koncentracije imobilisane aktivnosti i visoku termičku i operativnu stabilnost što ukazuje na dobru perspektivu njihove primene na idustrijskom nivou.

Naredni eksperimenti izvedeni u sklopu ove doktorske disertacije će se odnositi na primenu kovalentno imobilisanih preparata u sintezi estara.

4.2.4. Primena lipaza imobilisanih na funkcionalizovane nanočestice silike u reakcijama sinteze estara

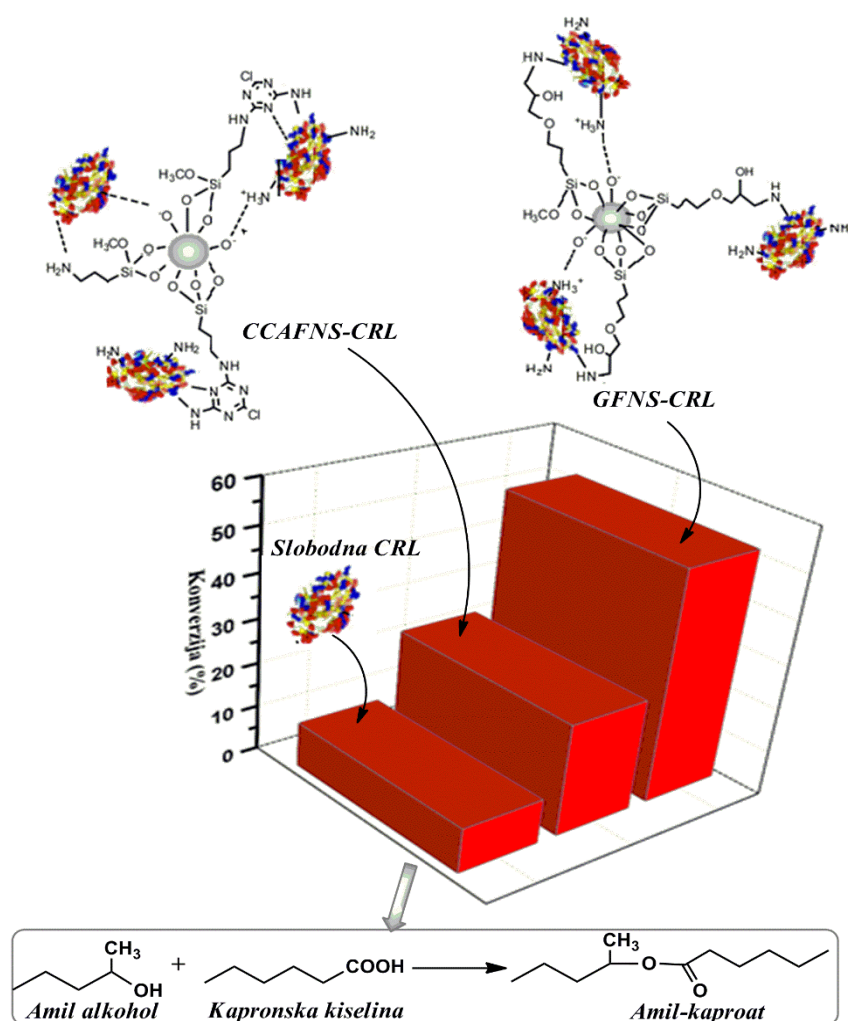
4.2.4.1. Primena imobilisane CRL u sintezi amil-kaproata

Pošto je kovalentno imobilisana lipaza na GFNS i CCAFNS pokazala izuzetnu aktivnost u reakciji hidrolize u vodenoj sredini, u cilju evaluacije primenjivosti ovih imobilisanih preparata u reakciji sinteze estara, dva najbolja imobilisana preparata lipaza su korišćena u sintezi amil-kaproata. Sinteza amil-kaproata je izabrana zbog njegove primene u industriji hrane kao veštačka aroma voća.²⁰⁴

Biljke imaju sposobnost da sintetišu, akumuliraju i oslobađaju isparljiva i neisparljiva organska jedinjenja koja se ponašaju kao arome zbog interakcija koje ostvaruju sa receptorima za miris i ukus čoveka. Ove supstance malih molekulskih masa derivati su masnih kiselina, amino kiselina i ugljenih hidrata koje formiraju zasićene, nezasićene, linearne, razgranate i ciklične estre ili etre. Aroma supstance izolovane iz biljaka komercijalno su jako značajne jer se koriste u industriji hrane, farmaceutskoj i hemijskoj industriji kao arome, lekovi, pesticidi i sirovine.²⁰⁴ Zbog male zastupljenosti aroma jedinjenja u njihovim prirodnim izvorima (biljkama), mnogi od prirodno izolovanih aroma jedinjenja su zamenjeni njihovim hemijski sintetisanim analogima već krajem prošlog veka. Pored toga, činjenica da se danas u svetu teži da supstance koje se koriste u industriji hrane, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji budu prirodne je još jedan od

razloga da se hemijska sinteza aroma jedinjenja zameni enzimskom sintezom. Aroma jedinjenja koja su sintetisana enzimskom sintezom se smatraju prirodnim i mogu u potpunosti zameniti aroma supstance izolovane iz prirodnih izvora.²⁰⁵ Aroma estri različitih alkohola i karboksilnih kiselina imaju značajnu ulogu u proizvodnji aromatičnih supstanci koje se koriste za poboljšanje organoleptičkih svojstava različitih proizvoda. Amilkaproat se koristi u proizvodima kao veštačka aroma voća i to u proizvodima sa ukusom ananasa, jabuke i kruške.²⁰⁴

Prilikom izvođenja sinteze amil-kaproata korišćene su ekvimolarne koncentracije amil alkohola i kapronske kiseline i izooktan kao rastvarač.¹⁶⁸ Reakcija je trajala 24 h, a esterifikacione aktivnosti lipaze imobilisane na GFNS (u 1 M puferu tokom 3 h i na derivat GFNS(1:2)) i CCAFNS (u 1 M puferu tokom 3 h) su upoređene sa esterifikacionom aktivnošću slobodne lipaze (šema 4.8.).



Šema 4.8. Šematski prikaz sinteze aroma estra pomoću imobilisane i slobodne lipaze.

U sve reakcije smeše je stavljena količina enzima koja obezbeđuje istu početnu koncentraciju hidrolitičke aktivnosti (33 IU/ml) jer se na taj način omogućava adekvatna procena specifičnosti lipaze prema reakciji esterifikacije.

Dobijeni rezultati su pokazali da je lipaza imobilisana na GFNS imala dva puta veću esterifikacionu aktivnost sa maksimalnom konverzijom od 52 % nakon 24 h u poređenju sa konverzijom od 25 % lipaze imobilisane na CCAFNS, dok je slobodna lipaza pokazala konverziju od 10 % što znači da su oba imobilisana preparata mnogo efikasnija u reakciji esterifikacije u odnosu na slobodnu lipazu (Tabela 4.8.).

Očigledno je i da vrsta primenjene modifikacije nanočestica silike ima uticaj na specifičnost imobilisane lipaze, s obzirom da je lipaza imobilisana na GFNS derivat pokazala dva puta veću aktivnost u reakciji esterifikacije. Verovatno je ovakav rezultat posledica veće hidrofobnosti GFNS u odnosu na CCAFNS, pošto se reakcija sinteze estara odigrava u mikrovodenoj sredini jer prisustvo vode u reakcionoj smeši promovise povratnu reakciju hidrolize estara.

Tabela 4.8. Sinteza amil-kaproata katalizovana lipazom imobilisanom na GFNS i CCAFNS. Vreme reakcije esterifikacije 24 h.

<i>Biokatalizator</i>	<i>Konverzija (%)</i>
<i>GFNS-CRL</i>	52
<i>CCAFNS-CRL</i>	25
<i>CRL</i>	10

Zato je od velikog značaja za visoku efikasnost u esterifikaciji da hidrofilitnost nosača bude što manja jer se time smanjuje verovatnoća zadržavanja vode u mikrokolini enzima i omogućavaju veći prinosi proizvoda.

Imobilisana lipaza na GFNS pored velike hidrolitičke aktivnosti, termičke i operativne stabilnosti, ima i poboljšane osobine za sintezu estara u organskoj sredini što je jako bitno jer se imobilisane lipaze mnogo koriste za sinteze različitih fiziološki aktivnih estara u organskim rastvaračima.²¹

4.2.4.2. Primena imobilisane CALB u sintezi estara vitamina C

Osnovni cilj imobilizacije CAL B na nanočestice silike je primena dobijenih imobilisanih preparata ovog enzima u reakciji sinteze askorbil-estara, pošto CRL ne pokazuje aktivnost u ovoj reakciji.²⁰⁶ Optimalni uslovi za imobilizaciju CRL na FNS, CCAFNS i GFNS

nanočestice koji su definisani u prvom delu ove doktorske disertacije su iskorišćeni kao osnova za imobilizaciju *Candida antarctica* lipaze B (CAL B). U odnosu na sintezu alifatičnih aroma estara, ova reakcija je specifična jer se, zbog hidrofilnosti vitamina C, primenjuju polarni organski rastvarači u kojima je CRL nestabilna.

Konkretno, pokušana je sinteza liposolubilnog biokompatibilnog antioksidanta askorbiloleata, a imobilizacija je izvedena na sve nanočestice po sledećoj proceduri: na 10 mg nanočestica je stavljeno 20 µl tečnog enzimskog preparata i 980 µl fosfatnog pufera (50 mM ili 1 M, pH 7).²⁰⁶ Imobilizacija je trajala od 1 do 3 h na 25 °C. Dobijene maksimalne vrednosti za koncentracije imobilisanih proteina i imobilisane aktivnosti imobilisanih preparata su predstavljene u Tabeli 4.9. Inicijalna koncentracija proteina prilikom imobilizacije CAL B na sve nanočestice je iznosila 24,68 mg/g nanočestica.

Pretpostavka je da se CAL B na FNS vezala adsorpcijom u maloj količini (svega 28 % od ponuđenih proteina) jer je došlo do dominantnog razvijanja odbojnih elektrostatičkih interakcija između hidrofilne negativno naelektrisane površine silika nanočestica i negativno naelektrisanih molekula CAL B pri ovim eksperimentalnim uslovima (pI za CAL B je 6).²⁰⁷

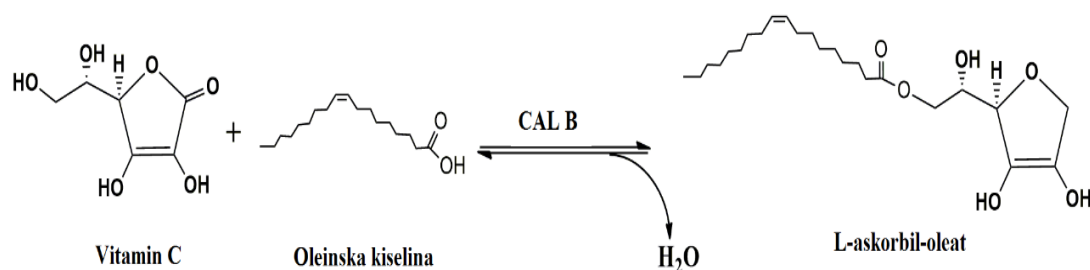
Tabela 4.9. Parametri imobilizacije CAL B na nanočestice silike.²⁰⁶

<i>Vrsta nanočestica</i>	<i>Uslovi imobilizacije</i>	<i>Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nanočestica)</i>	<i>Koncentracija imobilisane aktivnosti CALB (IU/g)</i>
<i>FNS</i>	50 mM pufer, 1 h	7	360,1
<i>CCAFNS</i>	1 M pufer, 3 h	16	1518,6
<i>GFNS</i>	1 M pufer, 3 h	9,5	138,75

Određeni mali udeo molekula se orijentisao tako da su izolovane pozitivno naelektrisane amino grupe na površini molekula CAL B uspostavile privlačne elektrostatičke interakcije. U skladu sa malom količinom vezanih proteina dobijena je proporcionalno mala koncentracija imobilisane aktivnosti CAL B na FNS nanočestice od 360 IU/g. Prilikom imobilizacije CAL B na CCAFNS došlo je do uspostavljanja kovalentnih veza između hloridnih grupa *s*-triazinskog prstena vezanog cijanuril-hlorida za površinu nanočestica i amino grupa molekula CAL B. Očito je da se CAL B vezao u aktivnoj

konformaciji na ove nanočestice s obzirom na visoke vrednosti ostvarene koncentracije imobilisane aktivnosti i prinosa imobilizacije proteina od 65 %. Kovalentnom imobilizacijom CALB na GFNS nanočestice u 1 M puferu dobijena je najmanja koncentracija imobilisane aktivnosti od samo 138,75 mg/g, pri čemu je i prinos imobilizacije proteina na ovim nanočesticama iznosio svega 38 %. Može se pretpostaviti da su uspostavljenije interakcije između vezanih CAL B molekula i GFNS nanočestica orjentisale enzime tako da je onemogućen prilaz supstrata aktivnom centru. Skoro duplo veće koncentracije imobilisanih proteina na CCAFNS nego na GFNS govore da ovaj enzim ima mnogo veći afinitet za formiranje interakcija sa hloridnim grupama CCAFNS nanočestica nego sa epoksidnim grupama.

Nakon karakterizacije imobilisanih preparata oni su primenjeni u sintezi askorbil-oleata radi ispitivanja njihove esterifikacione aktivnosti. Reakcija sinteze askorbil-oleata je izvedena na 60 °C, sa 0,135 M vitamina C, 0,2 % (w/v) lipaze, oleinskom kiselinom u višku (8:1) i 0,018 % (v/v) vode i acetonu kao rastvaraču (šema 4.9.).²⁰⁸



Šema 4.9. Reakcija sinteze L-askorbil-oleata katalizovana CAL B-om.

Dobijeni rezultati su pokazali da je reakcija CAL B imobilisana na FNS i CCAFNS dala podjednake prinose ovog estera (9,9 odnosno 10,2 mM) iako je koncentracija imobilisane aktivnosti CAL B na CCAFNS bila 5 puta veća od one koja je ostvarena na FNS (Tabela 4.10.).

Ako uporedimo ove prinose sa prinosima koji su literaturno dostupni oni su duplo manji od prinosa ostvarenih sa komercijalnim preparatom CAL B Novozymes 435²⁰⁸ ili jednaki onim prinosima koji su ostvareni sa CAL B imobilisanom na Eupergit C 250 L i Purolite A 109.²⁰⁶

Međutim, najveća esterifikaciona aktivnost je dobijena sa CAL B-om imobilisanim na GFNS (18,22 mM) bez obzira što je ovaj preparat imao najmanju koncentraciju imobilisane hidrolitičke aktivnosti.

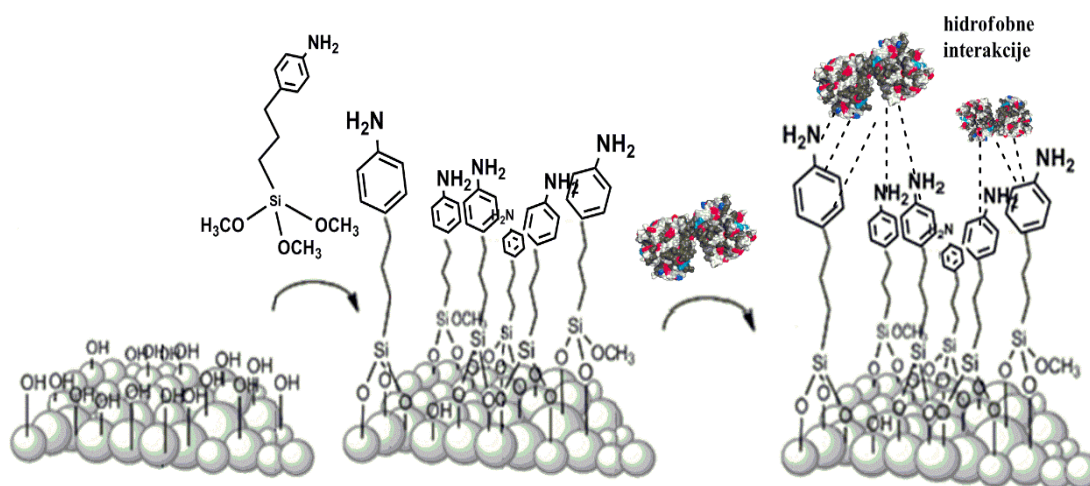
Tabela 4.10. Sinteza *L*-askorbil-oleata katalizovana imobilisanom CAL B.

<i>Biokatalizator</i>	<i>Prinos estera (mM)</i>
<i>FNS-CAL B</i>	9,9
<i>CCAFNS-CAL B</i>	10,2
<i>GFNS-CAL B</i>	18,22

Ovi rezultati su uskladu sa pretpostavkom iznetom u prethodnom poglavlju, pa se definitivno može zaključiti da reakciji sinteze estara puno više odgovara da se lipaza (bez obzira na poreklo) imobilise na manje hidrofilan nosač jer je kod njih manje vezane vode na površini nosača i samim tim je pospešena reakcija esterifikacije.

U cilju potpunijeg sagledavanja potencijala nanosilike u reakcijama esterifikacije u dodatnom eksperimentu je izvršena imobilizacija CAL B na nanočestice silike modifikovane fenilamino-organosilanom (PAPMS), koji je izrazito hidrofoban (šema 4.10.).

Optimizacija uslova modifikacije nanočestica silike PAPMS-om, kao i karakterizacija dobijenih fenil-amino modifikovanih nanočestica je opisana u poglavljima 4.1.2.3. i 4.1.2.6.



Šema 4.10. Šematski prikaz modifikacije silika nanočestica fenilamino-organosilanom i imobilizacije CAL B na fenilamino modifikovane silika nanočestice.

Prilikom imobilizacije CAL B na fenilamino-modifikovane nanočestice silike u 50 mM puferu tokom 1 h ostvarena je koncentracija imobilisanih proteina od 13 mg/g i koncentracija imobilisane aktivnosti od 1200,2 IU/g.

Uslovi reakcije sinteze askorbil estra su bili identični kao u sintezi estara sa ostalim nanočesticama.

U reakciji sinteze askorbil-oleata ovaj imobilisani preparat je dao prinos estra od 23,4 mM što je duplo više od imobilisanih CAL B na hidrofilne nanočestice silike i cijanuril-hloridom aktivirane amino-modifikovane nanočestice silike (CCAFNS).²⁰⁶ U odnosu na GFNS nanočestice dobijeni prinos ovog imobilisanog preparata je za 20 % veći (Tabela 4.10.).

4.3. Imobilizacija β -galaktozidaze iz *A. oryzae* na funkcionalizovane nanočestice silike

β -Galaktozidaza (β -D-galaktozid galaktohidrolaza, E.C.3.2.1.23) je enzim koji katališe raskidanje terminalnih, neredukujućih β -galaktozidnih veza u različitim molekulima galaktozida. Osnovni prirodni supstrati ovog enzima su laktoza, disaharidi (alolaktoza i galaktobioza) i polimeri galaktoze (galaktani).¹⁶¹

β -Galaktozidaza se već dugo koristi u industriji i primenjuje se za hidrolizu laktoze, pri čemu se molekul laktoze razlaže na molekul glukoze i molekul galaktoze. Na ovaj način se smanjuje koncentracija laktoze, i pojačava se sladak ukus dobijenog proizvoda, što pogoduje osobama koje su intolerantne na laktozu. Primenom β -galaktozidaze u prehrambenoj industriji poboljšava se digestibilnost, tehnološke i senzorne karakteristike konditorskih proizvoda, kondenzovanih i zaleđenih mlečnih proizvoda, rešava se problem prerade i odlaganja surutke koja nastaje kao nus-produkt u proizvodnji sireva.^{209, 210}

U poslednje vreme veliku pažnju je privukla sposobnost ovog enzima da katalizuje kinetički kontrolisanu reakciju transgalaktozilacije pri kojoj se galaktozni deo molekula prenosi na alternativni akceptor (šećeri, alkoholi ili aromatični glukozidi) pri odgovarajućim uslovima (visok sadržaj laktoze, visoke temperature, mala količina prisutne vode).^{211, 212} Galaktozidi dobijeni reakcijom transgalaktozilacije su fiziološki aktivni i mogu se koristiti kao prebiotici.^{213, 214}

Širok je spektar mogućnosti primene β -galaktozidaze na industrijskom nivou koje nisu u potpunosti iskorišćene zbog njene male stabilnosti. Jedna od alternativa da se problem male stabilnosti ovog enzima prevaziđe je imobilizacija. Do sada je pokušano da se β -galaktozidaza imobilizuje različitim metodama koje uključuju adsorpciju,²¹⁵ kovalentno vezivanje,²¹⁶ „cross linking“²¹⁷ i inkapsulaciju¹⁶¹ korišćenjem različitih neorganskih materijala, sintetskih i prirodnih polimera.^{159 44, 210, 218}

4.3.1. Imobilizacija β -galaktozidaze na nanočestice silike modifikovane amino-organosilanom

U okviru ovog poglavlja biće proučavan mehanizam imobilizacije komercijalne β -galaktozidaze izolovane iz plesni *A. oryzae* na nemodifikovane nanočestice silike (FNS), amino-modifikovane nanočestice silike (AFNS) kao i na cijanuril-hloridom aktivirane nanočestice silike (CCAFNS), pri različitim uslovima (pH, vreme trajanja imobilizacije,

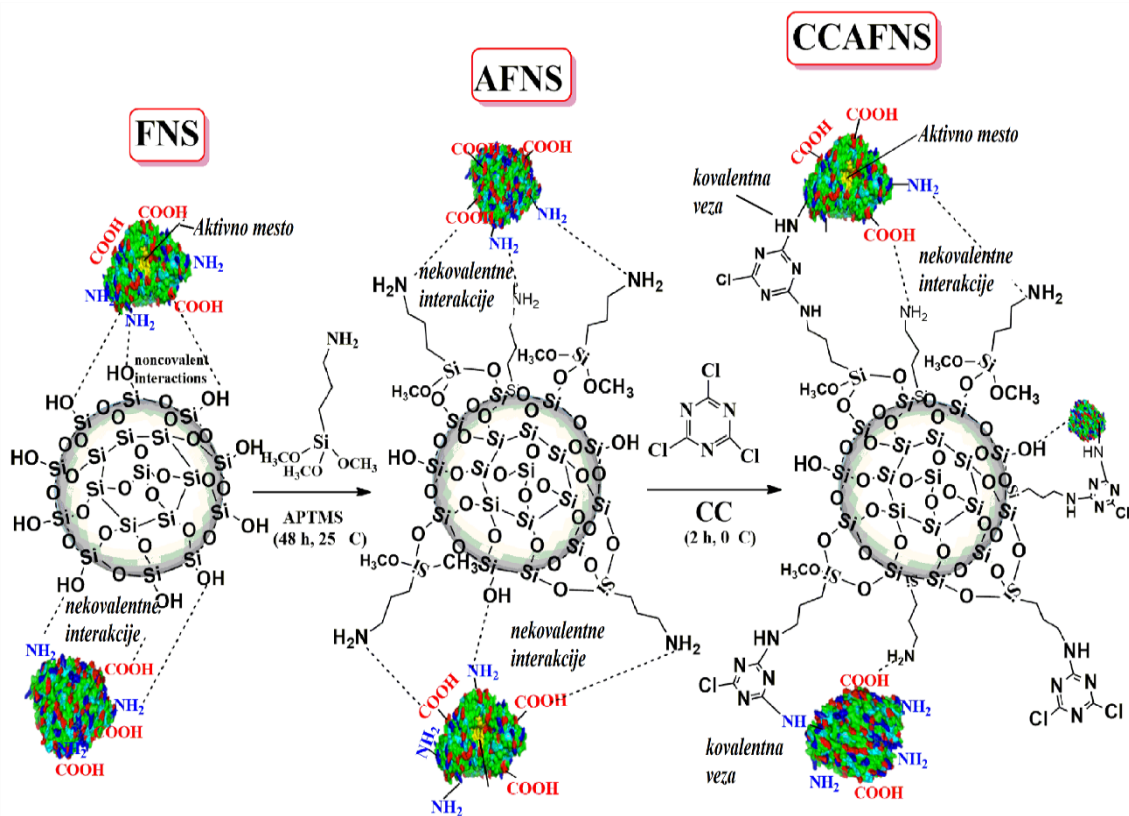
inicijalne koncentracije proteina), a sve u cilju da se dobije što aktivniji i/ili stabilniji imobilisan enzim. Krajnji cilj je dobijanje imobilisanih preparata koji bi mogli biti primenjeni u reakciji sinteze bioaktivnih galaktozida. Smatrano je da epoksi-modifikovane nanočestice (GFNS), koje su takođe korišćene za imobilizaciju lipaze, nisu adekvatni nosači za imobilizaciju β -galaktozidaze. U prilog ovoj tvrdnji doprinose istraživanja koja su objavljena u sklopu doktorske disertacije koja je rađena na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju i u kojoj je između ostalog izučavana i imobilizacija β -galaktozidaze na epoksi makročestice Eupergit C, Eupergit C 250 L i epoksi-modifikovan epihlorhidrinom Purolite A 109.¹⁶¹ Dobijena aktivnost imobilisane *A. oryzae* β -galaktozidaze na ove epoksi-nosače je zanemarljivo mala.

4.3.1.1. Efikasnost imobilizacije proteina β -galaktozidaze

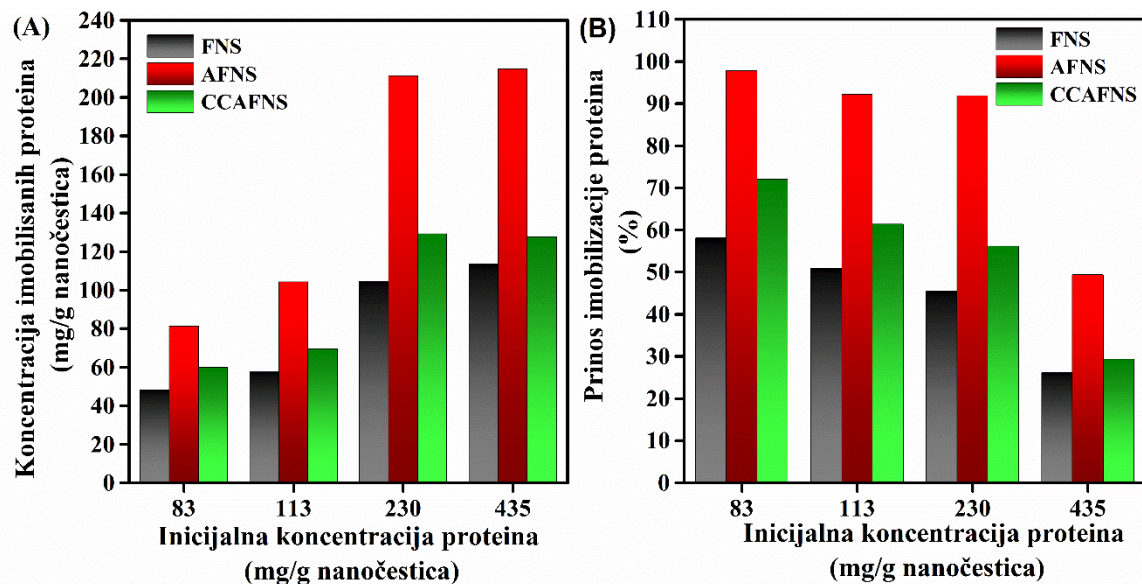
Pošto je kinetika imobilizacije proteina detaljno proučena u imobilizaciji lipaze iz *C. rugosa*, u početnom delu istraživanja imobilizacije β -galaktozidaze analiziran je uticaj inicijalne koncentracije proteina (mg/g nanočestica) na koncentraciju imobilisanih proteina (mg/g nanočestica) i prinos imobilizacije proteina (%) nakon 3 h imobilizacije (slika 4.30.), kako bi odredili kapacitete za vezivanje β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice (šema 4.11.). Imobilizacija β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS izvedena je pri četiri različite inicijalne koncentracije proteina (83, 113, 230 i 435 mg/g nosača). Metodologija imobilizacije kao i metodologija određivanja koncentracije imobilisanih proteina opisane su u poglavljima 3.2.3.2. i 3.2.5.2.

Analizom dobijenih rezultata koji su prikazani na slici 4.30. (A) uočava se da koncentracija imobilisanih proteina raste sa porastom “početne” koncentracije proteina do 230 mg/g, dok dalje povećanje na 435 mg/g nije dovelo do povećanja koncentracije imobilisanih proteina prilikom imobilizacije na sve tri vrste nanočestica. Može se zaključiti da je maksimalni kapacitet za vezivanje β -galaktozidaze na FNS nanočestice 113 mg/g nanočestica, 214 mg/g na AFNS nanočestice i 127 mg/g za CCAFNS nanočestice.

Ostvarene vrednosti za koncentraciju imobilisanih proteina na FNS, AFNS i CCAFNS nanočesticama prevazilaze literaturno dostupne vrednosti koje su dobijene prilikom imobilizacije ovog enzima na Fe₃O₄-hitozan nanočestice i kalcijum-hloridom aktivirane fibrinogen nanočestice.^{216, 219, 220}



Šema 4.11. Imobilizacija β -galaktozidaze na nemodifikovane (FNS), amino-modifikovane (AFNS) i cijanuril-hloridom aktivirane amino-modifikovane (CCAFNS) nanočestice silike.



Slika 4.30. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS.. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna

koncentracija proteina: 83, 113, 230 i 435 mg/g; 0,1 M acetatni pufer pH 4,5; vreme imobilizacije 3 h.

Dodatno, FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice poseduju veću površinu dostupnu za vezivanje β -galaktozidaze u poređenju sa konvencionalnim nosačima što je dovelo do toga da kapaciteti za vezivanje β -galaktozidaze ovih nanočestica budu značajno veći od kapaciteta čestica kao što su npr. Purolite, Dilute A568 i Eupergit C 250L.^{212, 215, 221}

Ako analiziramo efikasnost vezivanja β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS u kontekstu prinosa imobilizacije proteina može se videti da su se pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 83 mg/g na površinu AFNS vezali skoro svi ponuđeni proteini (97,82 %) (slika 4.30. (B)). Visok prinos imobilizacije proteina (91 %) pri višoj vrednosti inicijalne koncentracije proteina (230 mg/g nanočestica) govori da se efikasna imobilizacija i dalje odigrava. Međutim dalje povećanje inicijalne koncentracije proteina na 435 mg/g se pokazalo kao neopravdano pošto dolazi do pada prinosa imobilizacije proteina na 52 %.

Prilikom imobilizacije β -galaktozidaze na FNS i CCAFNS sličan trend je uočljiv kao i pri imobilizaciji na AFNS s tim da je efikasnost imobilizacije nešto manja. Prinos imobilizacije proteina za FNS i CCAFNS nanočestice iznosi 58,06 % odnosno 71,96 % pri najmanjoj inicijalnoj koncentraciji proteina (83 mg/g). Pri najvećoj inicijalnoj koncentraciji proteina za obe vrste nanočestica prinos imobilizacije proteina pada na 30 %.

Poređenjem imobilizacije β -galaktozidaze i lipaze na FNS, AFNS i CCAFNS uočava se da prilikom imobilizacije oba enzima na FNS dobijaju slične vrednosti za maksimalnu koncentraciju imobilisanih proteina i one iznose 113 za β -galaktozidazu odnosno 108 mg/g za lipazu. Međutim prilikom imobilizacije ovih enzima na AFNS i CCAFNS nanočestice 70 % odnosno 20 % veći afinitet je ispoljila β -galaktozidaza u odnosu na lipazu. Dakle, β -galaktozidaza je ostvarila najveću koncentraciju imobilisanih proteina na AFNS, a lipaza na FNS. Razlika u afinitetu pri vezivanju ova dva enzima na FNS, AFNS i CCAFNS je posledica različite strukture molekula ova dva enzima.

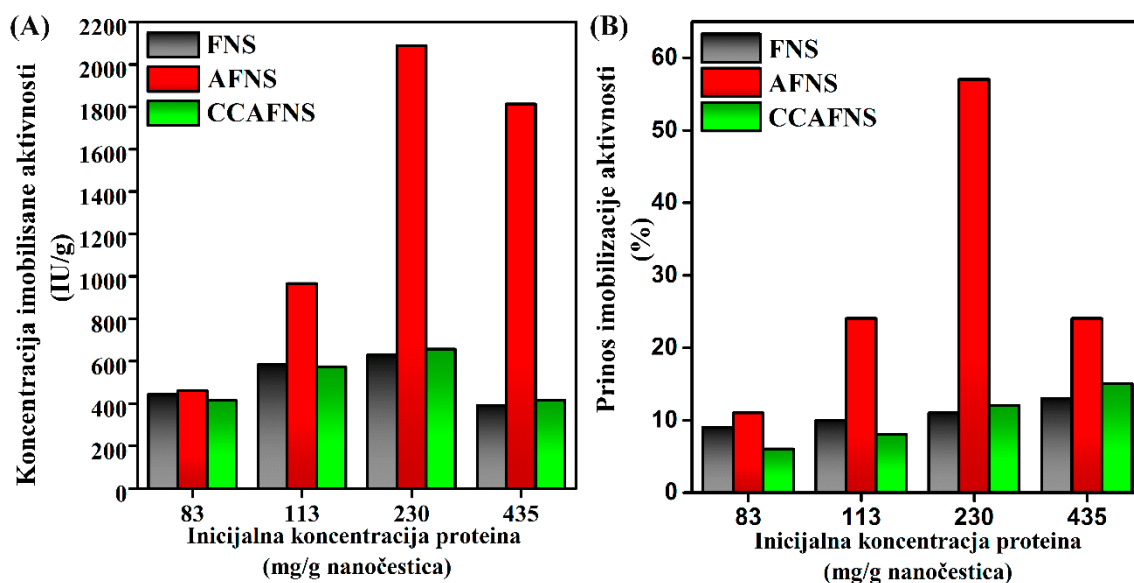
4.3.1.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti β -galaktozidaze na nanočestice silike

Iako se pokazalo da su kapaciteti FNS, AFNS i CCAFNS nanočestica izvrsni, kako bi u potpunosti procenili podobnost ovih nanočestica za imobilizaciju β -galaktozidaze uticaj

inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti β -galaktozidaze i prinos imobilizacije aktivnosti mora biti analiziran (slika 4.31.).

Koncentracija imobilisane aktivnosti enzima na FNS, AFNS i CCAFNS je određivana u reakciji hidrolize *o*-nitrofenil- β -galaktozida po proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.4.2., dok je prinos imobilizacije aktivnosti preračunat po formuli 3.1.

Za sve tri vrste ispitivanih nanočestica koncentracija imobilisane aktivnosti ima isti trend kao koncentracija imobilisanih proteina, što znači da sa povećanjem inicijalne koncentracije proteina do 230 mg/g i koncentracija imobilisane aktivnosti enzima raste. Pri najvećoj inicijalnoj koncentraciji proteina (435 mg/g) uočava se pad koncentracije imobilisane aktivnosti od 20 % za imobilisan enzim na AFNS, dok je pad koncentracije imobilisane aktivnosti enzima na FNS i CCAFNS čak 40 % (slika 4.31.).



Slika 4.31. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 83, 113, 230 i 435mg/g; 0,1 M acetatni puffer pH 4,5; vreme 3 h.

Ovi padovi u koncentraciji imobilisane aktivnosti pri najvišoj inicijalnoj koncentraciji proteina mogu se objasniti činjenicom da su pri visokim koncentracijama imobilisanih proteina enzimi gusto pakovani na površini nanočestica pa može da dođe do njihove aglomeracije, a samim tim i do gubitka aktivnosti.³ Takođe, sterne smetnje koje mogu nastati između susednih funkcionalnih grupa nosača i enzima mogu onemogućiti difuziju supstrata i tako dovesti do smanjenih koncentracija imobilisane aktivnosti enzima.²²²

Ovaj fenomen je uočen i pri imobilizaciji β -galaktozidaze na jonoizmenjivačku smolu Duolite A568.²²¹

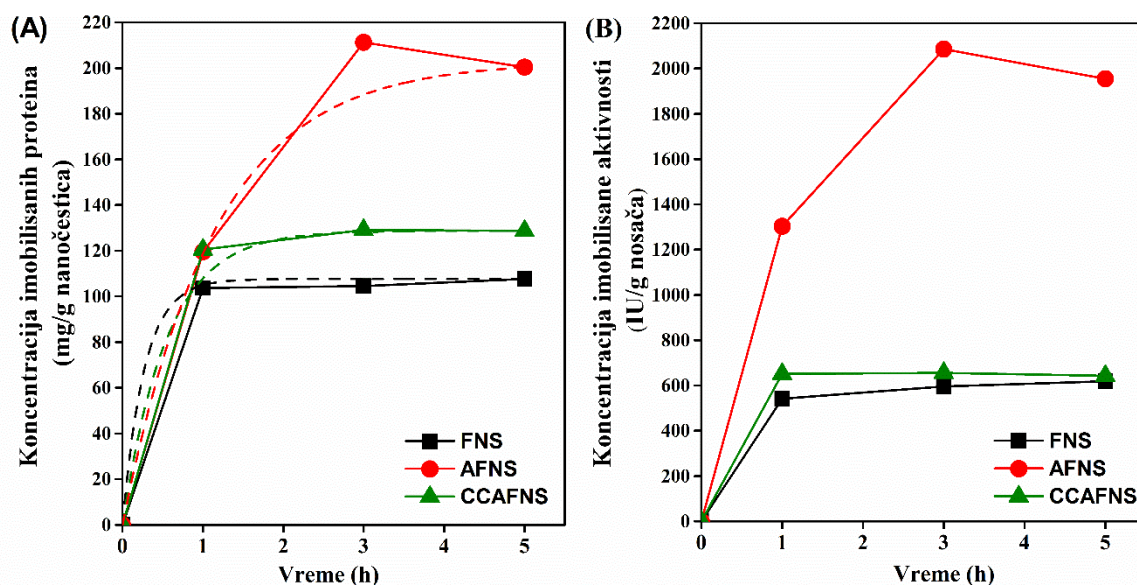
Potrebno je naglasiti da su postignute koncentracije imobilisane aktivnosti β -galaktozidaze na AFNS od približno 2100 IU/g oko 70, 7 i 4 puta veće u odnosu na dobijene vrednosti prilikom imobilizacije β -galaktozidaze na Purolite A109²¹², mezo-, makro porozne glioksil-silika čestice i glioksil-agarozu, redom.²²³ U slučajevima imobilizacije β -galaktozidaze na nosače nano-dimenzija, vrednost od 2100 IU/g je dva puta veća u odnosu na dobijenu vrednost prilikom imobilizacije β -galaktozidaze na magnetne nanočestice na bazi grafena.²²⁴

Najveći prinosi imobilizacije aktivnosti su ostvareni prilikom imobilizacije β -galaktozidaze na AFNS nanočestice i kreću se od 11 %, koliko je ostvareno pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 83 mg/g, do 57 % pri inicijalnoj koncentraciji od 230 mg/g. Shodno padu koncentracije imobilisane aktivnosti koja se dešava pri 435 mg/g došlo je do pada i prinosa imobilizacije aktivnosti na 24 %. Prinosi imobilizacije aktivnosti na FNS i CCAFNS nanočesticama su veoma slični i kreću se u opsegu od 6 do 15 %.

Može se zaključiti na osnovu izloženih činjenica da su FNS, AFNS i CCAFNS pogodni nosači za imobilizaciju *A. oryzae* β -galaktozidaze. Sumirajući prezentovane rezultate iz konteksta koncentracije imobilisanih proteina i koncentracije imobilisane aktivnosti enzima dolazi se do zaključka da se najbolji rezultati dobijaju kada se imobilizacija vrši pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 230 mg/g nanočestica.

Radi detaljnije optimizacije procesa imobilizacije β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS praćena je promena koncentracije imobilisane aktivnosti (IU/g) i koncentracije imobilisanih proteina (mg/g) tokom 5 h (slika 4.32.).

Rezultati koji su prikazani na slici 4.32., ukazuju da AFNS, od sve tri vrste nanočestica, ima najprikladniju funkcionalnu grupu za imobilizaciju β -galaktozidaze iz oba aspekta, koncentracije imobilisanih proteina i koncentracije imobilisane aktivnosti dobijenog imobilisanog preparata. Proučavanjem kinetike vezivanja β -galaktozidaze vidi se da se na AFNS vezalo oko 50 % ukupne količine imobilisanih enzima u prvih sat vremena, dok je tada dostignut maksimum koncentracije imobilisanih proteina na FNS (103,7 mg/g) i CCAFNS (129,18 mg/g).



Slika 4.32. Uticaj vremena na promenu koncentracije imobilisane aktivnosti (A) i koncentracije imobilisanih proteina (B) tokom imobilizacije β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 230 mg/g; 0,1 M acetatni pufer pH 4,5; vreme 0-5 h.

Maksimum koncentracije imobilisanih proteina od 211,24 mg/g na AFNS je dostignut nakon 3 h od početka imobilizacije. Isti trend ima i koncentracija imobilisane aktivnosti sa maksimumom od 2087 IU/g nakon 3 h od početka imobilizacije za imobilisan enzim na AFNS, dok su maksimumi koncentracije imobilisane aktivnosti β -galaktozidaze na FNS i CCAFNS dostignuti nakon 1 h i iznose 629 IU/g odnosno 658 IU/g (slika 5.32. (B)).

“Fitovanjem” rezultata za koncentraciju imobilisanih proteina kinetikom pseudo-prvog reda (isprekidane krive na slici 4.32. (A)) dobija se da su ravnotežne koncentracije imobilisanih proteina postignute nakon 1 h na FNS i CCAFNS nanočesticama i iznose 107,65 i 128,78 mg/g. Razlike u odnosu na eksperimentalne rezultate za koncentraciju imobilisanih proteina su manje od 1 %. Pa se može usvojiti da se β -galaktozidaza na FNS i CCAFNS vezuje kinetikom pseudo-prvog reda. Što se tiče imobilizacije β -galaktozidaze na AFNS nanočestice “fitovanjem” sa modelom pseudo-prvog reda pokazalo je da se ravnotežna koncentracija imobilisanih enzima uspostavlja tek nakon 5 h i iznosi 202,7 mg/g. Razlika između eksperimentalno dobijene vrednosti za koncentraciju imobilisanih proteina nakon 3 h se od teorijske vrednosti dobijene po modelu razlikuje za 7 %. Pa se može usvojiti i da se imobilizacija i na AFNS odigrava po modelu pseudo-prvog reda.

4.3.1.3. Poređenje katalitičke aktivnosti dobijenih nano-biokatalizatora

Sumirane karakteristike imobilisane β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS su predstavljene u Tabeli 4.11.

Može se primetiti da su svi praćeni parametri imobilizacije najbolji kada je β -galaktozidaza imobilisana na amino-modifikovane nanočestice silike (AFNS) (Tabela 4.11.).

Prilikom imobilizacije β -galaktozidaze na AFNS ostvareni su prinosi imobilizacije proteina od 91 % i aktivnosti od 57 % što je rezultiralo da imobilisan enzim ima specifičnu aktivnost od 9 IU/mg proteina. Prinosi imobilizacije aktivnosti su 5 puta veći prilikom imobilizacije na AFNS u odnosu na FNS i CCAFNS dok je specifična aktivnost skoro duplo veća nego na FNS i CCAFNS.

Tabela 4.11. Poređenje parametara imobilizacije β -galaktozidaze na FNS, AFNS i CCAFNS pri pH 4,5 i ponuđenim proteinima od 230 mg/g. Imobilizacija trajala 3 h za CCAFNS, a 1 h za FNS i AFNS.

<i>Nanočestice</i>	<i>Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nosača)</i>	<i>Prinos imobilizacije proteina (%)</i>	<i>Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g)</i>	<i>Prinos imobilizacije aktivnosti (%)</i>	<i>Specifična aktivnost (IU/mg proteina)</i>
FNS	107	45	629	10	5
AFNS	211	91	2087	52	9
CCAFNS	129	56	658	14	5

Zaključak koji se nameće na osnovu ovih rezultata je da je mnogo povoljnija imobilizacija β -galaktozidaze ako se dešava preko karboksilnih grupa molekula enzima nego preko amino grupa. Ova tvrdnja je u skladu sa zaključcima koji su izvedeni prilikom imobilizacije β -galaktozidaze na Purolite A109 koji je jonoizmenjivačka smola sa primarnim amino grupama na površini.²¹²

U skladu sa ovim saznanjima imobilizacija β -galaktozidaze na epoksi-modifikovane nanočestice silike (GFNS) je smatrana neracionalnom s obzirom da bi u slučaju imobilizacije na ove čestice imobilizacija išla prvenstveno preko amino grupa molekula ovog enzima.

4.3.1.4. Mehanizam imobilizacije β -galaktozidaze na nanočestice silike

Imobilizacija na AFNS se verovatno pretežno odigrava preko privlačnih elektrostatičkih interakcija između primarnih amino grupa AFNS nanočestica i karboksilnih funkcionalnih grupa (asparaginske i glutaminske kiseline) koje se nalaze na površini molekula β -galaktozidaze (šema 4.11.). Bazni aminokiselinski ostaci (lizina i arginina) koji se nalaze na površini molekula β -galaktozidaze smanjuju mogućnost imobilizacije jer su u uslovima u kojim se odigrava imobilizacija pozitivno naelektrisani pa neminovno dolazi do odbojnih elektrostatičkih interakcija između njih i površine AFNS.

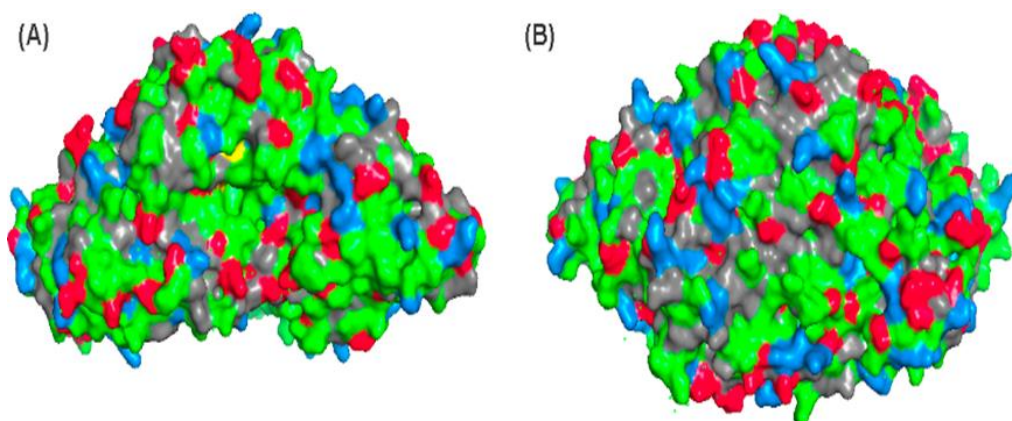
Pošto su grupe koje učestvuju u formiranju privlačnih i odbojnih interakcija slabe baze i kiseline, pH pri kome se vrši imobilizacija ima značajan uticaj pa je iz tog razloga urađen dodatni eksperiment u kome je ispitan uticaj pH na imobilizaciju β -galaktozidaze na AFNS.

Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.12. i pokazuju da je najefikasnija imobilizacija ovog enzima na AFNS u acetatnom puferu pH 5. Uticaj koji pH ima na imobilizaciju može se objasniti činjenicom da su enzimi skloniji da reaguju sa pozitivno naelektrisanim funkcionalnim grupama nosača ako su oni sami globalno negativno naelektrisani, a što se dešava pri pH vrednostima višim od njihove pI. β -galaktozidaza iz *A. oryzae* ima pI oko 4,6.²²⁵ Međutim, ukupno površinsko naelektrisanje molekula enzima nije jedini faktor koji utiče na efikasnost adsorpcije enzima preko elektrostatičkih interakcija, već raspored naelektrisanih aminokiselinskih ostataka u molekulu enzima takođe utiče na efikasnost adsorpcije elektrostatičkim interakcijama tako što diktira orijentaciju adsorbovanih molekula na površini nosača.

Tabela 4.12. Uticaj pH na efikasnost imobilizacije β -galaktozidaze na AFNS. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 230 mg/g; 0,1 M acetatni puffer; vreme 3 h.

<i>pH acetatnog pufera</i>	<i>Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g)</i>
4	1350
4,5	2087
5	2284
6	921
7	466

Pošto je površina AFNS nanočestica pozitivno naelektrisana na svim ispitivanim pH vrednostima može se pretpostaviti da raspored negativno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka na površini enzima kao i osobine aminokiselinskih ostataka u njihovoj okolini dovode do velikih odstupanja u efikasnosti imobilizacije pri različitim pH vrednostima. Kako bi uticaj koji pH ima na imobilizaciju β -galaktozidaze bio što bolje objašnjen na slici 4.33. je prikazan molekul *A. oryzae* β -galaktozidaze sa rasporedom aminokiselinskih ostataka koji su bitni za adsorpciju na površinu AFNS nanočestica.



Slika 4.33. 3D prikaz molekula *A. oryzae* β -galaktozidaze. Aminokiseline čiji bočni ostaci imaju amino grupe su plavo obojeni, karboksilne grupe crveno obojeni i hidrofobne grupe sivo obojeni. Frontalna strana molekula (A). Rotiran molekul β -galaktozidaze za 180° u x-y ravni (B). 3D struktura *A.oryzae* β -galaktozidaze je dobijena pomoću Pymol-a i podataka iz banke proteina (na engl. Protein Data Bank).

PDB broj za ovaj enzim je 4IUG.

Prema dostupnim literaturnim podacima o pK vrednostima jonizujućih grupa u molekulima proteina prosečne pKa vrednosti asparaginske i glutaminske kiseline su oko 4, ali pKa pojedinačnih molekula ovih kiselina varira od 1 do 9 u zavisnosti od sredine u kojoj se nalaze.²²⁶⁻²²⁹ Naime, pK vrednosti karboksilnih grupa rastu u hidrofobnoj okolini, a to je naročito izraženo ako se karboksilne grupe nalaze delimično ili potpuno zarobljene u unutrašnjosti molekula proteina. U prisustvu pozitivno naelektrisanih grupa pKa vrednosti karboksilnih grupa opadaju.²²⁶

Ako primenimo ove činjenice na imobilizaciju β -galaktozidaze na AFNS možemo pretpostaviti da karboksilne grupe koje se nalaze na površini molekula β -galaktozidaze na suprotnoj strani od aktivnog centra okružene velikim brojem amino grupa (slika 4.33.

(B)) imaju pKa vrednosti manje od 4 što znači da su naelektrisane pri svim ispitivanim pH vrednostima. Samim tim je neminovno da dođe do stvaranja privlačnih elektrostatičkih interakcija između ovih negativno naelektrisanih karboksilnih grupa i pozitivno naelektrisanih amino grupa AFNS nanočestica. Privlačne elektrostatičke interakcije između enzima i AFNS nanočestica će se uspostaviti samo u slučaju kada je molekul enzima orjentisan tako da se imobilizacija dešava na strani molekula enzima koja je suprotna u odnosu na aktivni centar.

Međutim, u okolini aktivnog centra koncentracija karboksilnih grupa je veća nego amino grupa, a njihova okolina je značajno hidrofobnija što dovodi do povećanja njihovih pKa vrednosti iznad prosečne vrednosti (pKa 4). Ovo implicira da karboksilne grupe u okolini aktivnog centra postaju naelektrisane samo pri pH većoj od 5. Pri pH vrednostima većim od 5 adsorpcija će se desiti usled uspostavljanja privlačnih elektrostatičkih interakcija između karboksilnih grupa koje se nalaze u okolini aktivnog centra molekula enzima. Adsorpcija će biti dodatno olakšana zbog odsustva odbojnih sila usled male koncentracije pozitivno naelektrisanih amino grupa (slika 4.33. (A)). Kako se ove karboksilne grupe nalaze u okolini aktivnog centra prilikom adsorpcije preko njih molekul enzima će biti orijentisan stranom na kojoj se nalazi aktivni centar na površini AFNS nanočestice. Kao posledica ovakve orijentacije dolazi do stvaranja sternih smetnji prilikom prilaska supstrata aktivnom centru što direktno utiče na smanjenje aktivnosti imobilisanog enzima. Iz tog razloga koncentracija imobilisane aktivnosti β -galaktozidaze na AFNS opada sa porastom pH vrednosti acetatnog pufera jer koncentracija imobilisane aktivnosti pH 5 ona najveća i iznosi 2284 IU/g, pri pH 6 iznosi 921 IU/g, a dok pri pH 7 iznosi svega 466 IU/g.

Sumiranjem svih prethodno iznetih tvrdnji, može se zaključiti da se imobilizacija β -galaktozidaze na AFNS nanočestice pri pH 4,5 dominantno odigrava adsorpcijom stvaranjem privlačnih elektrostatičkih interakcija između negativno naelektrisanih karboksilnih grupa koje se nalaze na površini molekula enzima nasuprot aktivnom centru i pozitivno naelektrisanih amino grupa AFNS nanočestica. Stvorene interakcije orijentišu molekul enzima tako da je olakšan pristup supstrata aktivnom centru što je rezultiralo visokim vrednostima aktivnosti imobilisanog enzima (2087 IU/g).

Suprotno od AFNS nanočestica, FNS su negativno naelektrisane na pH 4,5, pa prilikom imobilizacije β -galaktozidaze dolazi do formiranja privlačnih elektrostatičkih interakcija

između pozitivno naelektrisanih amino grupa u okolini aktivnog centra i negativno naelektrisanih silanol grupa FNS nanočestica. U ovom slučaju adsorpcija se dešava preko grupa prisutnih u okolini aktivnog centra što dovodi do otežanog pristupa supstrata aktivnom centru. Kao rezultat ovakvog formiranja veza koncentracija imobilisane aktivnosti β -galaktozidaze na AFNS je tri puta veća u odnosu na koncentraciju imobilisane aktivnosti (629 IU/g) koja je dobijena prilikom imobilizacije na FNS.

Ipak trebalo bi naznačiti da pored elektrostatičkih interakcija između molekula enzima i nanočestica mogu biti formirane i hidrofobne interakcije, slabe Van der Waals-ove sile i vodonične veze. Njihov doprinos je značajan jer stabilišu konformaciju adsorbovanih molekula na ove nanočestice preko dominantnih elektrostatičkih interakcija. Takođe, važno je imati u vidu da se enzim na AFNS vezuje na većoj udaljenosti od površine nosača jer je amino grupa uvedena na propilnoj „nožici“ modifikujućeg agensa.

Imobilizacija β -galaktozidaze na CCAFNS nanočestice dominantno se dešava stvaranjem kovalentnih veza između amino grupa molekula enzima lokalizovanih na njegovoj površini i slobodnih atoma hlora *s*-triazinskog prstena cijanuril-hlorida vezanih na površinu CCAFNS nanočestica. Može se pretpostaviti da su formirane veze orijentisale imobilisan enzim na takav način da je aktivni centar ostao blokiran za prilaz supstrata. Kao rezultat koncentracija imobilisane aktivnosti β -galaktozidaze na AFNS je skoro tri puta veća od aktivnosti imobilisanog enzima na CCAFNS, a skoro indentična ostvarenoj koncentraciji imobilisane aktivnosti na FNS.

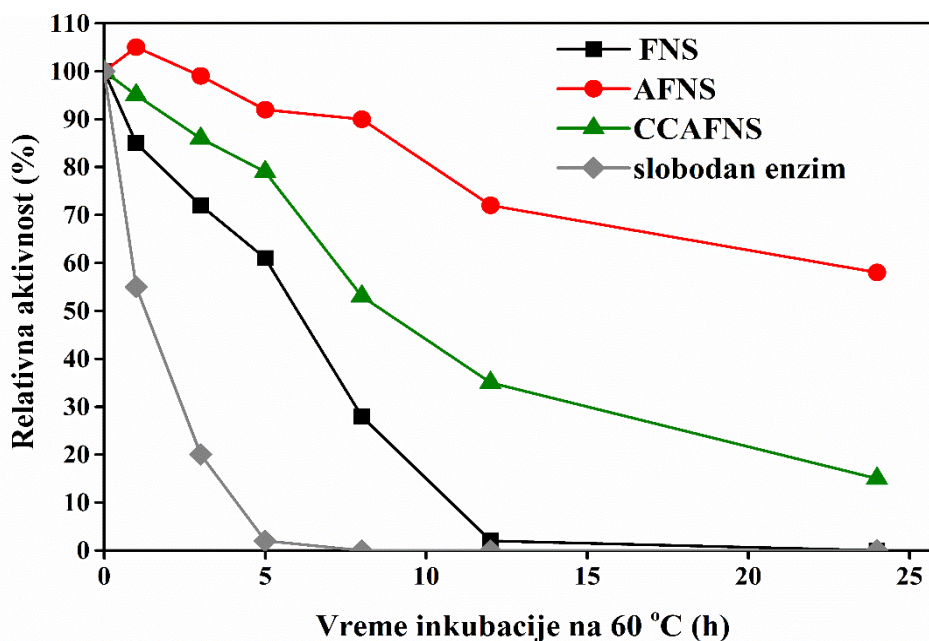
4.3.1.5. Termička stabilnost imobilisane β -galaktozidaze na nanočestice silike

Radi ispitivanja mogućnosti primene imobilisane β -galaktozidaze na industrijskom nivou, termička stabilnost β -galaktozidaze imobilisane na FNS, AFNS, i CCAFNS najboljih karakteristika (Tabela 4.11.) je proučavana na 60 °C.

Dobijeni rezultati (slika 4.34.) jasno pokazuju da je najveća stabilnost postignuta za enzim imobilisan na AFNS. β -galaktozidaza imobilisana na AFNS i CCAFNS zadržala je 72 % odnosno 35 % inicijalne koncentracije imobilisane aktivnosti (koncentracija imobilisane aktivnosti pre termičkog tretmana) nakon 12 h od početka inkubacije na 60 °C. Termička stabilnost β -galaktozidaze imobilisane na FNS ne razlikuje se mnogo od termičke stabilnosti slobodnog enzima (slika 4.34.).

Polu-životi imobilisanog enzima na AFNS i CCAFNS iznose 30 h odnosno 10 h, dok je polu-život slobodnog enzima svega 1 h na 60 °C (Tabela 4.13.) .

Iako je očekivano da kovalentno vezana β -galaktozidaza na CCAFNS bude mnogo stabilnija od adsorbovane na AFNS, manja stabilnost kovalentno vezanog enzima na CCAFNS govori da je mali broj interakcija formiran između amino grupa lizina molekula enzima i hloridnih grupa CCAFNS nanočestica. Na primerima kovalentno imobilisane β -galaktozidaze na gliksil-agarozu i hitozanom prekrivene magnetne nanočestice je dokazano da prisustvo amino grupa lizina kao i broj formiranih kovalentnih veza imaju glavni uticaj na stabilnost dobijenog imobilisanog enzima.^{230, 231}



Slika 4.34. Termička stabilnost β -galaktozidaze imobilisane na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice na 60 °C.

Tabela 4.13. Polu-životi imobilisane β -galaktozidaze na 60 °C.

Vrsta nanočestice	$t_{1/2}$ (h)
<i>FNS</i>	7
<i>AFNS</i>	10
<i>CCAFNS</i>	30
<i>Slobodan enzim</i>	1

Lošija termička stabilnost β -galaktozidaze imobilisane na CCAFNS u odnosu na adsorbovanu na AFNS potvrđuju ovu tvrdnju. Očigledno je da je imobilizacija β -galaktozidaze na AFNS povećala rigidnost molekula enzima uz prethodno konstatovanu povećanu aktivnost. Velika verovatnoća je da je mesto na kome započinje prirodan proces

denaturacije molekula enzima uspostavljanjem elektrostatičkih interakcija sa površinom AFNS zaštićeno.

Sumiranjem svih prethodno iznetih rezultata može se zaključiti da je najefikasnija imobilizacija β -galaktozidaze ostvarena adsorpcijom na AFNS. Dobra termička stabilnost ovog imobilisanog preparata proširuje mogućnost njegove primene na industrijskom nivou, pa će ovaj preparat biti ispitan u sintezi bioaktivnih galaktozida.

4.3.2. Primena imobilisanih β -galaktozidaza u sintezi biaktivnih galaktozida

Poslednjih godina posvećuje se velika pažnja pozitivnim efektima koje funkcionalna hrana ima na ljudsko zdravlje. Mnogobrojna istraživanja su upravo posvećena sintezi novih proizvoda koji će imati poboljšane fiziološke i fizičko-hemijske karakteristike. β -galaktozidaza, iako je prvenstveno hidrolitički enzim, pokazala je da pod specifičnim uslovima ima sposobnost da katalizuje reakciju transgalaktozilacije (prenos galaktozne jedinice na jedinjenje koje sadrži slobodnu hidroksilnu grupu) što je omogućilo proizvodnju velikog broja fiziološki aktivnih galaktozida kao što su galakto-oligosaharidi, laktuloza i laktitol, kao i njihovi strukturni analozi.^{223, 232-236}

4.3.2.1. Sinteza galakto-oligosaharida katalizovana β -galaktozidazom imobilisanom na AFNS nanočestice

Galakto-oligosaharidima (GOS) se, od svih biaktivnih galaktozida čiju sintezu može da katališe β -galaktozidaza, posvećuje najviše pažnje zbog izvanrednih osobina koje poseduju. GOS-ovi predstavljaju raznoliku grupu ugljenih hidrata sastavljenih od nekoliko galaktozidnih i obično jedne terminalne glukoze jedinice, različitih molekularskih masa, strukture i osobina koje zavise od porekla enzima i primenjenih uslova reakcije sinteze.¹⁶¹

GOS su nedigestibilna jedinjenja sa velikim prebiotičkim potencijalom pošto omogućavaju selektivnu proliferaciju poželjnih bakterija crevne mikroflore dok palarelno suzbijaju njihovu aktivnost.^{214, 237} Shodno tome nekoliko pozitivnih efekata po ljudsko zdravlje se može pripisati konzumiranju galakto-oligosaharida, kao što su poboljšanje varenja laktoze, poboljšane adsorpcije minerala, smanjenje serumskog holesterola, inhibicija rasta patogenih crevnih vrsta, smanjenje rizika nastanka kancera creva i poboljšanje imunog sistema.^{214, 237} Zbog njihove termičke stabilnosti i stabilnosti u kiseloj sredini, male slatkoće i kalorijske vrednosti i značajnog doprinosa senzornim

karakteristikama koriste se kao komponente formulacija za bebe, mlečnih proizvoda, osvežavajućih pića i hrane za životinje.^{215, 237}

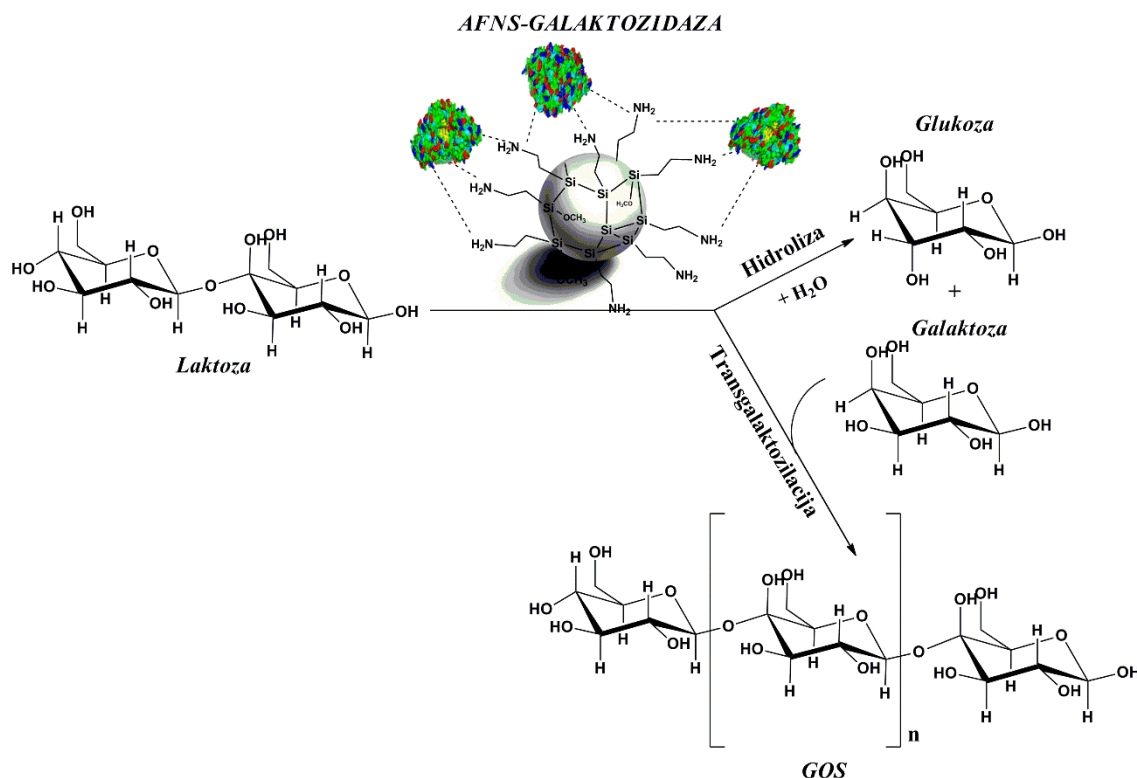
Iako je proizvodnja GOS-a dosada dobro proučena i uspostavljena pomoću slobodnih β -galaktozidaza, nestabilnost i nemogućnost ponovne upotrebe slobodnih enzima limitira sintezu ovih jedinjenja u industrijskim uslovima pa se mogućnost korišćenja imobilisanih enzima nametnula kao rešenje. Do sada je za sintezu GOS-a primenjeno više imobilisanih preparata β -galaktozidaze kao što su, β -galaktozidaza imobilisana adsorpcijom na Purolite A109,²¹² polivinil alkohol,²¹¹ magnetne polisiloksan-polivinil čestice,²³⁸ celit,²³⁹ polietilenska vlakna²¹⁰ i kovalentno imobilisana na hitozan²⁰⁹ i glioksil agarozu.^{217, 231} Postoji samo par studija koje su se bavile proizvodnjom GOS-ova pomoću imobilisane β -galaktozidaze na nosače nano-dimenzija.^{196, 197, 216}

Pošto su se amino-modifikovane nanočestice silike koje su korišćene u sklopu ove doktorske disertacije pokazale kao najbolje među svim testiranim nanočesticama, β -galaktozidaza imobilisana na AFNS tokom 3 h i u 0,1 M acetatnom puferu pH 4,5 je testirana u reakciji biokonverzije laktoze u galakto-oligosaharide (šema 4.12.).

Reakcija biosinteze GOS-ova je izvedena na 50 °C i pri koncentraciji laktoze od 400 g/l pošto je u sklopu doktorske disertacije izvedene na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju dokazano da su to optimalni uslovi.¹⁶¹

Tokom enzimske konverzije laktoze, dve kompetitivne reakcije se odigravaju, hidroliza i transgalaktozilacija (šema 4.12.). Prvo β -galaktozidaza katalizuje hidrolizu β -(1→4) glikozidne veze u molekulu laktoze i kao rezultat formira se enzim-galaktozil kompleks. Reakcija hidrolize će se odigrati ako se molekuli vode ponašaju kao akseptori galaktozil jedinice i kao krajnji produkti formiraće se glukoza i galaktoza.

Reakcija sinteze GOS-ova će se odigrati pomoću reakcije transgalaktozilacije što znači da će enzim, umesto da prenese galaktozil jedinicu na hidroksilnu grupu molekula vode, preneti ovu jedinicu na drugi molekul laktoze. Generalno, intenzivna transgalaktozilacija se odigrava u koncentrovanim rastvorima laktoze (>200 g/l) jer takvi rastvori sadrže mnogo više molekula laktoze u odnosu na molekule vode što dovodi do povećanja produkcije GOS-ova.²¹⁴ U kasnijim fazama reakcije i molekuli GOS mogu da budu galaktozil-akseptori pa dolazi do nastajanja GOS veće molekulske mase.

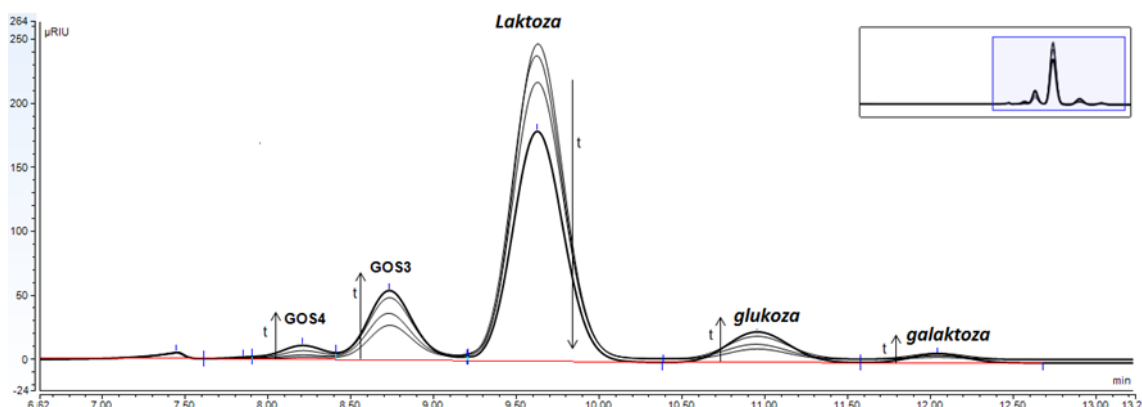


Šema 4.12. Reakcija sinteze galakto-oligosaharida katalizovana β -galaktozidazom imobilisanom na AFNS.

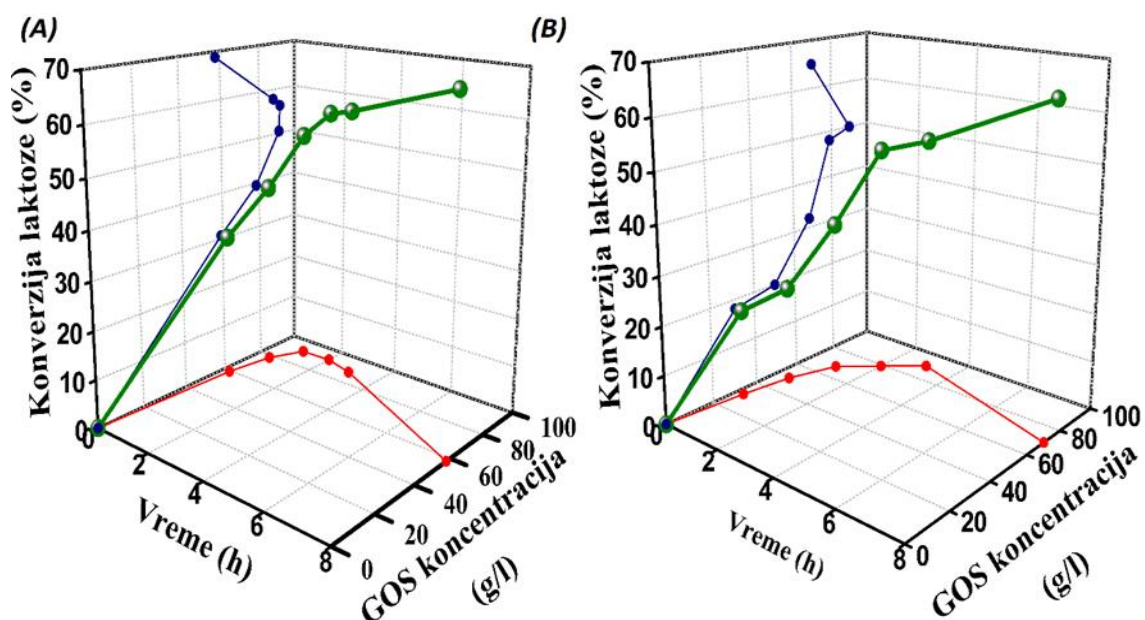
Za adekvatnu procenu afiniteta prema transgalaktozilaciji imobilisane β -galaktozidaze na AFNS sinteza je izvedena i sa slobodnim enzimom tako što su i u slučaju slobodnog enzima kao i u slučaju imobilisanog korišćene jednake inicijalne koncentracije hidrolitičke aktivnosti (10 IU/ml).

Reakciona smeša tokom reakcije sinteze GOS-ova pomoću slobodnog i imobilisanog enzima na AFNS je analizirana na HPLC-u kako bi se proizvodi reakcije precizno razdvojili i detektovali. Dobijeni hromatogram je prikazan na slici 4.35. Sa hromatograma se vidi da su u smeši prisutni proizvodi reakcije transgalaktozilacije GOS3 i GOS4 čija koncentracija u toku vremena raste, s tim da je koncentracija GOS3 nešto veća s obzirom da on prvi nastaje, a kasnije se troši za sintezu GOS4. Prisutni su takođe i proizvodi hidrolize glukoza i galaktoza u mnogo manjoj meri u odnosu na GOS3 i GOS4.

Prilikom sinteze ukupnih GOS-ova pomoću imobilisanog enzima uočava se velika brzina njihove produkcije tokom prvog sata sa maksimumom od 91 g/l (slika 4.36. (A)), za to vreme slobodan enzim je sintetisao oko 69 g/l da bi maksimum od 90,9 g/l dostigao tek nakon 3 h (4.36. (B)). Očito je da enzim imobilisan na AFNS ima bolji katalitički afinitet ka sintezi GOS-a u odnosu na slobodan enzim.



Slika 4.35. Hromatogram sinteze galakto-oligosaharida katalizovana β -galaktozidazom imobilisanom na AFNS.



Slika 4.36. Sinteza ukupnih GOS-ova (crvene krive) i konverzija laktoze (plave krive) toku vremena katalizovana imobilisanom β -galaktozidazom (A) i slobodnim enzimom (B). Zelene kuglice predstavljaju sumiran uticaj sva tri faktora (vreme reakcije, koncentraciju sintetisanog GOS-a i konverziju laktoze).

Maksimalna koncentracija ukupnih GOS-ova za imobilisan enzim se postiže pri konverziji laktoze od 56 %, dok je sa slobodnim enzimom maksimalna vrednost ukupnih GOS-ova od 90,9 g/l dostignuta pri konverziji laktoze od 50 % (plave krive na slici 4.36.). Imajući u vidu mali prečnik (7 nm) i neporoznu strukturu AFNS nanočestica prilikom korišćenja imobilisanog enzima može se konstatovati da nema limitacija pri prenosu mase u toku sinteze GOS-a. Takođe, imobilisan enzim je pokazao veće procenete konverzije

laktoze što je veoma bitno za sa ekonomske tačke gledišta, jer se olakšava separacija proizvoda.

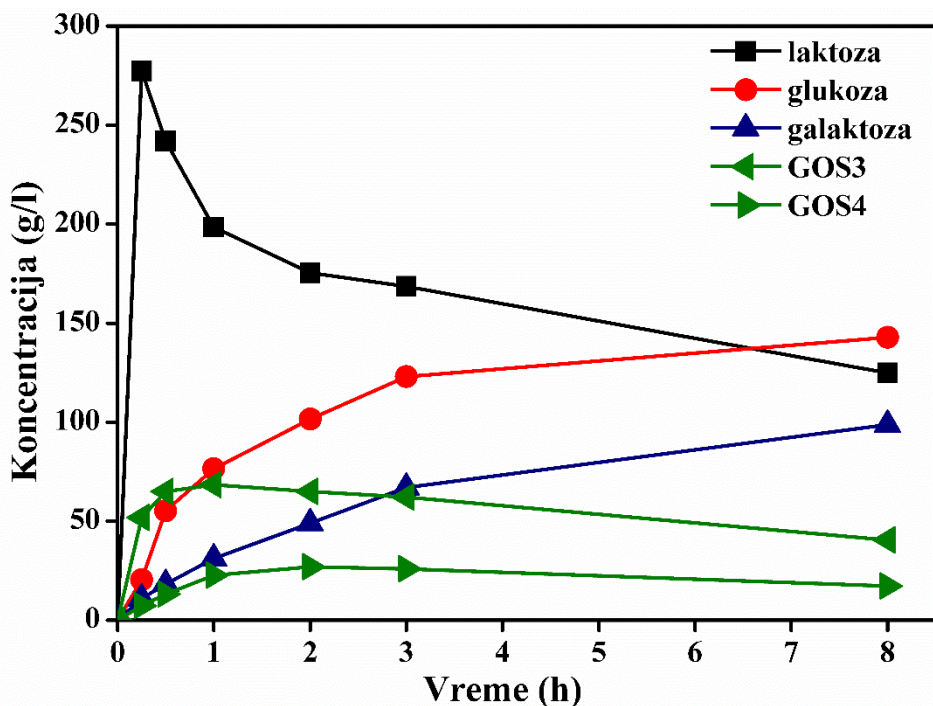
U cilju analiziranja toka biokonverzije laktoze pomoću imobilisanog enzima na AFNS, izučavana je promena koncentracija učesnika reakcije (glukoza, galaktoza, laktoza GOS3 i GOS4) u toku vremena (slika 4.37.).

Na osnovu rezultata prikazanih na slikama (4.36. i 4.37.) može se zaključiti da se uporedo odigravaju hidroliza i transgalaktozilacija tokom prvog sata trajanja reakcije biokonverzije laktoze pomoću imobilisanog enzima pri čemu je brzina konverzije laktoze 200 g/l/h. Ipak dominantna je reakcija transgalaktozilacije pošto je imobilisan enzim na AFNS produkovao 76 g/l glukoze, 64,8 g/l GOS3 i 22,73 g/l GOS4 što znači da je produkcija GOS-a bila 1,3 puta veća u odnosu na produkciju glukoze. Dominantnost transgalaktozilacije je takođe potvrđena većim nagibom krive produkcije glukoze u poređenju sa krivom produkcije galaktoze jer se galaktoza troši za sintezu GOS-a.

Nakon tri sata, krive produkcije glukoze i galaktoze postaju slične dok koncentracije GOS3 i GOS4 polako padaju sugerišući da reakcija hidrolize polako postaje dominantna nad reakcijom transgalaktozilacije.

Ako se produktivnost od 90 g/l/h β -galaktozidaze imobilisane na AFNS u reakciji sinteze ukupnih GOS-ova, uporedi sa rezultatima dobijenim u prethodno objavljenim studijama koje su se bavile produkcijom GOS-a pomoću imobilisane β -galaktozidaze može se zaključiti da je ona značajno veća. Produktivnost β -galaktozidaze imobilisane na AFNS je skoro 3 puta veća u odnosu na ostvarenu produktivnost od 38,66 g/l/h β -galaktozidaze imobilisane na genipin “cross-linked” hitozan čestice.²¹³ Takođe, β -galaktozidaza imobilisana na AFNS je pokazala 15 puta veću produktivnost (g sintetisanog GOS-a/gramu nosača/h) u odnosu na istu količinu imobilisane β -galaktozidaze na Purolite A109.²¹²

Jedna od glavnih prednosti korišćenja imobilisanih enzima u industriji je mogućnost njihove višestruke upotrebe što dovodi do toga da ukupan industrijski proces postane ekonomski isplativiji, iz tog razloga ispitivana je mogućnost višestruke upotrebe imobilisane β -galaktozidaze na AFNS u reakciji sinteze GOS-ova. Imobilisan preparat je pokazao sposobnost upotrebe u 4 ciklusa bez značajnog gubitka aktivnosti.



Slika 4.37. Promena koncentracija laktoze, glukoze, galaktoze, GOS3 i GOS4 utoku vremena. Sintaza je katalizovana imobilisanom β -galaktozidazom na AFNS.

Nakon petog ciklusa imobilisan enzim na AFNS je izgubio 50 % od svoje početne aktivnosti što je verovatno posledica gubitka određene količine imobilisanog preparata tokom njegove separacije centrifugiranjem i ponovnog vraćanja u reakcionu smešu. Tokom ponovne upotrebe spiranje enzima sa AFNS nanočestice nije detektovano. Odsustvo limitacija pri prenosu mase, visoka produktivnost pri sintezi GOS-a kombinovano sa povećanom termičkom i operativnom stabilnošću nameću zaključak da β -galaktozidaza imobilisana na AFNS ima dobre prospekte za primenu u industriji.

4.3.2.2. Sintaza galaktitol-galaktozida katalizovana β -galaktozidazom imobilisanom na AFNS nanočestice

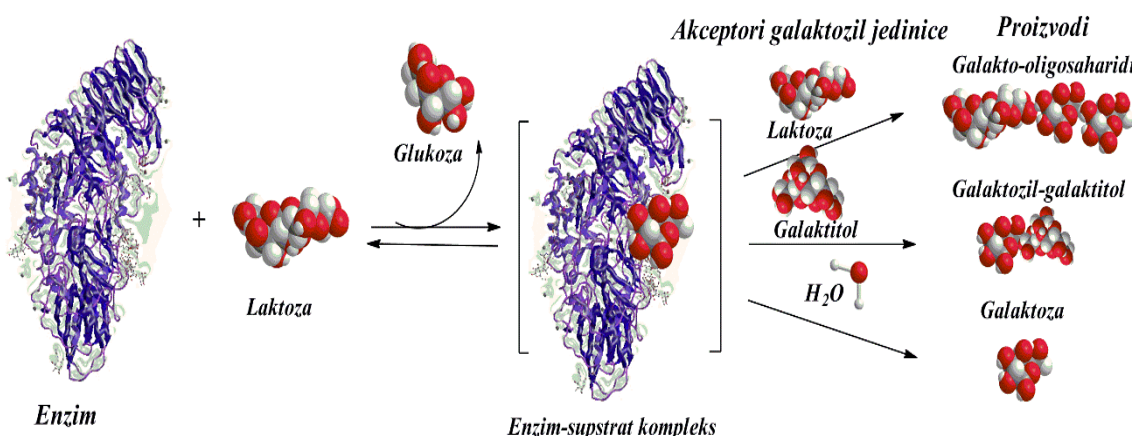
Tokom poslednje decenije, većina istraživanja je bila fokusirana isključivo na produkciju fiziološki aktivnih galakto-oligosaharida, međutim u poslednje vreme sve više pažnje se posvećuje razvitku novih β -galaktozil derivata i to pre svega derivata šećernih alkohola. Ovi derivati šećernih alkohola predstavljaju unapređenu alternativu GOS-ima s obzirom da njihove fiziološke i hemijske osobine imaju sličan beneficianalni efekat na zdravlje ljudi i životinja, a pogodnije organoleptičke ili fizičko-hemijske karakteristike. β -Galaktozil derivati šećernih alkohola imaju sposobnost da utiču na mikrofloru intestinalnog trakta čoveka, dokazano je da su sposobni da indukuju antagonističku aktivnost mlečno-

kiselinskih bakterija prema patogenima i da mogu biti korišćeni kao anti-hepatični encefalopatni agensi.^{240, 241} Njihova izražena stabilnost na visokim temperaturama i malim pH vrednostima omogućava primenu u industriji hrane za ljude i životinje.^{240, 241}

Do sada je sintetisano nekoliko galaktozida šećernih alkohola i to pre svega manitola,²⁴¹ sorbitola,²⁴⁰ laktitola,²⁴⁰ eritrola²¹⁹ i glicerola.²²¹

U ovom delu doktorske disertacije biće predstavljena sinteza novog galaktozil derivata šećernog alkohola galaktitola pomoću slobodne β -galaktozidaze i β -galaktozidaze imobilisane na AFNS nanočestice. Na osnovu pregleda dostupne literature ustanovljeno je da do sada nije pokušana sinteza β -galaktozil derivata galaktitola (dulcitol). Galaktitol-galaktozid je izabran za sintezu zbog mogućnosti da se dobije smeša potencijalnih prebiotika (galakto-oligosaharida i galaktitol-galaktozida) poboljšanih fizioloških karakteristika.

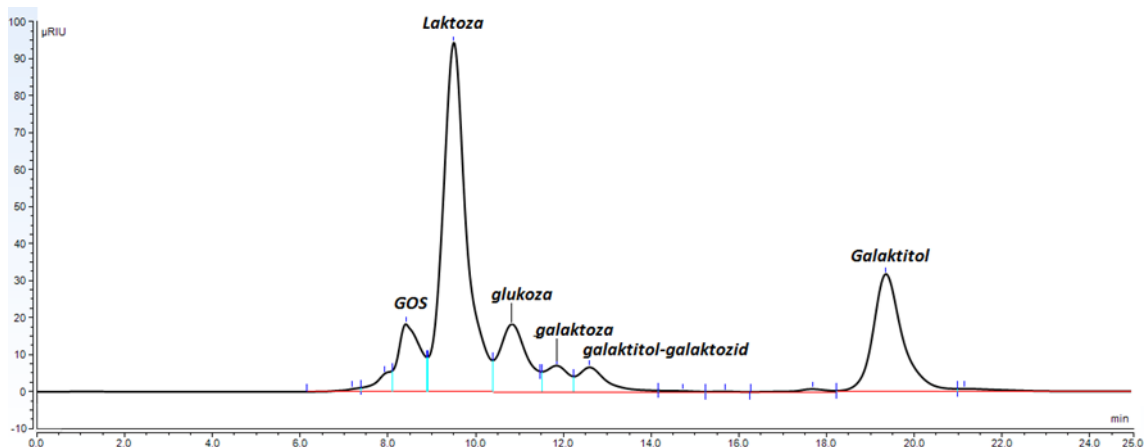
Ova reakcija je još kompleksnija od sinteze galakto-oligosaharida pošto se odigravaju sinteza GOS-a, sinteza galaktitol-galaktozida i hidroliza laktoze zbog nekoliko mogućih galaktozil-akceptora (šema 4.13.).



Šema 4.13. Šematski prikaz reakcije sinteze galaktitol-galaktozida.

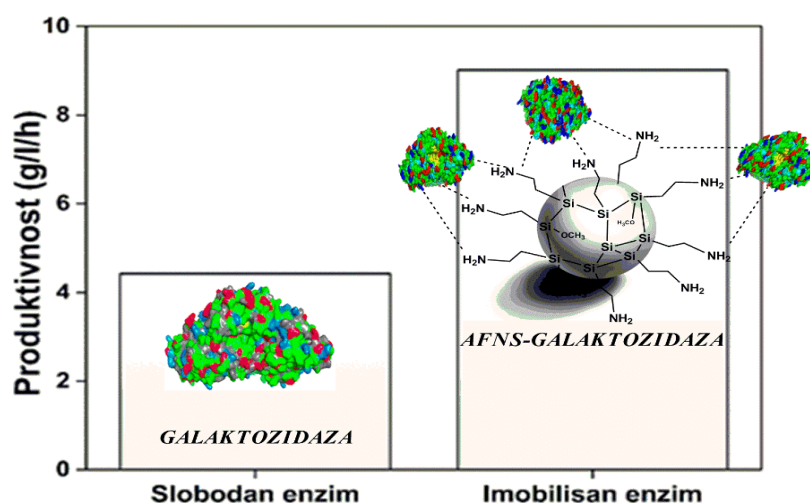
U ovom radu je ispitana mogućnost primene β -galaktozidaze imobilisane na AFNS u sintezi galaktitol-galaktozida. Prethodno su u istraživanjima na Katedri za BIB optimizovani ključni faktori sinteze ovog jedinjenja primenom metode odzivnih površina u reakciji sa slobodnim enzimom²⁴², pa je u ovoj disertaciji sinteza izvedena u optimalnim uslovima. Optimalni parametri za postizanje maksimalnog prinosa galaktitol-galaktozida (g/l) su koncentracija laktoze 200 mM, molski odnos galaktitola i laktoze 7:1, koncentracija NaCl 1 M i vreme reakcije 4,7 h. NaCl se dodaje kako bi se suzbila hidroliza i time pospešila transgalaktozilacija.

Izvedeni su eksperimenti sa slobodnim i enzimom imobilisanim na AFNS nanočestice jednakih hidrolitičkih aktivnosti (2 IU/ml). Uzimajući u obzir kompleksnost reakcije sinteze reakcione smeše su analizirane na HPLC-u po metodi za detekciju šećera (poglavlje 3.2.9.1.) (slika 4.38.).



Slika 4.38. Hromatogram reakcione smeše nakon 4,7 h. Kao katalizator je korišćena imobilisana β -galaktozidaza na AFNS.

Prilikom analize dobijenog hromatograma reakcione smeše svi dobijeni pikovi su jasno razdvojeni što znači da je primenjena metoda odgovarajuća i detektovana su dva ključna proizvoda galaktitol-galaktozid i GOS čime je potvrđena uspešnost sinteze galaktitol-galaktozida. U reakcionoj smeši su prisutni i proizvodi hidrolize glukoza i galaktoza (slika 4.38.). Rezultati sinteze sa slobodnim i imobilisanim enzimom su upoređeni na slici 4.39.



Slika 4.39. Sinteza galaktitol-galaktozida pomoću slobodnog enzima i imobilisanog na AFNS. Experimentalni uslovi imobilizacije: 0,1 M acetatni pufer pH 4,7; vreme 3 h; inicijalna koncentracija proteina 230 mg/g.

Maksimumi dobijenih koncentracija galaktitol-galaktozida su jednaki i iznose 21 g/l za slobodan enzim i 18,03 g/l za imobilisan enzim, ali je vreme za koje je postignut maksimum potpuno različito. Produktivnost (g/l/h) imobilisanog enzima ima vrednost od 9 g/l/h, dok u slučaju slobodnog enzima ona iznosi 4,42 g/l/h. Naime, vreme za koje je imobilisan enzim postigao maksimalni prinos je dva puta kraće u odnosu na slobodan enzim implicirajući da je imobilizacijom enzima na AFNS sinteza galaktitol-galaktozida ubrzana. I u ovom slučaju kao i u slučaju sinteze GOS-ova katalizovanih β -galaktozidazom imobilisanom na AFNS nema limitacija prilikom prenosa mase što je jako značajno za potencijalnu primenu ovog imobilisanog preparata u industrijskoj proizvodnji bioaktivnih galaktozida.

Sumiranjem izloženih rezultata možemo zaključiti da se β -galaktozidaza imobilisana na amino-modifikovane nanočestice silike pri uslovima koji su definisani kao optimalni može uspešno primeniti u reakcijama sinteze bioaktivnih galaktozida jer je imobilizacijom na ove nanočestice njena tranzgalaktizaciona aktivnost poboljšana u odnosu na slobodan enzim.

4.4. Imobilizacija proteaza na funkcionalizovane nanočestice silike

S obzirom da su se FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice pokazale kao dobri nosači za imobilizaciju lipaze iz *C. rugosa* i β -galaktozidaze iz *A. oryzae*, ispitivana je i mogućnost imobilizacije komercijalnih proteaza Flavourzyme[®] i Alcalase[®] kompanije Novozymes. Proteaze i peptidaze (E.C.3.4) su enzimi koji katalizuju hidrolizu peptidne veze u molekulima proteina i/ili peptida. One katalizuju hidrolizu molekula proteina do peptona, polipeptida, dipeptida, pa sve do slobodnih aminokiselina.²⁴³

Klasifikacija proteaza se može izvršiti na osnovu više kriterijuma kao što su pozicija peptidne veze u molekulu proteina na koju deluju, struktura aktivnog centra i mehanizam delovanja, kao i pH vrednost pri kojoj deluju. Proteaze se dele na egzopeptidaze i endopeptidaze na osnovu pozicije peptidne veze u molekulu proteina koju hidrolizuju. Egzopeptidaze deluju na krajevima peptidnih lanaca odvajajući postepeno pojedinačne aminokiseline i na taj način skraćuju lance peptida. Hidroliza proteina može specifično započeti sa N-terminalnog kraja (aminopeptidaze) ili C-terminalnog kraja (karboksipeptidaze) pri čemu dolazi do otcepljivanja pojedinačnih aminokiselina, di- i tripeptida. Endopeptidaze hidrolizuju peptidne veze u unutrašnjosti molekula proteina i razlažu proteine na peptide manje molekulske mase. Na osnovu mehanizma delovanja proteolitički enzimi se mogu klasifikovati u četiri grupe: serinske proteaze, cisteinske proteaze, aspartatne proteaze i metalo-proteaze.¹⁹

Proteaze imaju široku primenu u industriji i to pre svega u proizvodnji hrane i industriji detergenata,²⁴³⁻²⁴⁵ pa se tako npr. u industriji mleka i mlečnih proizvoda dodaju kako bi izazvale kolagulaciju mleka prilikom proizvodnje sira. Koriste se i za tretman surutke, koja nastaje kao nus-produkt tokom ove proizvodnje, radi dobijanja funkcionalnih napitaka (npr. specijalna mleka za bebe). Primenjuju se i u proizvodnji hleba i peciva kako bi se organoleptička svojstva ovih proizvoda poboljšala, skratilo vreme fermentacije i delimično hidrolizovao nerastvorni protein gluten prisutan u pšeničnom brašnu.²⁴⁴ Parcijalnom hidrolizom glutena, menjaju se fizička svojstva testa pa ono postaje mekše i lakše za manipulaciju.²⁴⁶

Intenzivno se koriste i u farmaceutskoj industriji za proizvodnju preparata namenjenih poboljšanju varenja kod osoba koje pate od insuficijencije egzokrinog pankreasa²⁴⁷ i krema kao što su keratolitički preparati za tretman kože koja je prekrivena ožiljcima.²⁴⁸

Poslednjih godina sve veća pažnja se posvećuje dobijanju hidrolizata proteina biljnog (soja, žitarice) ili životinjskog (surutka, meso, riba, jaja) porekla na industrijskom nivou.²⁴⁹ Oni su glavni sastojci različitih specijalizovanih formulacija za ishranu i nutritivnih suplemenata. Kako bi se dobili hidrolizati proteina poželjnih organoleptičkih svojstava koriste se specifične proteaze. Gorak ukus je česta nuspojava hidrolize proteina, a uzrok je prisustvo hidrofobnih aminokiselina na krajevima novonastalih peptida i ostataka prolina u sredini peptidnih lanaca. Proteinski hidrolizati željenih karakteristika se mogu dobiti pažljivim izborom aminopeptidaza i/ili karboksipeptidaza specifičnim prema hidrofobnim aminokiselina kako bi se redukovala gorčina.

Alcalase[®] ili alkalaza (EC 3.4.21.62.) je komercijalni preparat alkalnih proteaza izolovan iz bakterije *Bacillus licheniformis*. Spada u grupu ekstracelularnih serin-endopeptidaza koje napadaju peptidnu vezu nukleofilnim delovanjem serinskog centra. pH optimum alkalaze je 8, a izoelektrična tačka 9,4. Temperaturni optimum ovog enzima se kreće od 30-65 °C. Koristi se za hidrolizu i nativnih i denaturisanih proteina, stereoselektivnu hidrolizu amino-estara, a katališe i reakcije transesterifikacije i transpeptidizacije. Glavna komponenta ovog preparata je subtilizin.²⁵⁰

Flavourzyme[®] (EC 3.4.11.1.) je komercijalni preparat proteaza izolovan iz plesni *A. oryzae* u kojem je ekstracelularna leucin-aminopeptidaza najvažnija komponenta. Ovaj preparat poseduje i endo- i egzo-peptidaznu aktivnost pa katalizuje raskidanje peptidne veze na N-terminalnom kraju peptida i proteina, kao i hidrolizu peptidnih veza u sredini peptidnih lanaca. Može da hidrolizuje amide i metil estre aminokiselina. pH optimum ovog enzima se kreće u opsegu od 5-7, a temperaturni optimum od 50-55 °C.²⁵¹

Najveći problem koji se javlja prilikom korišćenja proteaza na industrijskom nivou je autoliza i denaturacija molekula proteaza čime se smanjuje efikasnost njihove primene. Imobilizacija može da predstavlja dobro rešenje da se spreče ove pojave. Pored toga imobilizacijom mogu da se dobiju stabilniji enzimski preparati koji su otporni na denaturaciju prilikom korišćenja u bioreaktorima.

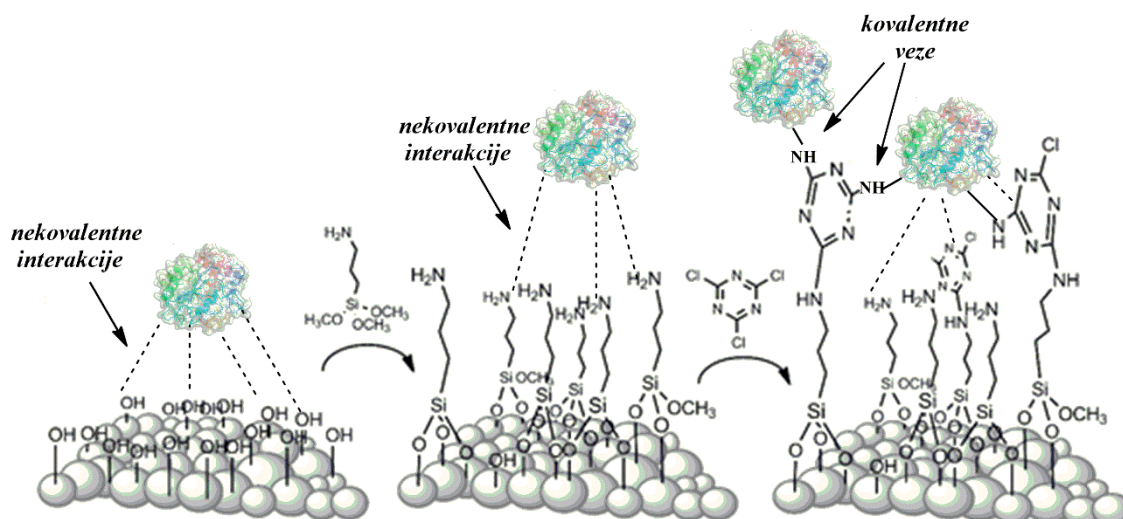
Do sada je alkalaza uspešno imobilisana metodom umrežavanja na gliksil-agarozu, agarozu modifikovanu glutaraldehydom ili cijanogen-bromidom.²⁰ Dobijeni imobilisani preparati su pokazali visoku stabilnost i primenjeni su u hidrolizi kazeina na 80 °C gde su pokazali i do dva puta veću aktivnost u odnosu na slobodan enzim. Just i sar. su imobilisali alkalazu na gliksil-agarozu gel i primenili u hidrolizi leblebije (vrsta slanog

pasulja). Dobijena imobilisana alkalaza se pokazala 24 puta stabilnijom i 51 % aktivnijom od slobodne aklalaze. Dobijeni proteinski izolat leblebije je imao bolje senzorne karakteristike u odnosu na izolat proteina dobijen standardnom hemijskom metodom izolacije.¹⁶⁹ Alkalaza je još imobilisana adsorpcijom na prirodne polimerne makročestice kao što su natrijum-alginat i hitozan,^{166, 170} inkapsulacijom u kserogelove formirane umrežavanjem metiltrimetoksisilana, dietildietoksisilana i tetraetoksisilana.¹⁷³ Alkalaza kovalentno imobilisana na akrilne makroporozne čestice je primenjena u sintezi dipeptida.¹⁷¹ Što se tiče nosača nano-dimenzija za imobilizaciju alkalaze korišćene su Fe₃O₄-hitozan nanočestice i poli(akrilnonitrilna) nanovlakna.^{167, 172}

Pregledom dostupne literatura pronađeno je jako malo podataka o imobilizaciji Flavourzyme-a. Komercijalni preparat Flavourzyme se sastoji od endo- i egzopeptidaza pa su Just i sar.²⁵² za adsorpciju ovog preparata proteaza koristili dva jonoizmenjivača kako bi odvojili frakcije sa endo- i egzo-proteaznom aktivnošću. Nakon toga su odvojeno imobilisali endopeptidaznu frakciju i neprečišćen preparat na glioksil-agarozu kako bi uporedili razliku u hidrolizi proteina. Dobijeni rezultati su pokazali da se mnogo bolji prinosi dobijaju kada se koristi imobilisan neprečišćen Flavourzyme, ali i da je moguće koristiti imobilisanu endo-aktivnu frakciju odvojeno. Če i sar.²⁵³ su kovalentno imobilisali preparat na glutaraldehidom aktiviran komercijalni nosač Lewatit R258-K., dok su Hansupalak i sar.²⁵⁴ takođe kovalentno imobilisali ovaj enzim na hitozan. Flavourzyme je uspešno inkapsuliran u sferne nanoliposome prečnika 187 nm koji su pripremljeni metodom zagrevanja bez prisustva deterdženata i rastvarača.²⁵⁴

4.4.1. Imobilizacija proteaza na nanočestice silike modifikovane amino-organosilanom

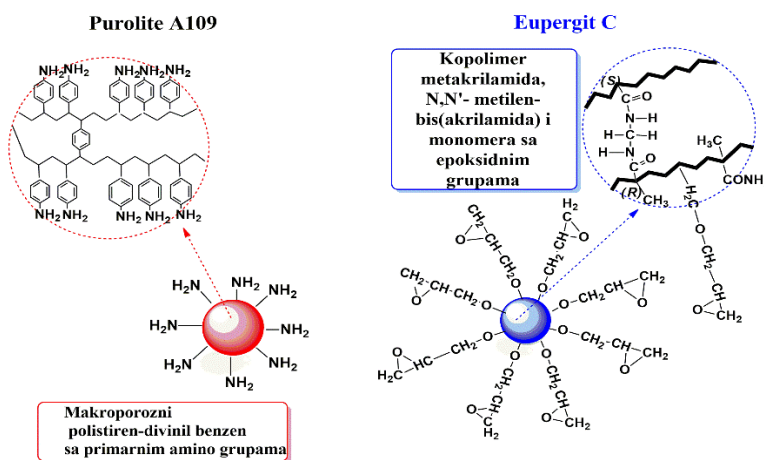
Imobilizacija alkalaze i Flavourzyme-a na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice je izvedena u 10 mM Na-acetatnom puferu (pH 7,5) na 25 °C po proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.3.3. (šema 4.14.). Tok imobilizacije je praćen određivanjem koncentracije imobilisanih proteina (mg/g nanočestice), koncentracije imobilisane aktivnosti (IU/g) u reakciji hidrolize azokazeina i L-leucin-*p*-nitroanilida, prinosa imobilizacije proteina i aktivnosti, kao i specifične aktivnosti (IU/mg proteina).



Šema 4.14. Šematski prikaz imobilizacije alkalaze na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice.

4.4.1.1. Imobilizacija alkalaza na nanočestice silike

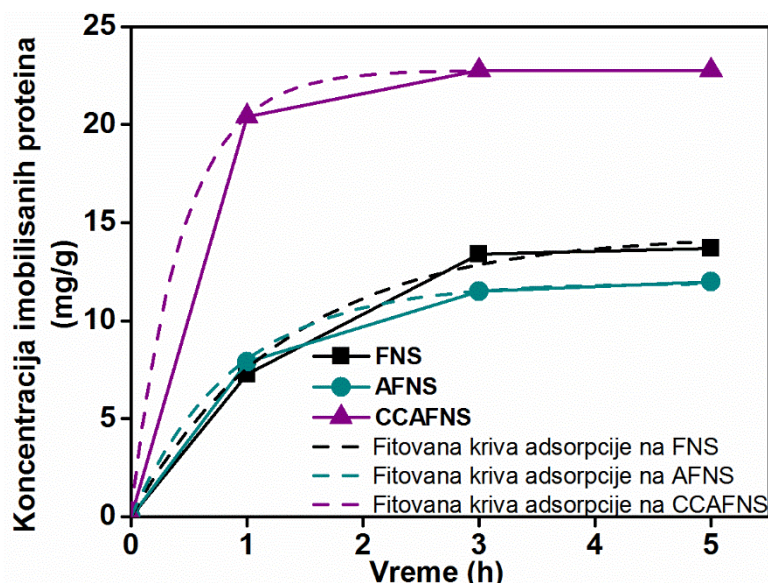
Na osnovu preliminarnih eksperimenata koji su izvedeni na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju zaključeno je da je optimalna koncentracija „ponuđenih“ proteina za imobilizaciju alkalaza na konvencionalne nosače (Purolite, Eupergit C i 250L (čija je struktura prikazana na slici 4.40.)) 25 mg/g kao i da je optimalan pH 7,5 pa je imobilizacija alkalaza na nanočestice silike izvedena pri ovim uslovima. Treba napomenuti da veće koncentracije proteina nisu bile pogodne za primenu u eksperimentima sa konvencionalnim nosačima jer dolazi do pada proteolitičke aktivnosti u supernatantu kao posledice autokatalizovane hidrolize enzima. Ovo je primećeno i u preliminarnom eksperimentu sa nanočesticama.



Slika 4.40. Struktura Purolite A 109 i Eupergit C.

4.4.1.1.1. Kinetika imobilizacije alkalaza na nanočestice silike

Kinetika vezivanja alkalaza na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice tokom 5 h je prikazana na slici 4.41. Dobijene eksperimentalne vrednosti za promenu koncentracije imobilisanih proteina u toku vremena su „fitovane“ kinetikom pseudo-prvog reda (isprekidane krive na slici 4.41.). Uočava se da alkalazi najviše odgovaraju CCAFNS nanočestice iz ugla maksimalne koncentracije imobilisanih proteina jer se na njih vezalo 22,75 mg/g, što je 2 puta više nego što se imobilisalo na nemodifikovane (FNS) i amino-modifikovane (AFNS) nanočestice silike. Dodatno se zapaža da je vezivanje alkalaze nešto sporije i da se maksimum koncentracije imobilisanih proteina dostiže 3 h nakon početka imobilizacije prilikom imobilizacije alkalaze na AFNS i CCAFNS, dok na FNS je to tek nakon 5 h. Za 1 h se na CCAFNS nanočestice vezalo 90 %, dok se na FNS i AFNS nanočestice se vezalo svega 50 % od ukupne koncentracije imobilisanih proteina. U poređenju sa lipazom i β -galaktozidazom kod kojih je maksimum dostignut već nakon 45 minuta odnosno 1 h od početka imobilizacije kinetika adsorpcije alkalaze na ove nanočestice je dosta sporija.

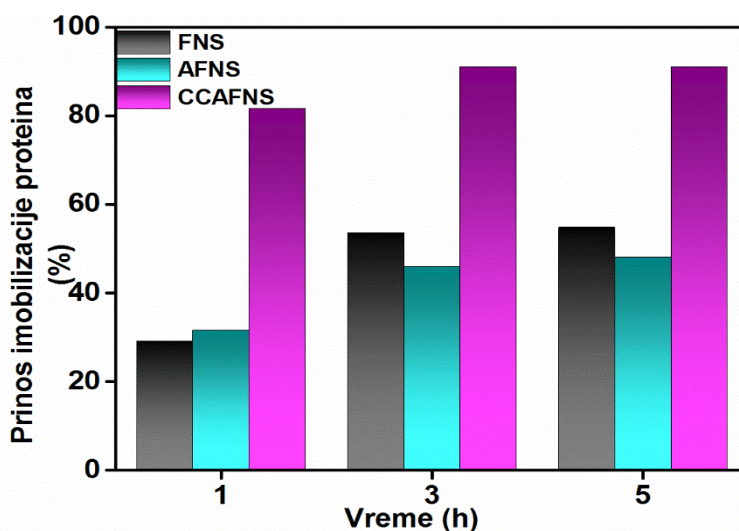


Slika 4.41. Uticaj vremena imobilizacije na koncentraciju imobilisanih proteina (mg/g nanočestica) prilikom imobilizacije alkalaze na FNS, AFNS i CCAFNS. Isprekidane krive na slici predstavljaju kinetički model pseudo-prvog reda. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg/g; 10 mM Na-acetatni pufer (pH 7,5); vreme 0-5 h.

Ravnotežne koncentracije imobilisanih proteina na FNS, AFNS i CCAFNS dobijene primenom kinetičkog modela pseudo-prvog reda odgovaraju eksperimentalnim

vrednostima za maksimalne koncentracije imobilisanih proteina i iznose 13,97, 11,92 i 22,77 mg/g, redom. Treba napomenuti da se koeficijenti korelacije za „fitovanje“ kinetike adsorpcije na FNS, AFNS i CCAFNS kinetikom pseudo-prvog reda kreću u opsegu 0,993-1, što govori o dobrom poklapanju sa ovim modelom i da se imobilizacija alkalaze definitivno odigrava kinetikom pseudo-prvog reda.

Ako analiziramo koncentraciju imobilisanih proteina u pogledu prinosa imobilizacije proteina (slika 4.42.) uočljivo je da na se nakon 3 h na CCAFNS vezalo maksimalnih 91,03 % od „početne“ koncentracije proteina dok se najmanje vezalo na AFNS, svega 45 %. Prinos imobilizacije proteina na FNS nanočestice bio je 54 %.



Slika 4.42. Ostvareni prinosi imobilizacije proteina (%) prilikom imobilizacije alkalaza na FNS, AFNS i CCAFNS. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg; 10 mM Na-acetatni pufer (pH 7,5); vreme 0-5 h.

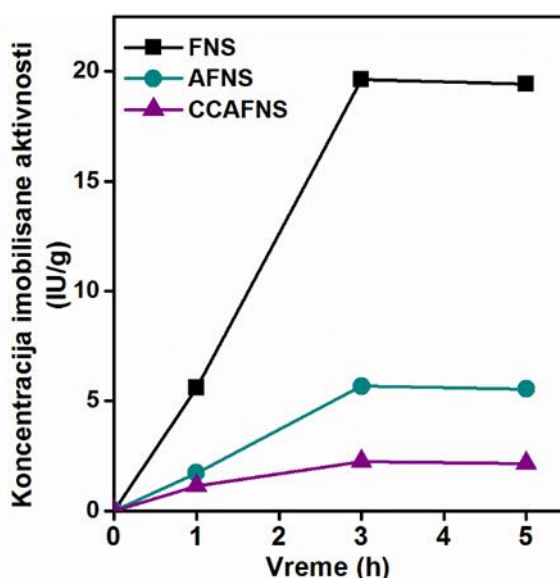
Poređenjem rezultata za koncentraciju imobilisanih proteina i prinosa imobilizacije proteina ostvarenih na FNS i AFNS sa rezultatima koje su dobili Ferreira i sar.²⁵⁵ koji su alkalazu imobilisali na nemodifikovane i amino-modifikovane makroporozne silika čestice (prečnika 30 μm i specifične površine od 50 m^2/g) dobija se da je 6 puta više enzima imobilisano na FNS i AFNS kao i da je efikasnost imobilizacije u pogledu prinosa imobilizacije proteina duplo veća.

4.4.1.1.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti alkalaze na nanočestice silike

Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g) na FNS, AFNS i CCAFNS je ispitivana u reakcijama hidrolize azokazeina po metodi koja je opisana u poglavlju 3.2.4.3.

Analizom krivih predstavljenih na slici 4.43. primećuje se da najveću koncentraciju imobilisane aktivnosti (19,6 IU/g) ima alkalaza imobilisana na FNS nakon 3 h od početka imobilizacije iako je za to vreme na ove nanočestice vezano svega 13,7 mg/g enzima (slika 4.41.).

Maksimalna koncentracija imobilisane aktivnosti na FNS nakon 3 h je skoro 4, odnosno 10 puta veća u odnosu na maksimalne koncentracije imobilisanih aktivnosti alkalaza na AFNS i CCAFNS (5,5 i 2,3 IU/g, redom). Treba naglasiti da iako je na CCAFNS imobilisana najveća koncentracija enzima (22,77 mg/g) dobijena koncentracija imobilisane aktivnosti najmanja i iznosi svega 2,3 IU/g.



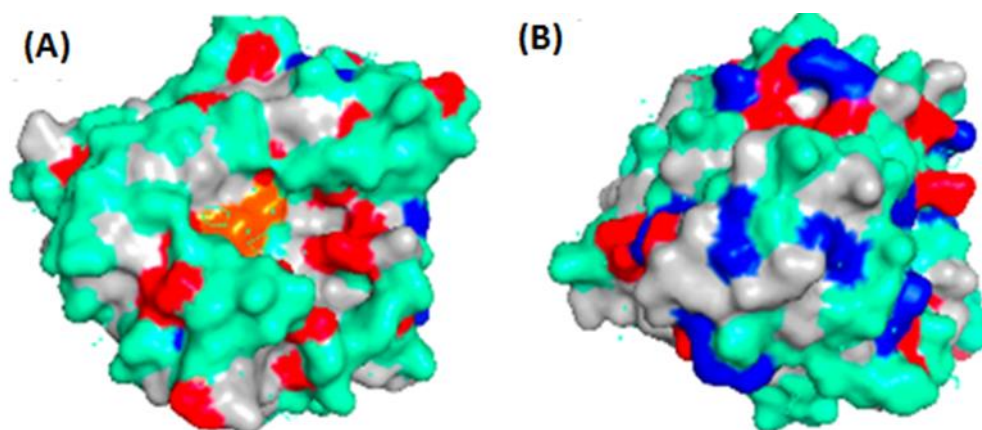
Slika 4.43. Koncentracija imobilisane aktivnosti alkalaza na FNS, AFNS i CCAFNS određena u reakciji hidrolize azokazeina. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg; 10 mM Na-acetatni pufer (pH 7,5); vreme 0-5 h.

Na osnovu svega navedenog može se izvesti zaključak da se imobilizacija alkalaza adsorpcijom na FNS nanočestice pokazala kao najefikasnija u pogledu koncentracije imobilisane aktivnosti što je parametar od ključnog značaja za primenu imobilisanog enzima.

Najmanja koncentracija imobilisane aktivnosti alkalaze na CCAFNS (slika 4.43.) pri najvećoj koncentraciji imobilisanih proteina (slika 4.41.) može biti rezultat progresivne inaktivacije imobilisanih enzima koja nastaje zbog distorzije strukture molekula enzima usled stvaranja dodatnih interakcija između enzima i nanočestica ili čak između susednih molekula enzima zbog njihovog gustog pakovanja na površini nanočestica.³ Molekuli

enzima teže da maksimiziraju kontakt sa površinom nosača što često dovodi do narušavanja njihove trodimenzionalne strukture rezultirajući gubitkom aktivnosti. Takođe je moguće da su razlike u efikasnosti imobilizacije enzima na nanočestice silike posledica različitih orijentacija enzima pa će biti analiziran uticaj strukture površine enzima.

Alkalaza je komercijalni preparat koji se dominantno sastoji od serinske proteaze izolovane iz *B. licheniformis*.²⁵⁶ Radi proučavanja mehanizma imobilizacije struktura serinske proteaze (subtilizin) je predstavljena na slici 4.44. Katalitički centar ovog enzima se sastoji od tri aminokiseline, a to su histidin, asparaginska kiselina i serin. Molekulska masa subtilizina u aktivnoj konformaciji iznosi 27 kDa.



Slika 4.44. 3D struktura molekula alkalaze (subtilizin) izolovane iz *Bacillus licheniformis*. Aminokiseline čiji bočni ostaci imaju amino grupe su obojeni plavo, karboksilne grupe u crveno i hidrofobne grupe u sivo. Aktivni centar je obojen narandžasto. Frontalna strana molekula alkalaze (A). Rotacija molekula alkalaze za 180° u x - y ravni (B). PDB broj za subtilizin je 4YUG.

Pretpostavka je da se alkalaze dominantno vezuju na CCAFNS formiranjem kovalentnih veza između ϵ -amino grupa lizina prisutnih na površini molekula alkalaze i hloridnih grupama s -triazinskog prstena cijanuril-hlorida vezanog za površinu CCAFNS. Takođe, može doći i do stvaranja hidrofobnih interakcija između hidrofobnih grupa molekula alkalaze i hidrofobnog s -triazinskog prstena.

S obzirom da se skoro sve amino grupe prisutne na površini molekula alkalaze (plavo obojeni delovi molekula alkalaze na slici 4.44. (B)) nalaze na strani molekula suprotnoj u odnosu na položaj aktivnog centra, da bi došlo do formiranja kovalentnih interakcija enzim treba da se orijentiše tako da su ove amino grupe okrenute ka površini nanočestica.

Kako je imobilisana alkalaza na CCAFNS ispoljila najmanju koncentraciju imobilisane aktivnosti, pri čemu je ostvaren najveći prinos imobilizacije proteina na CCAFNS (91 %), moguće je da su padu koncentracije imobilisane aktivnosti na CCAFNS doprinele i interakcije između susednih enzima vezanih za nosač narušavajući trodimenzionalnu strukturu vezanih molekula enzima što je dovelo do njihove inaktivacije. Potvrda nepovoljnog vezivanja alkalaze na CCAFNS nanočestice je jako mala vrednost specifične aktivnosti imobilisane alkalaze od svega 0,1 IU/mg proteina (Tabela 4.14.).

Tabela 4.14. Specifične aktivnosti alkalaze imobilisane na FNS, AFNS i CCAFNS.

<i>Vrsta nanočestica</i>	<i>Specifična aktivnost alkalaze (IU/mg proteina)</i>
<i>FNS</i>	1,4
<i>AFNS</i>	0,46
<i>CCAFNS</i>	0,1

Isti fenomen, da koncentracija imobilisane aktivnosti nije proporcionalna koncentraciji imobilisanih proteina, zapažen je i prilikom kovalentne imobilizacije alkalaze na glutaraldehydom i cijanogen-bromidom modifikovanu agarozu.²⁵⁷

Analizom mehanizma imobilizacije alkalaze na FNS nanočestice male koncentracije imobilisanih proteina (13,7 mg/g) se mogu objasniti činjenicom da su pod ovim eksperimentalnim uslovima molekuli alkalaze globalno negativno naelektrisani, a kako su i FNS nanočestice negativno naelektrisane dolazi do dominantnog nastanka odbojnih elektrostatičkih interakcija između molekula enzima i nanočestica silike.

Međutim, kako se na površini molekula alkalaze nalazi osam pozitivno naelektrisanih ε-amino grupa lizina prisutnih u molekulu alkalaze pri čemu su skoro sve na strani molekula suprotnoj u odnosu na aktivni centar (slika 4.44. (B)), pretpostavka je da je u toku imobilizacije ipak došlo do nastanka lokalizovanih privlačnih elektrostatičkih interakcija između ovih amino grupa i negativno naelektrisanih silanol grupa. Nakon vezivanja molekula preko ovih amino grupa on je orijentisan tako da je pristup supstrata aktivnom centru olakšan što je rezultiralo da se dobiju najveće koncentracije imobilisane aktivnosti (19,6 IU/g) za alkalazu imobilisanu na FNS. Specifična aktivnost alkalaze imobilisane na FNS iznosi 1,4 IU/mg što znači da je skoro 10 puta veća u odnosu na CCAFNS derivat (Tabela 4.14.). Treba napomenuti još i da je moguće da su između nedisosovanih silanol

grupa na površini silike i funkcionalnih grupa prisutnih na površini molekula alkalaze došlo do formiranja vodoničnih veza koje su stabilizovale zauzetu konformaciju molekula enzima prilikom imobilizacije preko amino grupa.

U većini studija koje su se bavile imobilizacijom alkalaza, imobilisan enzim je pokazivao dobru aktivnost i/ili stabilnost samo u slučajevima kada je imobilizacija išla preko ϵ -amino grupa lizina molekula alkalaze kao što je slučaj i prilikom imobilizacije ovog enzima na FNS.²⁵⁷

Iako je bilo za očekivati, kao što se desilo u slučajevima imobilizacije lipaze i β -galaktozidaze, da će uvođenje amino grupa na površinu FNS nanočestica omogućiti dobijanje aktivnijeg imobilisanog enzima u odnosu na FNS nanočestice to se u ovom slučaju nije desilo jer je koncentracija imobilisane aktivnosti alkalaze na FNS skoro 4 puta veća od imobilisane na AFNS. Formiranjem privlačnih elektrostatičkih interakcija između pozitivno naelektrisanih amino grupa AFNS nanočestica i negativno naelektrisanih karboksilnih grupa na površini molekula alkalaze, koje se nalaze u okolini aktivnog centra (crveno obojeni delovi molekula alkalaze na slici 4.44. (A)), većina molekula enzima se orjentisala tako da je otežan prilaz supstrata aktivnom centru što se odrazilo na koncentraciju imobilisane aktivnosti alkalaze na AFNS. Specifična aktivnost ovog imobilisanog preparata iznosi svega 0,46 IU/mg (Tabela 4.14.), što znači da je tri puta manji udeo enzima vezanih u aktivnoj konformaciji u odnosu na imobilizaciju ovog enzima na FNS.

Sumirajući prethodno iznete činjenice od svih analiziranih nanočestica za imobilizaciju alkalaze najpogodnije su nemođifikovane nanočestice silike na koje se alkalaza imobilise adsorpcijom preko privlačnih lokalizovanih elektrostatičkih interakcija između amino grupa molekula enzima i negativno naelektrisanih silanol grupa FNS nanočestica. Očigledno je da za dobijanje aktivnih imobilisanih preparata alkalaza mora da se imobilise uspostavljanjem veza sa nosačem preko površinskih ϵ -amino grupa lizina.

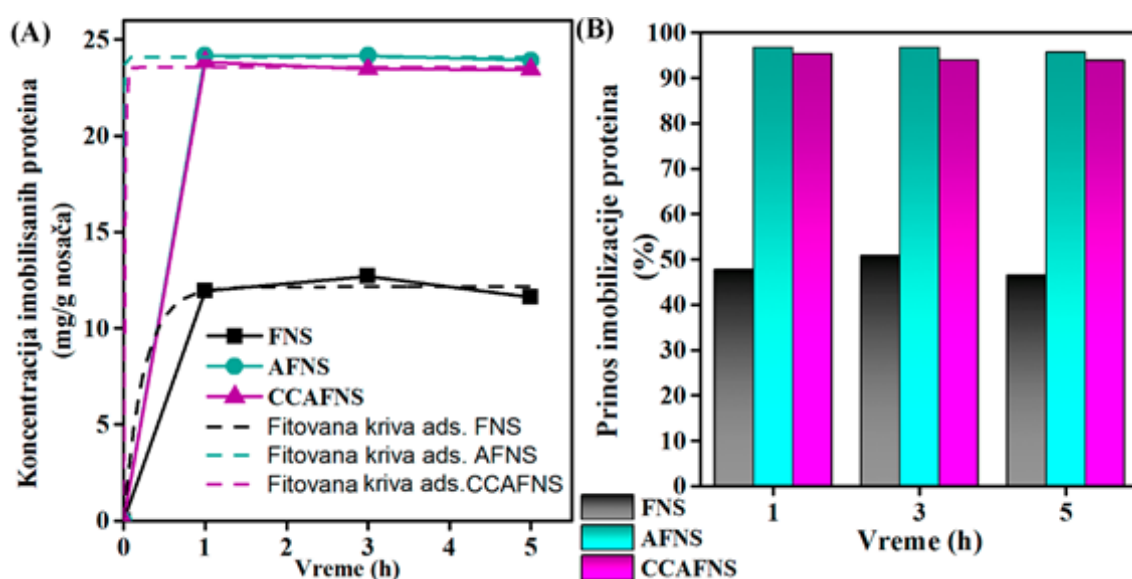
4.4.1.2. Imobilizacija Flavourzyme-a na nanočestice silike

Nakon imobilizacije alkalaze proučavana je mogućnost imobilizacije komercijalnog preparata proteaza Flavourzyme na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice. Prilikom imobilizacije Flavourzyme-a primenjeni su isti uslovi kao i za alkalazu.

4.4.1.2.1. Kinetika imobilizacije Flavourzyme-a na nanočestice silike

Kao i u slučaju imobilizacije alkalaze, prvo je praćena kinetika adsorpcije i prinos imobilizacije proteina na sve tri vrste primenjenih nanočestica. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.45.

Maksimumi koncentracije imobilisanih proteina dostignuti su već nakon 1 h na AFNS i CCAFNS (24,15 i 23,46 mg/g nanočestica, redom), dok se na FNS imobilisalo upola manje proteina (12,69 mg/g nanočestica) (slika 4.45.). Kinetika adsorpcije Flavourzyme-a na FNS, AFNS i CCAFNS je “fitovana” kinetičkim modelom pseudo-prvog reda (isprekidane krive na slici 4.45. (A)).



Slika 4.45. Kinetika adsorpcije Flavourzyme-a na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice (A). Prinos imobilizacije proteina (B). Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg/g; 10 mM Na-acetatni puffer (pH 7,5); vreme 0-5 h.

Analizom dobijenih rezultata za prinos imobilizacije proteina zapaža se da se na AFNS i CCAFNS vezalo oko 96 % početne koncentracije proteina dok se na FNS vezalo svega 50 % (slika 4.45. (B)).

Ako uporedimo ove rezultate sa rezultatima za alkalazu uočava se da se ista količina enzima vezala u oba slućaja na FNS, dok je vezivanje Flavourzyme-a favorizovano i na AFNS što nije bio slućaj sa alkalazom. Ostvarene koncentracije imobilisanih proteina na FNS, AFNS i CCAFNS su i do 10 puta veće u odnosu na komercijalne makroporozne nosaće kao što su npr. staklene ćestice, silika gel, Dianion HP20 i SP206 na koje je Flavourzyme imobilisan.²⁵³

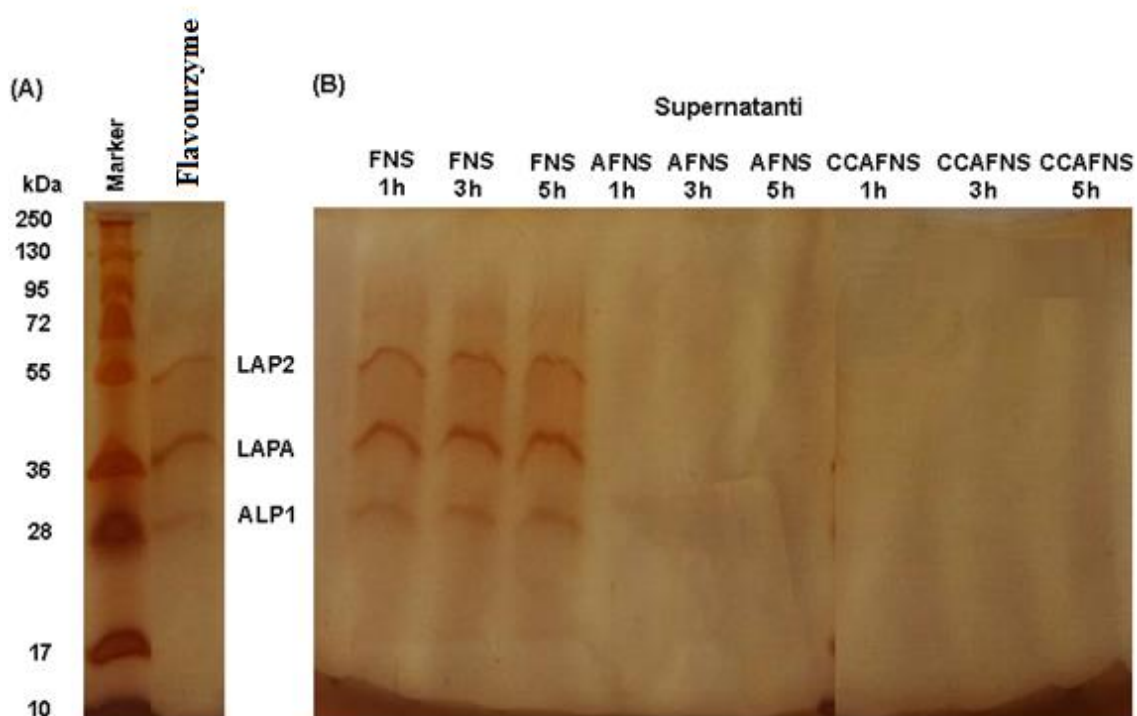
Možemo reći da FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice imaju dobar potencijal za primenu u imobilizaciji Flavourzyme-a u kontekstu koncentracije imobilisanih proteina i prinosa imobilizacije proteina. Međutim potrebno je dalje ispitati kako su ostvarene koncentracije imobilisanih proteina na ove nanočestice uticale na koncentraciju aktivnosti imobilisanih enzima.

Posebno treba naglasiti da komercijalni preparat proteaza Flavourzyme dobijen gajenjem submerznim postupkom pod neutralnim uslovima *A. oryzae* soja ATCC 42149/RIB 40 ustvari predstavlja smešu više enzima koji imaju endo- i egzo-peptidaznu aktivnost. Merz i sar.²⁵⁸ su korišćenjem masene spektroskopije i elektroforeze identifikovali i izolovali iz komercijalnog preparata Flavourzyme-a osam enzima koji su predstavljeni u Tabeli 4.15. *Tabela 4.15. Identifikacija enzima koji čine komercijalni preparat Flavourzyme masenom spektroskopijom i na osnovu proteinske baze podataka UniProtKB.*²⁵⁸

	<i>Enzim</i>	<i>Skraćenica</i>	<i>UniProKB identifikacija</i>	<i>Molekulska masa (kDa)</i>	<i>EC broj</i>
1.	leucin aminopeptidaza A	LAPA	Q2U1F3	32,5	3.4.11.
2.	leucin aminopeptidaza II	LAP2	Q2ULM2	51,9	3.4.11.
3.	dipeptidil proteaza IV	DPP4	Q2UH35	85,1	3.4.14.5.
4.	dipeptidil proteaza V	DPP5	Q9Y8E3	78,6	3.4.14.
5.	neutralna proteaza I	NP1	Q2U1G7	42,4	3.4.24.
6.	neutralna proteaza II	NP2	P46076	19,0	3.4.24.39.
7.	alkalna proteaza I	ALP1	P12547	29,0	3.4.21.63.
8.	α-amilaza A tip 3	AMY3	P0C1B4	52,5	3.2.1.1.

Kako bi ustanovili eventualnu selektivnost imobilizacije različitih proteaza iz ovog komercijalnog preparata, izvedeno je elektroforetsko razdvajanje ovog preparata po metodi opisanoj u poglavlju 3.2.11, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.46.

U preparatu Flavourzyme pojavljuju se tri proteinske trake čije molekulske mase iznose oko 55, 36 i 28 kDa (4.46. (A)). Na osnovu podataka iz baze UniProKB monomerna molekulska masa leucin aminopeptidaza II (LAP2) iznosi 51,9 kDa (Tabela 4.15.), pa možemo zaključiti da proteinska traka na 55 kDa (slika 4.46. (A)) odgovara leucin aminopeptidazi II. Nešto veća molekulska masa od 55 kDa može se objasniti činjenicom da ovaj enzim podleže procesu glikolizacije koji se odigrava na aminokiselinskim ostacima na poziciji 224, 307, 341, 402, 424 i 458. Zato ukupna molekulska masa ovog enzima u nativnoj konformaciji može biti od 60 do 100 kDa. Deglikolizacijom Blinkovski i sar.²⁵⁹ su dokazali da molekulska masa ovog enzima iznosi oko 56 kDa što je u skladu sa molekulskom masom koju je dobijena.



Slika 4.46. Elektroforegram preparata Flavourzyme. Proteinske frakcije su bojene srebrom pri čemu su korišćeni proteinski markeri u opsegu od 10-250 kDa (A). Elektroforeza supernatanata dobijenih nakon imobilizacije u trajanju od 1, 3 i 5 h Flavourzyme-a na FNS, AFNS i CCAFNS (B).

Dokazano je da nativna konformacija leucin aminopeptidaze A (LAPA) ima molekulsku masu od 36,8 kDa što indikuje da je ovo monomerni enzim.²⁶⁰ Proteinska traka na slici 4.46. (A) koja odgovara molekulskoj masi od 36 kDa ustvari predstavlja leucin aminopeptidazu A (LAPA).

Proteinska traka na 28 kDa (slika 4.46. (A)) odgovara alkalnoj proteazi I (ALP1) jer se na osnovu dostupnih literaturnih podataka zna da njena molekulska masa iznosi 29 kDa.²⁶¹

Dakle, komercijalan preparat proteaza Flavourzyme koji je korišćen u sklopu ove doktorske disertacije ustvari predstavlja smešu dve proteaze sa egzo-peptidaznom aktivnošću LAPA i LAP1 i jedne proteaze sa endo-peptidaznom aktivnošću ALP1.

U cilju proučavanja afiniteta ova tri enzima ka vezivanju na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice, urađena je elektroforeza supernatanata odvojenih nakon završetka imobilizacije (1 h, 3 h i 5 h) Flavourzyme-a na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice (slika 4.46. (B)).

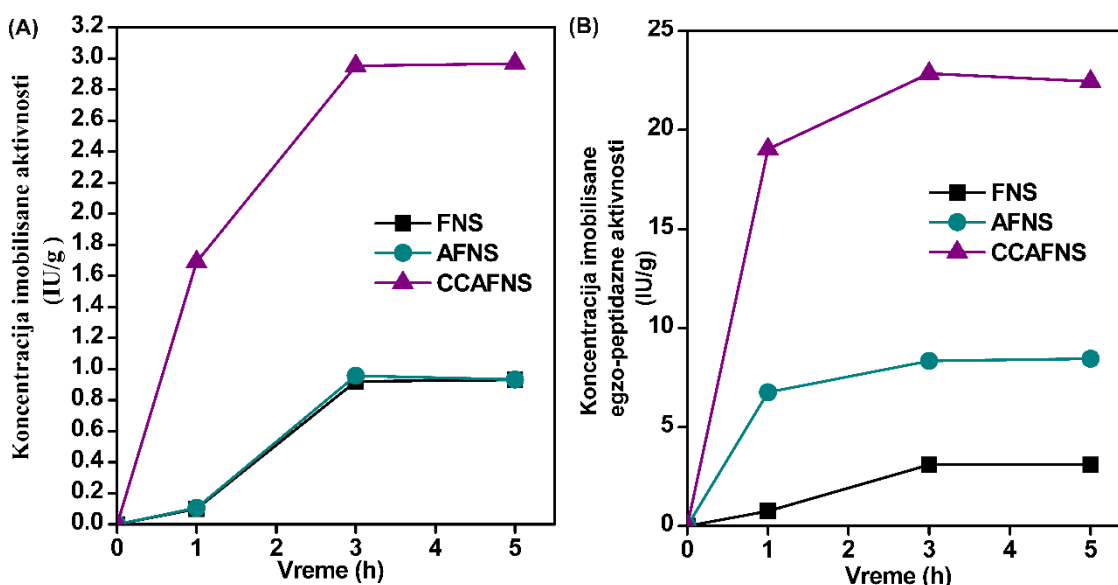
Rezultati dobijeni elektroforezom supernatanata su u skladu sa rezultatima dobijenim za kinetiku adsorpcije Flavourzyme-a predstavljenim na slici 4.45. (A). U supernatantima dobijenim nakon imobilizacije Flavourzyme-a na AFNS i CCAFNS ne postoje proteinske trake ni za jedan od enzima što je i bilo za očekivati s obzirom da su prilikom imobilizacije na ove nanočestice ostvareni prinosi imobilizacije proteina od 96 %. Stoga, prilikom imobilizacije LAPA, LAP1 i ALP1 ne postoji razlika u afinitetu za vezivanje na AFNS i CCAFNS nanočestice. Selektivnost se mogla očekivati jedino u imobilizaciji na FNS jer se 50 % od inicijalne koncentracije proteina vezalo na površinu nanočestica. Međutim, elektroforegrami supernatanata tokom svih 5 h koliko je praćena imobilizacija ne pokazuju lako uočljive razlike u intenzitetu proteinskih traka za sva tri enzima koji čine Flavourzyme (LAPA, LAP1 i ALP1), što ukazuje na zaključak da ne postoje velike razlike u afinitetu ovih enzima prema FNS.

4.4.1.2.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti Flavourzyme-a na nanočestice silike

S obzirom da Flavourzyme sadrži proteaze sa endo- i egzo-peptidaznom aktivnošću, koncentracija imobilisane aktivnosti Flavourzyme-a na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice je određivana u reakcijama hidrolize dva supstrata: azokazeina i L-leucin-*p*-nitroanilida. Alkalna proteaza I ((E.C. 3.4.21.63.), poznata i kao orizin, elastaza i aspergilo-peptidaza B) pripada proteazama serinskog tipa sa endo-peptidaznom

aktivnošću. Ima pH optimum na 7, dok je temperaturni optimum na 50 °C.²⁵⁸ Aktivnost ove proteaze se određuje u reakciji hidrolize azokazeina. Leucin aminopeptidaze LAPA i LAP1 (EC 3.4.11) su proteaze sa egzo-peptidaznom aktivnošću. Za određivanje koncentracije aktivnosti ovih proteaza se koristi specifični supstrat sintetički L-leucin-*p*-nitroanilid. pH optimum ovih proteaza je oko 8, dok je optimalna temperatura na 60 °C.²⁶¹ Praćena je promena koncentracije imobilisane aktivnosti u hidrolizi azokazeina, kao i egzo-peptidazne aktivnosti Flavourzyme-a imobilisanog na nanočestice silike u toku 5 h (slika 4.47.).

Koncentracija imobilisane aktivnosti Flavourzyme-a imobilisanog na sve tri vrste nanočestica u hidrolizi azokazeina dostiže maksimum nakon 3 h od početka imobilizacije i dalje stagnira u toku vremena. Može se videti da imobilisan Flavourzyme ima najveću koncentraciju imobilisane aktivnosti od 2,96 IU/g nakon 3 h od početka imobilizacije na cijanuril-hloridom aktiviranim amino-modifikovanim nanočesticama (CCAFNS). Dobijena najveća koncentracija imobilisane aktivnosti na CCAFNS je u skladu sa koncentracijom imobilisanih proteina s obzirom da su se na CCAFNS vezali skoro svi inicijalno ponuđeni proteini.



Slika 4.47. Promena koncentracije imobilisane aktivnosti u reakciji hidrolize azokazeina (A) i egzo-peptidazne aktivnosti (B) tokom imobilizacije Flavourzyme-a na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg/g; 10 mM Na-acetatni pufer (pH 7,5); vreme 0-5 h.

Jasno je uočljivo i da su koncentracije imobilisane aktivnosti na FNS i AFNS podjednake i kreću se u opsegu 0,1 nakon 1 h do 0,9 IU/g nakon 3 h. Kada se ovi rezultati uporede sa prinosima imobilizacije proteina (slika 4.45), očigledno je da se imobilizacija na AFNS odigrava na način koji ne pogoduje očuvanju aktivnosti enzima. Iako su koncentracije imobilisanih proteina na AFNS i CCAFNS slične, aktivnost derivata dobijenog sa CCAFNS je trostruko veća.

Analizom dobijenih rezultata za koncentraciju imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti u reakciji hidrolize L-leucin-*p*-nitroanilida Flavourzyme-a na FNS, AFNS i CCAFNS (slika 4.47. (B)) uočava se da je opet najveća koncentracija imobilisane aktivnosti na CCAFNS nanočesticama od 22,84 IU/g. Ponovo, iako je na AFNS nanočesticama ostvarena ista koncentracija imobilisanih proteina kao na CCAFNS (oko 24 mg/g), koncentracija imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti je tri puta veća na CCAFNS nego na AFNS. Koncentracija imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti je najmanja na FNS i iznosi svega 3,09 IU/g, što znači da je ostvarena koncentracija imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti na CCAFNS 8 puta veća u odnosu na FNS. Nameće se zaključak da su formirane interakcije između molekula enzima (LAPA i LAP1), koji poseduju egzo-peptidaznu aktivnost, i CCAFNS omogućile vezivanje ovih enzima u aktivnoj konformaciji.

Za definitivnu procenu efikasnosti imobilizacije na različite nosače neophodno je poređenje specifičnih aktivnosti. U skladu sa prethodno iznetim rezultatima za koncentraciju imobilisane aktivnosti, CCAFNS nanočestice pokazuju i najveće specifične aktivnosti (Tabela 4.16.). Ostvarene najveće vrednosti za prinos imobilizacije aktivnosti prilikom imobilizacije na CCAFNS govore da su uspostavljene interakcije između ALP1, LAPA i LAP1 i ovih nanočestica omogućile vezivanje ovih enzima na način da je pristup supstrata aktivnim centrima ovih enzima olakšan. Kao rezultat dobijene su i najveće specifične aktivnosti prilikom imobilizacije ovih enzima na CCAFNS, a obzirom na važnost egzo-peptidazne funkcije ovog enzima, od velikog je značaja da je naročito izražena razlika upravo kod specifične egzo-peptidazne aktivnosti (Tabela 4.16.).

Izuzetno mali prinosi imobilizacije obe vrste aktivnosti (3,3 i 9,5 %) na FNS nanočestice govore da se nespecifična adsorpcija ALP1, LAPA i LAP1 odvija sa konformacijom koja je rezurtirala sa malim specifičnim aktivnostima od 0,07 i 0,25 IU/mg proteina (Tabela 4.16.).

Takođe, još jednom se pokazalo da velika količina imobilisanih enzima, kao što se desilo prilikom imobilizacije Flavourzyme-a na AFNS, ne mora da dovede do proporcionalno velikih aktivnosti. Fenomen da sa porastom mase vezanih proteina dolazi do pada aktivnosti je zapažen i prilikom imobilizacije Flavourzyme-a na Lewatit R258 K makroporozne čestice veličine 50 mm i specifične površine 50 m²/g sa benzilamin funkcionalnim grupama na površini.²⁵³

Pretpostavka je da je ovakvo ponašanje posledica činjenice da uvedene amino grupe na površinu FNS nanočestica koje nisu ostvarile adekvatne interakcije sa molekulima enzima mogu stvarati dodatne interakcije sa već vezanim molekulima enzima i time dovesti do narušavanja njihove trodimenzionalne strukture što ima za posledicu da dolazi do njihove inaktivacije.

Dodatno, velika je verovatnoća i da je usled velikih količina vezanih enzima na AFNS došlo do otežanog prilaza supstrata aktivnom mestu enzima što je opet dovelo do smanjenih aktivnosti imobilisanih enzima na ove nanočestice.

Tabela 4.16. Poređenje parametara imobilizacije enzima preparata Flavourzyme-a na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: 25 mg/g nanočestica; 10 mM acetatni pufer pH 7,5; vreme 3 h.

Vrsta čestica	Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g)	Prinos imobilizacije proteina (%)	Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g)		Prinos imobilizacije aktivnosti (%)		Specifična aktivnost (IU/mg proteina)	
			Endo-akt.	Egzo-akt.	Endo-akt.	Egzo-akt.	Endo-akt.	Egzo-akt.
FNS	12,15	50	0,92	3,09	3,3	9,5	0,07	0,25
AFNS	24,07	96	0,95	8,33	3,5	14,5	0,03	0,34
CCAFNS	23,57	95,5	2,95	22,84	15	46	0,12	0,96

Treba napomenuti da se enzimi koji čine preparat Flavourzyme vezuju na AFNS preko nekovalentnih interakcija između amino grupa AFNS-a i aminokiselinskih ostataka molekula enzima što u ovom slučaju nije dalo povoljne rezultate u kontekstu aktivnosti. Specifična aktivnost enzima sa endo-peptidaznom aktivnošću iznosi 0,03 IU/mg, dok je 0,3 IU/mg za enzime sa egzo-peptidaznom aktivnošću, što znači da se deset puta veći

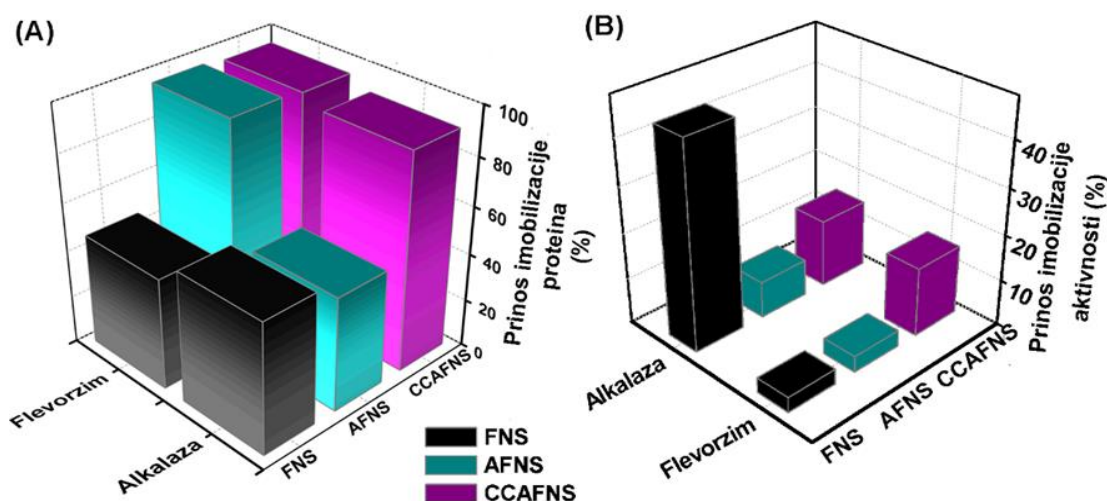
udeo enzima koji ispoljavaju egzo-peptidaznu aktivnost se vezao u aktivnoj konformaciji na AFNS nanočestice (Tabela 4.16.).

Na kraju možemo zaključiti da su komercijalnom preparatu Flavourzyme iz konteksta svih praćenih parametara imobilizacije najviše odgovarale CCAFNS nanočestice.

4.4.1.3. Poređenje efikasnosti imobilizacije proteaza na nanočestice silike

Poređenjem rezultata dobijenih za imobilizaciju komercijalnih preparata Flavourzyme i alkalaze možemo zaključiti da je iz aspekta koncentracije imobilisane aktivnosti najbolje rezultate dala imobilizacija alkalaze na hidrofilne nemođifikovane nanočestice silike (FNS), dok su se za Flavourzyme najbolje pokazale cijanuril-hloridom aktivirane amino-modifikovane silika nanočestice (CCAFNS). U oba slučaja najviše proteina se imobilisalo za CCAFNS.

Radi uporedne analize efikasnosti imobilizacije Flavourzyme i alkalaze na FNS, AFNS i CCAFNS, na slici 4.48. su prikazani uporedni rezultati za prinos imobilizacije proteina (%) i prinos imobilizacije aktivnosti (%) određene u hidrolizi azokazeina.



Slika 4.48. Poređenje prinosa imobilizacije proteina alkalaze i Flavourzyme-a prilikom imobilizacije na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice (A). Poređenje prinosa imobilizacije aktivnosti alkalaze i Flavourzyme-a imobilisanih na FNS, AFNS i CCAFNS (B).

Tokom imobilizacije alkalaze i Flavourzyme-a na FNS nanočestice dobijeni su skoro identični prinosi imobilizacije proteina od 54 odnosno 50 %. Alkalaze pokazuju najveći prinos imobilizacije aktivnosti (41,42 %) prilikom imobilizacije na nemođifikovani nosač, što je 14 puta više nego u slučaju imobilizacije Flavourzyme-a na FNS.

Ipak, najveći kapacitet vezivanja pokazuje CCAFNS, jer su prinosi imobilizacije proteina gotovo jednaki i iznose 90 % odnosno 95 %. Skoro identičan prinos imobilizacije aktivnosti postoji (15 %) i kod alkalaza i kod Flavourzyme-a prilikom imobilizacije na iste ove nanočestice.

Na slici 4.48. (B) je uočljiv značajan pad u prinosu imobilizacije aktivnosti za oba enzima prilikom imobilizacije na AFNS.

Na kraju možemo zaključiti da se oko 50% imobilisanih proteina u slučaju alkalaze pokazalo kao optimalan za dobijanje visokih vrednosti za koncentraciju imobilisane aktivnosti enzima. Povećanjem prinosa imobilizacije proteina u slučaju alkalaze dovelo je do značajnog pada aktivnosti, kao što je slučaj prilikom imobilizacije na CCAFNS. Što se tiče Flavourzyme-a procenat imobilisanih proteina od oko 95 % na CCAFNS se pokazao kao optimalni za dobijanje najvećeg prinosa imobilizacije aktivnosti. Treba napomenuti da su i alkalaza i Flavourzyme-a pokazali indentičan afinitet ka kovalentnom vezivanju na CCAFNS, gledano iz ugle prinosa imobilizacije aktivnosti. Prilikom adsorpcije na AFNS, dva puta veći prinosi imobilizacije aktivnosti su ostvareni za alkalazu pri čemu se dva puta manje proteina imobilisalo na ove nanočestice u odnosu na Flavourzyme-a kod koga je trend obrnut.

4.4.2. Imobilizacija proteaza na epoksi-modifikovane nanočestice silike

Izučavana je i pogodnost primene epoksi-modifikovanih nanočestica silike (GFNS) kao nosača za imobilizaciju komerijalnih preparata proteaza Flavourzyme i alkalaze. Treba napomenuti da pregledom literature nisu pronađeni podaci o imobilizaciji alkalaza i Flavourzyme-a na nosače sa epoksi grupama na površini.

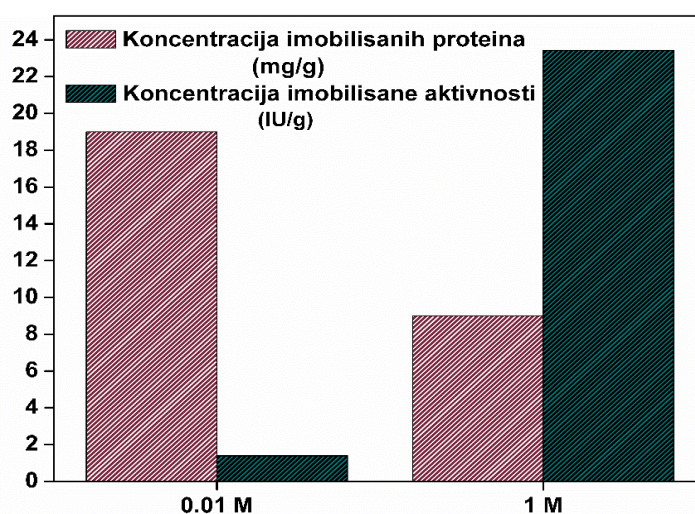
4.4.2.1. Imobilizacija alkalaza na epoksi-modifikovane nanočestice silike

4.4.2.1.1. Uticaj jonske jačine pufera na imobilizaciju alkalaza

U cilju određivanja optimalnih uslova imobilizacije alkalaza na FNS nanočestice modifikovane GOPTMS-om (GFNS), kao i procene adekvatnosti ovih nanočestica kao nosača za imobilizaciju ovog komercijalnog preparata proteaza, ispitan je uticaj jonske jačine Na-acetatnog pufera upotrebljenog tokom imobilizacije na koncentraciju imobilisanih proteina i koncentraciju imobilisane aktivnosti (slika 4.49.).

U puferu manje jonske jačine, prilikom imobilizacije alkalaze na GFNS nanočestice dobijena je 2 puta veća koncentracija imobilisanih proteina nego u puferu veće jonske

jačine. Verovatno zbog suzbijenih elektrostatičkih interakcija u u 1 M puferu na GFNS nanočestice vezalo se svega 9 mg/g nanočestica (slika 4.49.).



Slika 4.49. Uticaj jonske jačine Na-acetatnog pufera na koncentraciju imobilisanih proteina i koncentraciju imobilisane aktivnosti alkalaze na GFNS nanočestice.

Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg/g; 0,1 i 1 M Na-acetatni pufer; vreme 3 h.

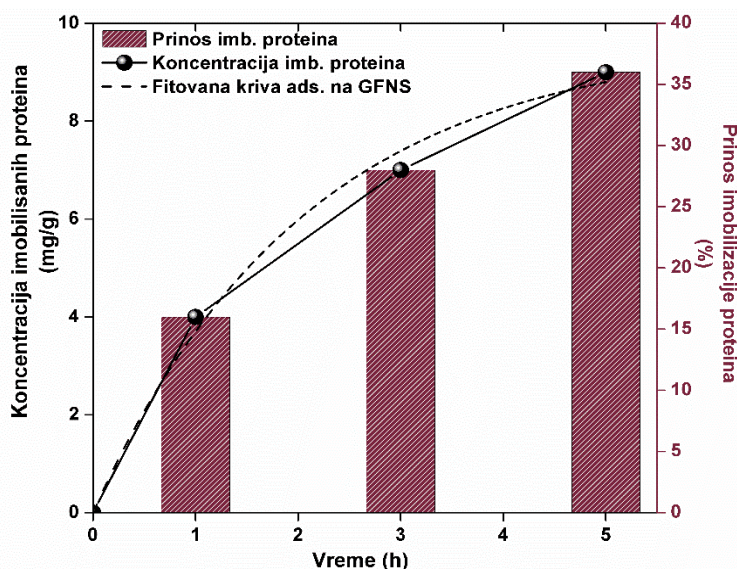
Suprotno od ostvarenog trenda za koncentraciju imobilisanih proteina, koncentracija imobilisane aktivnosti u 1 M puferu je 20 puta veća u odnosu na ostvarenu koncentraciju imobilisane aktivnosti u 0,01 M puferu.

Nameće se zaključak da imobilizacija alkalaze u uslovima koji pospešuju kovalentno vezivanje (1 M pufer) omogućava da se dobije aktivniji imobilisan enzim verovatno zbog činjenice da molekuli enzima prilikom imobilizacije zauzimaju konformaciju i orijentaciju koje dovode do povećanja aktivnosti. Trebalo bi napomenuti da pri velikim koncentracijama imobilisanih proteina može da dođe do difuzionih limitacija i sternih smetnji prilikom prilaza supstrata aktivnim mestima imobilisanih enzima što rezultira smanjenjem aktivnosti kao što se desilo u slučaju imobilizacije alkalaze na GFNS u 0,01 M puferu. Uspešnija imobilizacija na GFNS nanočestice u 1 M puferu je u skladu sa rezultatima koji su dobijeni i prilikom imobilizacije lipaze na iste ove nanočestice, pa možemo zaključiti da generalno visoka jonska jačina pospešuje imobilizaciju enzima u aktivnoj konformaciji na epoksi-modifikovane nanočestice silike.

Kako bi detaljnije proučili proces imobilizacije alkalaze na GFNS nanočestice u 1 M puferu, praćeni su najvažniji parametri imobilizacije (koncentracija imobilisanih proteina,

koncentracija imobilisane aktivnosti, prinos imobilizacije proteina, prinos imobilizacije aktivnosti i specifična aktivnost) u toku vremena (slike 4.50., 4.51. i Tabela 4.17.).

Tokom imobilizacije alkalaze na GFNS nanočestice koncentracija imobilisanih proteina raste u toku vremena da bi maksimum od 9 mg/g dostigla nakon 5 h (slika 4.50.). Gledano iz ugla prinosa imobilizacije proteina maksimum od svega 36 % je postignut takođe nakon 5 h. Ravnotežna koncentracija imobilisanih proteina na GFNS dobijena primenom kinetičkog modela pseudo-prvog reda odgovara vrednosti koja je eksperimentalno dobijena i iznosi 9,66 mg/g (isprekidana kriva na slici 4.50.). Koeficijent korelacije za „fitovanje“ kinetike adsorpcije na GFNS kinetikom pseudo-prvog reda ima visoku vrednost od 0,990, što ukazuje da je poklapanje sa ovim modelom dobro i da se imobilizacija alkalaze definitivno odigrava kinetikom pseudo-prvog reda na GFNS nanočestice.



Slika 4.50. Promena koncentracije imobilisanih proteina (crne kuglice) i prinosa imobilizacije proteina (stubići) u toku vremena prilikom imobilizacije alkalaze na GFNS nanočestice. Isprekidane krive na slici predstavljaju kinetički model pseudo-prvog reda. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 m/g; 1 M Na-acetatni pufer (pH 7,5); vreme 0-5 h.

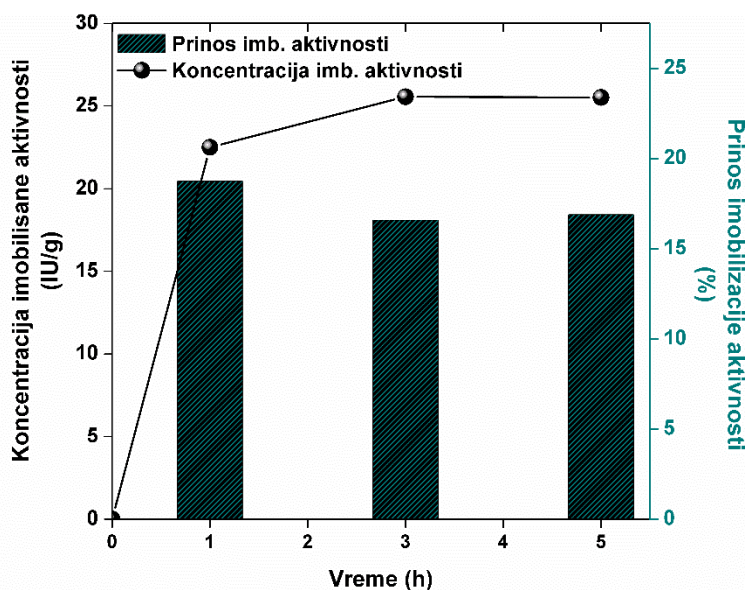
U poređenju sa drugim nosačima na koje je alkalaza dosada imobilisana, maksimum koncentracije imobilisanih proteina od 9 mg/g koliko je ostvareno u slučaju imobilizacije na GFNS je jednaka ostvarenoj koncentraciji prilikom imobilizacije na amino-

modifikovane porozne čestice silika prečnika 5 μm ,²⁵⁵ dok je 115 mg alkalaze vezano za 1 g suvog kserogela silike što je 12 puta više nego na GFNS nanočestice.²⁵⁰

Ako uporedimo ostvarene koncentracije imobilisanih proteina prilikom kovalentne imobilizacije alkalaze na CCAFNS nanočestice sa rezultatima ostvarenim prilikom kovalentne imobilizacije na GFNS uočavamo da je 2,5 puta više enzima vezano na CCAFNS u odnosu na GFNS. Treba imati na umu da je imobilizacija alkalaze na CCAFNS izvođena u 0,01 M puferu koji pogoduje vezivanju enzima formiranjem i elektrostatičkih interakcija naspram 1 M pufera u slučaju imobilizacije na GFNS gde su one suzbijene, čime se mogu objasniti manje koncentracije imobilisanih proteina na GFNS.

4.4.2.1.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti alkalaza na epoksi-modifikovane nanočestice

Ipak, kako bi do kraja procenili pogodnost GFNS nanočestica za korišćenje kao nosača za imobilizaciju alkalaze proučavane su i koncentracije imobilisane aktivnosti kao i prinos imobilizacije aktivnosti tokom 5 h (slika 4.51). Koncentracija imobilisane aktivnosti alkalaze na GFNS je ispitivana u reakciji hidrolize azokazeina.



Slika 4.51. Promena koncentracije imobilisane aktivnosti (crne kuglice) i prinosa imobilizacije aktivnosti (stubići) u toku vremena prilikom imobilizacije alkalaze na GFNS nanočestice u 1 M puferu.

Analizom krive predstavljene na slici 4.51. zapaža se da koncentracija imobilisane aktivnosti raste u toku vremena da bi maksimum od 25 IU/g dostigla nakon 3 h. Daljim

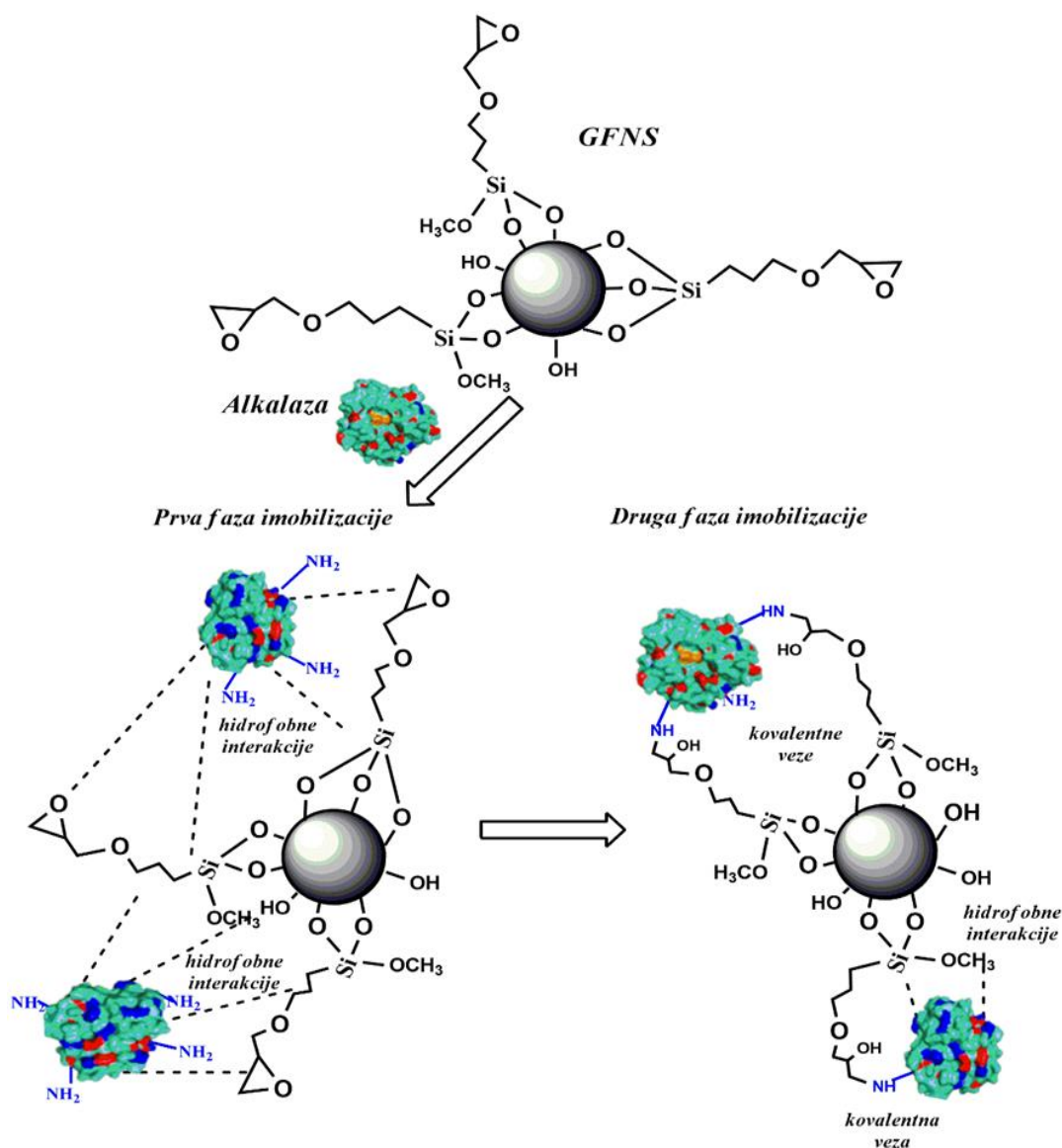
produženjem imobilizacije do 5 h nije došlo do promena u koncentraciji imobilisane aktivnosti, iako je koncentracija imobilisanih proteina porasla sa 7 mg/g koliko je iznosila nakon 3 h na 9 mg/g (slika 4.50.). Prinosi imobilizacije aktivnosti nakon 1, 3 i 5 h su veoma slični i iznose oko 16 %, što znači da je povećanje koncentracije imobilisanih proteina za skoro 50 % između 1. i 3. sata dovelo do povećanja koncentracije imobilisane aktivnosti od svega 1 %. Ako se analiziraju specifične aktivnosti (Tabela 4.17.) može se zapaziti da je najveća specifična aktivnost dobijena nakon 1 h, da bi nakon toga pala za 35 %.

Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da se nakon 1 h većina enzima vezala u aktivnoj konformaciji i da svako dalje povećanje koncentracije imobilisanih proteina dovodi do smanjenja specifične aktivnosti alkalaze na GFNS nanočestice tj. ne doprinosi značajno povećanju aktivnosti dobijenog imobilisanog preparata.

Tabela 4.17. Specifična aktivnost alkalaze imobilisane na GFNS nanočestice u 1 M Na-acetatnom puferu.

<i>GFNS nanočestice</i>	<i>Specifična aktivnost (IU/mg proteina)</i>
<i>1 h</i>	<i>5,75</i>
<i>3 h</i>	<i>3,57</i>
<i>5 h</i>	<i>2,7</i>

Dokazano je na primeru lipaze u poglavlju 4.2.2.1., da se imobilizacija enzima na epoksi-modifikovane nanočestice odigrava u dve faze. U prvoj fazi dolazi do adsorpcije enzima formiranjem hidrofobnih interakcija, nakon čega dolazi do formiranja kovalentnih veza između amino grupa prisutnih na površini adsorbovanih molekula enzima i epoksi grupa u njihovoj okolini pa se može pretpostaviti da se i imobilizacija alkalaze odigrava po istom mehanizmu (šema 4.15.).



Šema 4.15. Šematski prikaz imobilizacije alkalaze na epoksi-modifikovane silika nanočestice.

4.4.2.1.3. Poređenje efikasnosti imobilizacije alkalaza na epoksi- i amino-modifikovane nanočestice silike

Naime, u sklopu ove doktorske disertacije izučavana je kovalentna imobilizacija alkalaze na dve vrste nanočestica (GFNS i CCAFNS), kao i adsorpcija na FNS i AFNS nanočestice. Sumirane karakteristike alkalaze imobilisane na FNS, AFNS, GFNS i CCAFNS su prikazane u Tabeli 4.18. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4.18. se vidi da je koncentracija imobilisane aktivnosti alkalaza na GFNS 10 puta veća u odnosu na CCAFNS iako se na GFNS vezalo 3 puta manje enzima. Adsorpcija alkalaze

formiranjem lokalizovanih elektrostatičkih interakcija između ϵ -amino grupa enzima i silanol grupa FNS nanočestica je ispoljila 22 % manju koncentraciju imobilisane aktivnosti pri koncentraciji imobilisanih proteina od 13,7 mg/g u odnosu na kovalentnu imobilizaciju na GFNS pri 7 mg/g.

Tabela 4.18. Poređenje karakteristika imobilisane alkalaze na FNS, AFNS, CCAFNS i GFNS. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg/g; Na-acetatni pufer 0,01 M pufer za FNS, AFNS i CCAFNS; i 1 M za GFNS. Vreme 3 h.

<i>Vrsta nanočestice</i>	<i>Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g)</i>	<i>Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g)</i>	<i>Specifična aktivnost (IU/mg)</i>	<i>Prinos imobilizacije proteina (%)</i>
<i>FNS</i>	19,6	13,7	1,4	54
<i>AFNS</i>	5,5	11,5	0,46	45
<i>CCAFNS</i>	2,3	22,75	0,1	91
<i>GFNS</i>	25	7	3,57	28

Imobilizacijom alkalaza na CCAFNS nanočestice još jednom se pokazalo da velike koncentracije imobilisanih proteina (22,75 mg/g, odnosno 91 %) ne moraju uvek da znače i da će se dobiti velike vrednosti za koncentraciju imobilisane aktivnosti. Očito je da uspešna kovalentna imobilizacija alkalaza preko ϵ -amino grupa lizina koje se nalaze na površini ovih molekula zahteva da postoji rastojanje između susedno vezanih molekula enzima kako bi molekuli enzima mogli pravilno da se orjentišu za uspostavljanje odgovarajućih interakcija sa grupama na površini nosača.

Gusto pakovanje alkalaza na površini nosača dovodi do interakcija između susednih molekula enzima čime dolazi do njihove inaktivacije. Potvrda ovih tvrdnji su i vrednosti za specifičnu aktivnost koja je u slučaju GFNS nanočestica čak 35 puta veća nego u slučaju CCAFNS nanočestica. Ovako velika razlika u specifičnoj aktivnosti je iznenađujuća ako se uzme u obzir da imobilizacija na oba nosača treba da se odigrava preko dela molekula enzima bogatog amino grupama (slika 4.43.) pa se očekuje da na oba imobilisana preparata enzim ima jednaku orijentaciju.

Velika razlika u specifičnoj aktivnosti ukazuje na značaj nekovalentnih interakcija između enzima i drugih grupa na nosaču koje mogu da utiču na njegovu konformaciju.

Takođe, moguće je da se pri imobilizaciji javlja „višetačkasto“ formiranje kovalentnih veza koje takođe može da deformiše konformaciju enzima.

4.4.2.2. Imobilizacija Flavourzyme-a na epoksi-modifikovane nanočestice silike

Nakon što su se epoksi-modifikovane nanočestice silike pokazale kao dobri nosači za imobilizaciju komercijalnog preparata proteaza alkalaza, pokušana je i imobilizacija komercijalnog preparata Flavourzyme na ove nanočestice.

4.4.2.2.1. Kinetika adsorpcije Flavourzyme-a na epoksi-modifikovane nanočestice silike

Kinetika adsorpcije i prinos imobilizacije proteina Flavourzyme-a na GFNS nanočestice u 0,01 M i 1 M Na-acetatnom puferu (pH 7,5) praćena je tokom 5 h (slika 4.52.).

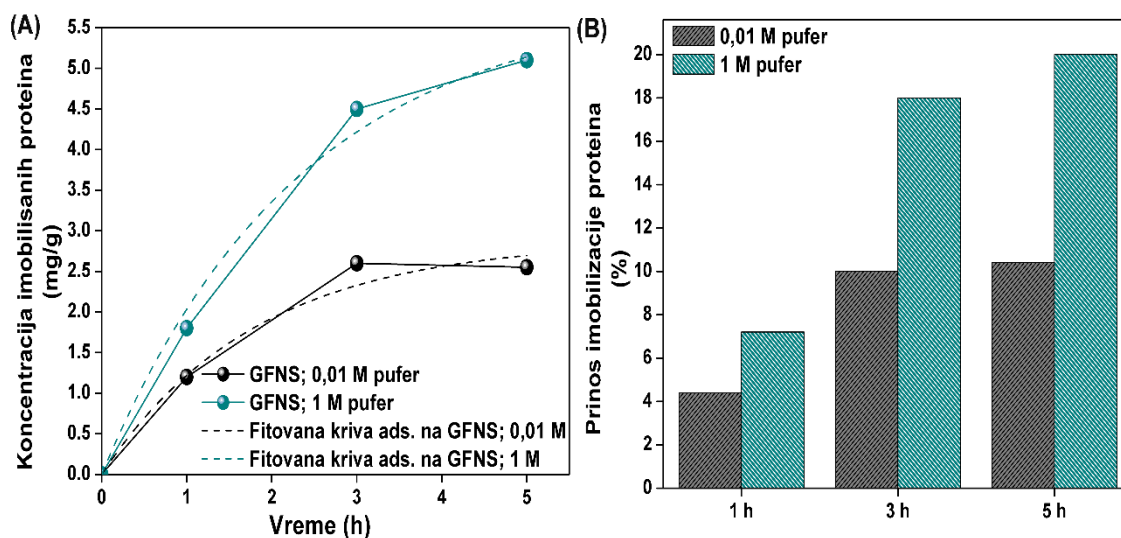
Maksimumi koncentracije imobilisanih proteina dostignuti su nakon 5 h na GFNS u 0,01 M i 1 M puferu i iznose 2,6 i 5 mg/g nanočestica, redom (slika 4.52. (A)). Kinetika adsorpcije Flavourzyme-a na GFNS u 0,01 M i 1 M puferu je “fitovana” kinetičkim modelom pseudo-prvog reda (isprekidane krive na slici 4.52. (A)).

Koncentracija imobilisanih proteina postignuta prilikom imobilizacije Flavourzyme-a na GFNS u 1 M puferu je 2,5 puta veća nego u 0,01 M puferu. U oba pufera adsorpcija je bila spora i maksimumi su dostignuti tek nakon 5 h. Prinosi imobilizacije proteina se u 0,01 M puferu kreću u opsegu od 4-10 %, dok su prinosi u 1 M puferu nešto veći i idu do 20 % nakon 5 h (slika 4.52. (B)).

Imobilizacijom alkalaza na GFNS nanočestice u 1 M puferu postignute vrednosti koncentracije imobilisanih proteina su bile 2 puta veće u odnosu na Flavourzyme, dok je vreme za koje je dostignut maksimum identično.

Iz konteksta koncentracije imobilisanih proteina i prinosa imobilizacije proteina može se zaključiti da epoksi-modifikovane nanočestice nemaju odgovarajuću hemiju površine za vezivanje Flavourzyme-a.

Međutim, kako se u slučaju imobilizacije alkalaze na GFNS nanočestice pokazalo da su male koncentracije imobilisanih proteina dale visoke vrednosti koncentracije imobilisane aktivnosti potrebno je i u slučaju Flavourzyme-a ispitati kakve su koncentracije imobilisanih aktivnosti kao i prinos imobilizacije aktivnosti na GFNS pre donošenja finalnog zaključka da li su GFNS nanočestice adekvatne za imobilizaciju ovog komercijalnog preparata proteaza.

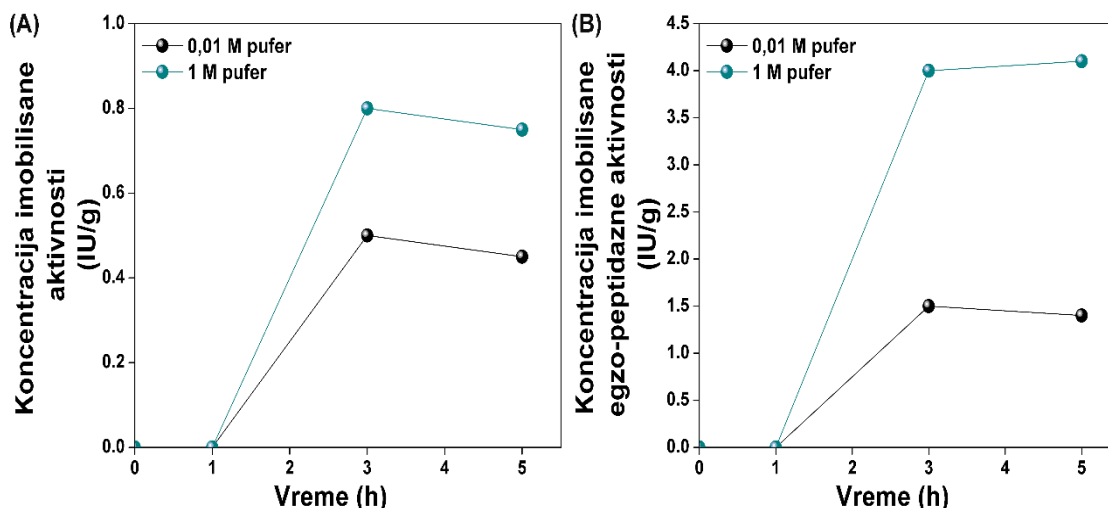


Slika 4.52. Kinetika adsorpcije Flavourzyme-a na GFNS nanočestice (A). Prinos imobilizacije proteina Flavourzyme-a na GFNS nanočestice (B). Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg/g; 0,01 M i 1 M Na-acetatni pufer (pH 7,5); vreme 0-5 h.

4.4.2.2.2. Efikasnost imobilizacije aktivnosti Flavourzyme-a na epoksi-modifikovane nanočestice silike

Dakle, kako komercijalni preparat proteaza Flavourzyme sadrži proteazu ALP1 koja ispoljava endo-peptidaznu aktivnost i dve proteaze LAPA i LAP1 sa egzo-peptidaznom aktivnošću koncentracija imobilisane aktivnosti Flavourzyme-a na GFNS nanočestice u 0,01 M i 1 M Na-acetatnom puferu određivana je u reakcijama hidrolize dva supstrata: azokazeina i L-leucin-*p*-nitroanilida. Promena koncentracije obe imobilisane aktivnosti Flavourzyme-a na epoksi-modifikovanim nanočesticama silike je praćena tokom 5 h (slika 4.53.).

Imobilisan Flavourzyme na GFNS u 0,01 M odnosno 1 M puferu nakon 1 h nije imao aktivnost što je i nije iznenađujuće s obzirom da se za to vreme na GFNS nanočestice vezalo svega 4 % i 7 % inicijalno ponuđenih proteina. U oba pufera koncentracija obe imobilisane aktivnosti dostiže maksimum nakon 3 h, nakon čega dolazi do blagog pada aktivnosti (slika 4.53. (A) i (B)).



Slika 4.53. Promena koncentracije imobilisane aktivnosti u reakciji hidrolize azokazeina (A) i koncentracije imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti (B) Flavouzyme-a na GFNS nanočesticama. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg/g; 0,01 M i 1 M Na-acetatni pufer (pH 7,5); vreme 0-5 h.

Najveća koncentracija imobilisane aktivnosti u hidrolizi azokazeina od 0,8 IU/g je dobijena na GFNS nanočesticama kada je imobilizacija izvođena u 1 M puferu (slika 4.53. (A)), i u skladu je sa koncentracijom imobilisanih proteina s obzirom da se na GFNS u ovom puferu vezalo najviše proteina (5 mg/g) (slika 4.52. (A)). U 0,01 M puferu ostvarena aktivnost je upola manja nego u 1 M puferu.

Uočava se da je i najveća koncentracija imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti od 4 IU/g postignuta u 1 M puferu. U 0,01 M puferu maksimum egzo-peptidazne aktivnosti je iznosio 1,5 IU/g (Tabela 4.19.).

Tabela 4.19. Poređenje parametara imobilizacije enzima preparata Flavouzyme-a na GFNS nanočestice. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: 25 mg/g nanočestica; 10 mM i 1 M acetatni pufer (pH 7,5); vreme 3 h.

GFNS	Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g)	Prinos imobilizacije proteina (%)	Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g)		Prinos imobilizacije aktivnosti (%)		Specifična aktivnost (IU/mg proteina)	
			Endo-akt.	Egzo-akt.	Endo-akt.	Egzo-akt.	Endo-akt.	Egzo-akt.
0,01 M pufer	2,5	10	0,4	1,5	1,2	1,4	0,16	0,6
1 M pufer	4,5	18	0,8	4	2,4	7	0,17	0,66

Dakle, i sa stanovišta postignutih prinosa imobilizacije aktivnosti možemo zaključiti da za imobilizaciju Flavourzyme-a na GFNS 1 M pufer adekvatniji jer je ostvareni prinos aktivnosti 2, odnosno 5 puta veći, nego u 0,01 M puferu (Tabela 4.19.).

4.4.2.2.3. Poređenje efikasnosti imobilizacije Flavourzyme-a na epoksi- i amino-modifikovane nanočestice silike

Poređenjem rezultata za koncentraciju imobilisanih proteina na GFNS u 10 mM puferu sa rezultatima koji su ostvareni prilikom imobilizacije ovog enzima na FNS, AFNS i CCAFNS, zapaža se da je afinitet Flavourzyma za imobilizaciju na FNS, AFNS i CCAFNS u 10 mM puferu 6, 9 i 10 puta veći, redom, kao i da su maksimumi koncentracije imobilisanih proteina na ove nanočestice dostignuti 1,6 puta brže (slika 4.54.).

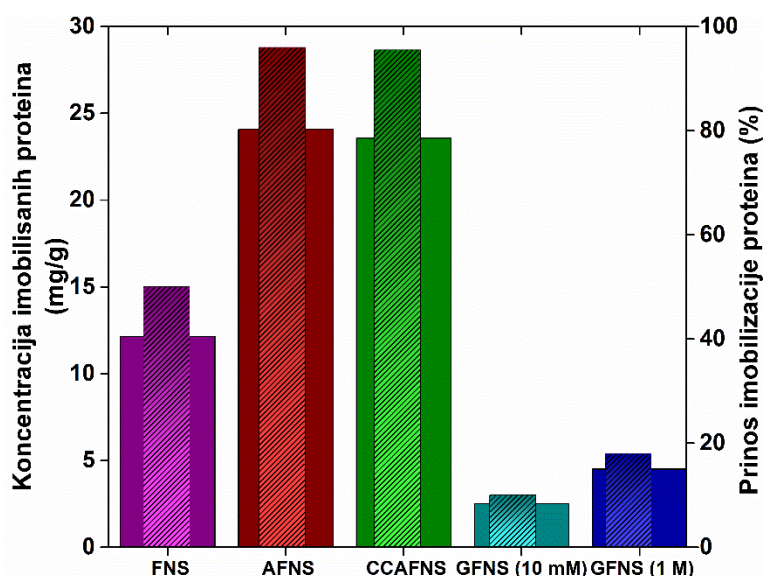
Prinosi imobilizacije proteina na FNS, AFNS i CCAFNS su mnogo veći (idu do 96 %) nego na GFNS (10 %). Imobilizacijom Flavourzyme-a na GFNS u 1 M puferu ostvarena je 2 puta veća koncentracija imobilisanih proteina nego u 10 mM puferu, međutim to je i dalje višestruko manje u odnosu na FNS, AFNS i CCAFNS nanočestice.

I analizom ostvarenih aktivnosti u reakciji hidrolize azokazeina i egzo-peptidaznih aktivnosti dobijenih imobilisanih preparata može se konstatovati da CCAFNS nanočestice u odnosu na sve ostale korišćene nosače imaju najadekvatniju hemiju površine za vezivanje svih enzima preparata Flavourzyme-a (slika 4.55.).

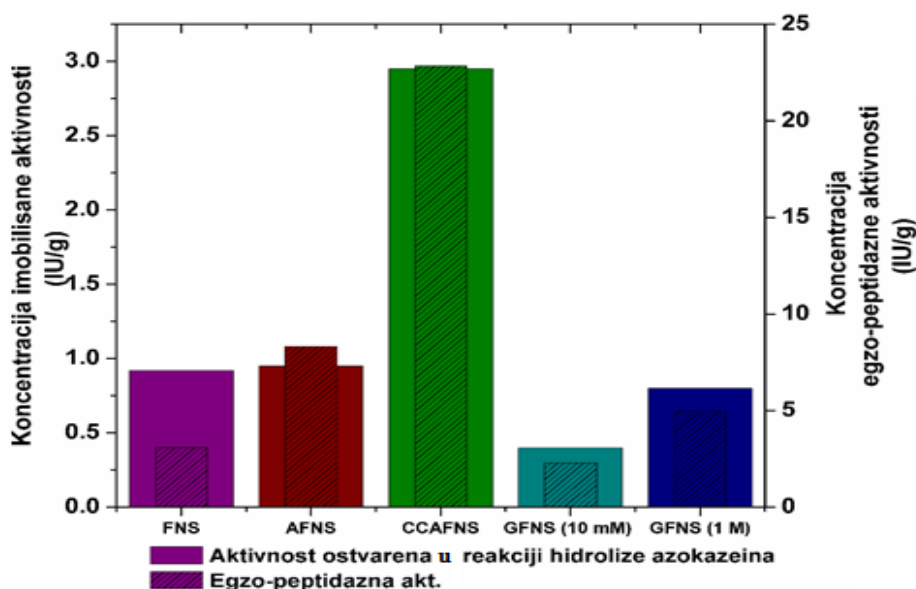
Ostvarene aktivnosti u hidrolizi azokazeina Flavourzyme-a na FNS, AFNS i GFNS (1 M) se ne razlikuju značajno i iznose oko 0,9 IU/g. Najmanju aktivnost ima imobilisani Flavourzyme na GFNS nanočestice u 10 mM puferu. Prinos imobilizacije aktivnosti je čak 6,5 puta veći na CCAFNS nego na GFNS(1 M).

Najmanje egzo-peptidazne aktivnosti su ostvarene prilikom imobilizacije na FNS i GFNS (10 mM). Dok je prinos imobilizacije egzo-peptidazne aktivnosti ubedljivo najveći (46 %) prilikom imobilizacije na CCAFNS, dok na GFNS iznosi svega 7 % odnosno 1,2 % (Tabela 4.16. i 4.19.).

Iz svih prezentovanih rezultata može se zaključiti da je imobilizacija Flavourzyme-a na CCAFNS najefikasnija iz aspekta svih praćenih parametara imobilizacije. Takođe, možemo zaključiti i da GFNS nanočestice nisu adekvatne za primenu u imobilizaciji Flavourzyme-a s obzirom na male prinose imobilizacije proteina i aktivnosti.



Slika 4.54. Poređenje koncentracije imobilisanih proteina i prinosa imobilizacije Flavourzyme-a na FNS, AFNS, CCAFNS i GFNS nanočestice. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg/g; 10 mM i 1 M Na-acetatni pufer; vreme 3 h za FNS, AFNS i CCAFNS, a za GFNS 5 h.



Slika 4.55. Poređenje koncentracije imobilisane aktivnosti ostvarene u reakciji hidrolize azokazeina i egzo-peptidazne aktivnosti Flavourzyme-a na FNS, AFNS, CCAFNS i GFNS nanočestice. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 25 mg/g; 10 mM i 1 M Na-acetatni pufer; vreme 3 h za FNS, AFNS i CCAFNS, a za GFNS 5 h.

4.4.3. Primena imobilisanih proteaza u hidrolizi suncokretove sačme

Sve veći porast ljudske populacije i smanjenje prirodnih resursa za ishranu doveo je do usmeravanja istraživanja ka upotrebi novih resursa za ljudsku ishranu kao što su npr. otpadne sirovine nastale prilikom prerade žitarica u industrijskim postupcima.

Suncokret je najznačajnija uljarica koja se koristi kao sirovina za proizvodnju jestivog ulja. Najveći proizvođači suncokreta su Rusija, Argentina, Francuska, SAD, Kina i Španija.²⁶² Suncokretova sačma je glavni nus-produkt koji nastaje prilikom industrijskog postupka ekstrakcije ulja iz suncokretovog semena. Suncokretova sačma sadrži u proseku oko 30 % proteina pa može predstavljati dobar izvor proteina za ishranu ljudi.²⁶³

Kako bi mogli da se koriste proteini suncokretove sačme za ishranu potrebno je frakcionisati suncokretovu sačmu radi smanjenja sadržaja nepoželjnih komponenata (rastvorni šećeri, polifenoli, i masti) koje smanjuju hemijsku i nutritivnu vrednost proteina. Prisustvo rastvorljivih šećera i masti je nepoželjno jer oni mogu da reaguju sa proteinima (Majlardova reakcija) što dovodi do smanjenja sadržaja esencijalnih aminokiselina (lizin, triptofan i metionin).²⁶⁴

Fenoli lako podležu oksidaciji do hinona koji opet podležu transformaciji do polimera koji daju braon boju finalnom proizvodu.²⁶⁵ Takođe, lignocelulozna vlakna koja predstavljaju glavnu komponentu suncokretove sačme pored proteina moraju biti uklonjeni kako bi se obogatio finalni proteinski proizvod.

Do sada je publikovano nekoliko metoda za frakcionisanje suncokretove sačme i dobijanje koncentrovanih proteinskih izolata.²⁶⁶⁻²⁶⁸ Većina njih uključuje korišćenje organskih rastvarača (etanol), soli i/ili redukujućih reagenasa i izoelektrične precipitacije. Međutim, najčešće se koristi postupak koji su razvili Parado i sar., a koji se sastoji od sedimentacije/flotacije i izoelektrične percipitacije.²⁶⁹ Ovaj postupak ne iziskuje upotrebu organskih rastvarača već se suncokretova sačma disperguje u vodi. Nakon frakcionisanja suncokretove sačme ovim postupkom dobijen proteinski izolat je bogat proteinima (iznad 90 %) i ima mali sadržaj rastvorljivih šećera, masti, fenola i lignoceluloznih vlakana.²⁴⁹ Proteinski izolati dobijeni frakcionisanjem suncokretove sačme imaju sličan sastav aminokiselina kao i suncokretovo seme pre industrijskog procesa ekstrakcije ulja. Lizin, valin i izoleucin su aminokiseline koje su najviše podložne degradaciji tokom postupka ekstrakcije ulja pa se može desiti da proteinski izolati imaju neznatno smanjen sadržaj ovih aminokiselina.²⁷⁰ Ali proteinski izolati imaju relativno visok sadržaj aminokiselina

kao što su metionin i cistein (oko 5 g na 100 g sirovih proteina) pa su vrlo pogodni za primenu u ljudskoj ishrani.²⁴⁹

Dodatno, proteinski izolati suncokretove sačme imaju visok sadržaj arginina (oko 11,6 g na 100 g sirovih proteina) pa se mogu koristiti kao izvori ove aminokiseline u ishrani ljudi.²⁴⁹

Arginin je polu-esencijalna aminokiselina koja učestvuje u nekoliko biohemijskih procesa u organizmu ljudi.²⁷¹ Ljudi mogu da je sintetišu ali ne postoji kompenzatorni mehanizam u slučaju nedostatka ove aminokiseline pa se unosom ove aminokiseline kroz hranu može nadoknaditi njen nedostatak.

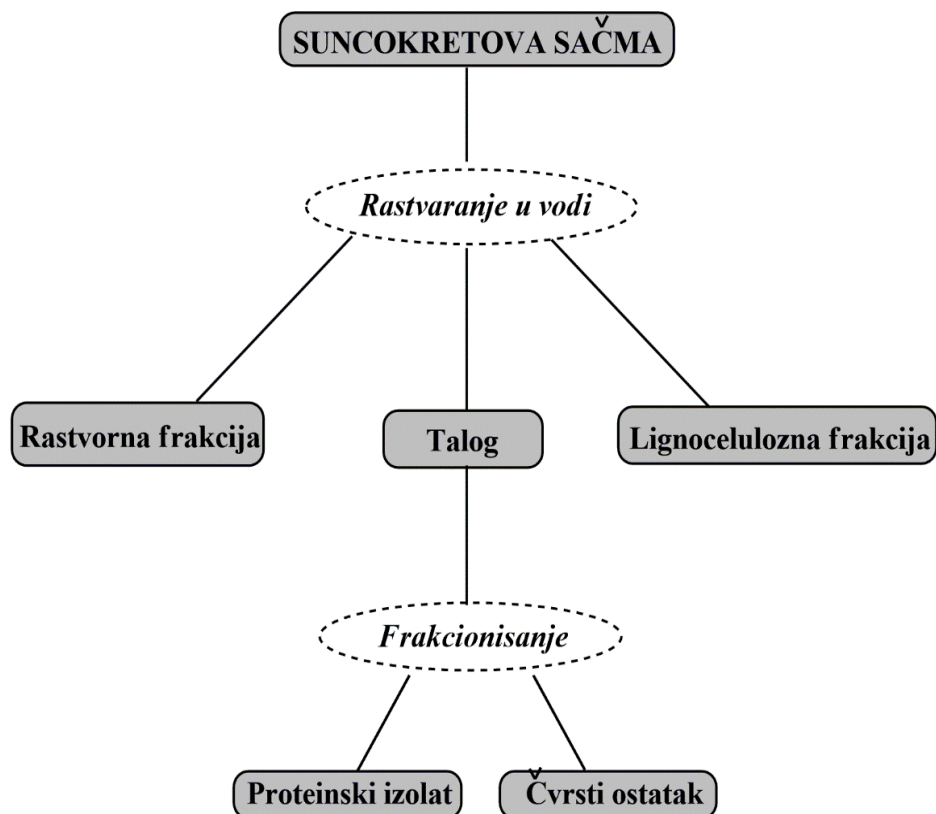
Relativno visok sadržaj histidina koji se smatra esencijalnim za razvoj dece je još jedna potvrda da proteinski izolati suncokretove sačme predstavljaju značajan proizvod koji se može koristiti u ishrani ljudi.²⁷²

Takođe, iz proteinskih izolata mogu se enzimskim procesima dobiti hidrolizati poboljšanih funkcionalnih svojstava koji se mogu koristiti kao aditivi u prehrambenoj industriji i za proizvodnju suplementa visokih nutritivnih vrednosti.

Pregledom literature pronađena su dva načina dobijanja proteinskih enzimskih hidrolizata suncokretove sačme i to pomoću keraza (serinske proteaze izolovane iz *Streptomyces fradiae*) i kombinacijom dva komercijalna preparata proteaza alkalaze i Flavourzyme-a.²⁴⁹

Finalni proteinski hidrolizati dobijeni pomoću keraza su tamni, gorki koncentri proteina koji sadrže visok sadržaj nedigestibilnih komponenti. Dok proteinski hidrolizati alkalaze i Flavourzyme-a su bele boje, nemaju gorak ukus i imaju mali sadržaj nedigestibilnih komponenti pa se mogu primeniti npr. u proizvodnji energetskih pića.

U sklopu ovog istraživanja korišćen je proteinski izolat suncokretove sačme dobijen postupkom koji je optimizovan na Katedri za BIB.²⁷³ Postupak dobijanja proteinskog izolata suncokretove sačme je prikazan na šemi 4.16., a detaljno je opisan u poglavlju 3.2.12.1.



Šema 4.16. Postupak dobijanja proteinskog izolata suncokretove sačme.

Tabela 4.20. Sadržaj sirovih proteina u čvrstim frakcijama dobijenim razdvajanjem suncokretove sačme.²⁷³

Uzorak	Koncentracija proteina (%)	Vlažnost (%)	Koncentracija proteina u suvoj materiji (%)
Suncokretova sačma	34,31	8,45	37,5
Lignocelulozna frakcija	4,5	75,53	18,4
Čvrsti ostatak	4,9	87,73	40
Proteinski izolat	2,36	97,08	80,8

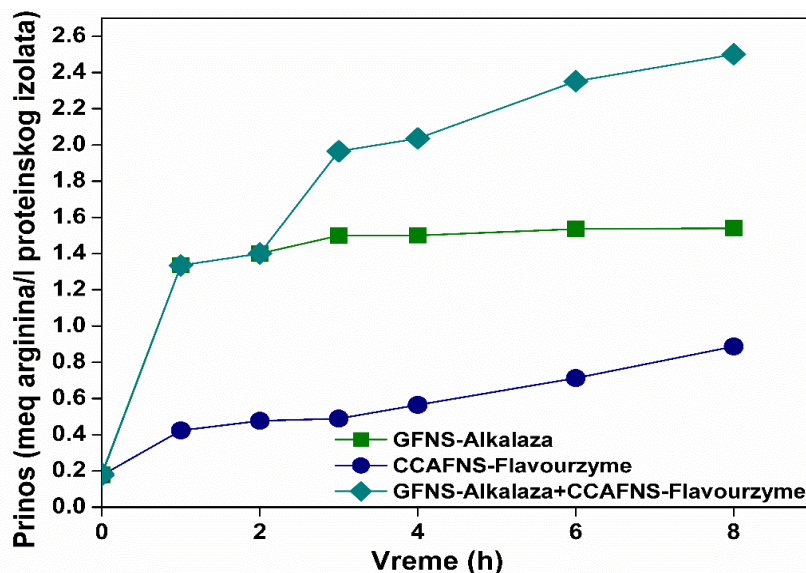
Proteinski izolat je vrlo vredan proizvod, pa dodatno unapređenje postupka razdvajanja može da se postigne poboljšanjem funkcionalnih svojstava hidrolizom imobilisanim preparatima alkalaze i Flavourzyme-a koji su pokazali najbolje karakteristike u prethodnom delu istraživanja (karakteristike imobilisanih enzima su date u Tabeli 4.21.).

Hidroliza proteinskog izolata suncokretove sačme je izvedena pomoću alkalaze imobilisane na GFNS u 1 M puferu, Flavourzyme-a imobilisanog na CCAFNS u 0,1 M puferu i kombinacijom ova dva imobilisana preparata tako što je nakon 2 h od početka reakcije sa imobilisanom alkalazom na GFNS dodat imobilisan Flavourzyme na CCAFNS.

Tabela 4.21. Karakteristike imobilisanih enzima korišćenih u reakciji hidrolize suncokretove sačme.

<i>Imobilisan enzim</i>	<i>Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g)</i>	<i>Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g)</i>
<i>GFNS-alkalaza, 0,1 M pufer</i>	<i>7</i>	<i>25</i>
<i>CCAFNS-Flavourzyme, 1 M pufer</i>	<i>23,57</i>	<i>22,8</i>

Prilikom primene alkalaze imobilisane na GFNS ostvaren je maksimalni prinos proizvoda 1,539 meq arginina/l proteinskog izolata nakon 8 h, međutim treba naglasiti da je hidroliza išla brzo i da je 90 % ukupnog ostvarenog prinosa postignut već nakon 1 h od početka reakcije hidrolize (slika 4.56.).



Slika 4.56. Hidroliza proteinskog izolata suncokretove sačme katalizovana imobilisanom alkalazom na GFNS, imobilisanim Flavourzyme-om na CCAFNS i kombinacijom ova dva imobilisana preparata (imobilisan preparat Flavourzyme-a dodat u reakcionu smešu nakon 2 h).

U slučaju reakcije sa imobilisanim Flavourzyme-om na CCAFNS hidroliza je tekla nešto sporije ali sa konstantnim porastom prinosa proizvoda do 8 h. Maksimalni ostvareni prinos imobilisane alkalaze je 1,7 puta veći od maksimalnog ostvarenog prinosa sa imobilisanim Flavourzyme-om (slika 4.56.).

Dodatkom imobilisanog Flavourzyme-a u reakcionu smešu nakon 2 h trajanja hidrolize sa imobilisanom alkalazom dolazi do naglog rasta prinosa proizvoda u prvih sat vremena za 0,6 meq/l proteinskog izolata da bi nakon 8 h prinos bio 2,5 meq arginina/l proteinskog izolata.

Ovakav rezultat ukazuje da je hidroliza proteinskog izolata imobilisanom alkalazom povećala broj N-terminalnih mesta za egzo-peptidaznu aktivnost imobilisanog Flavourzyme-a pa je aktivnost imobilisanog Flavourzyme-a porasla 3 puta u odnosu na prvi sat hidrolize kada je korišćen samo imobilisan Flavourzyme.

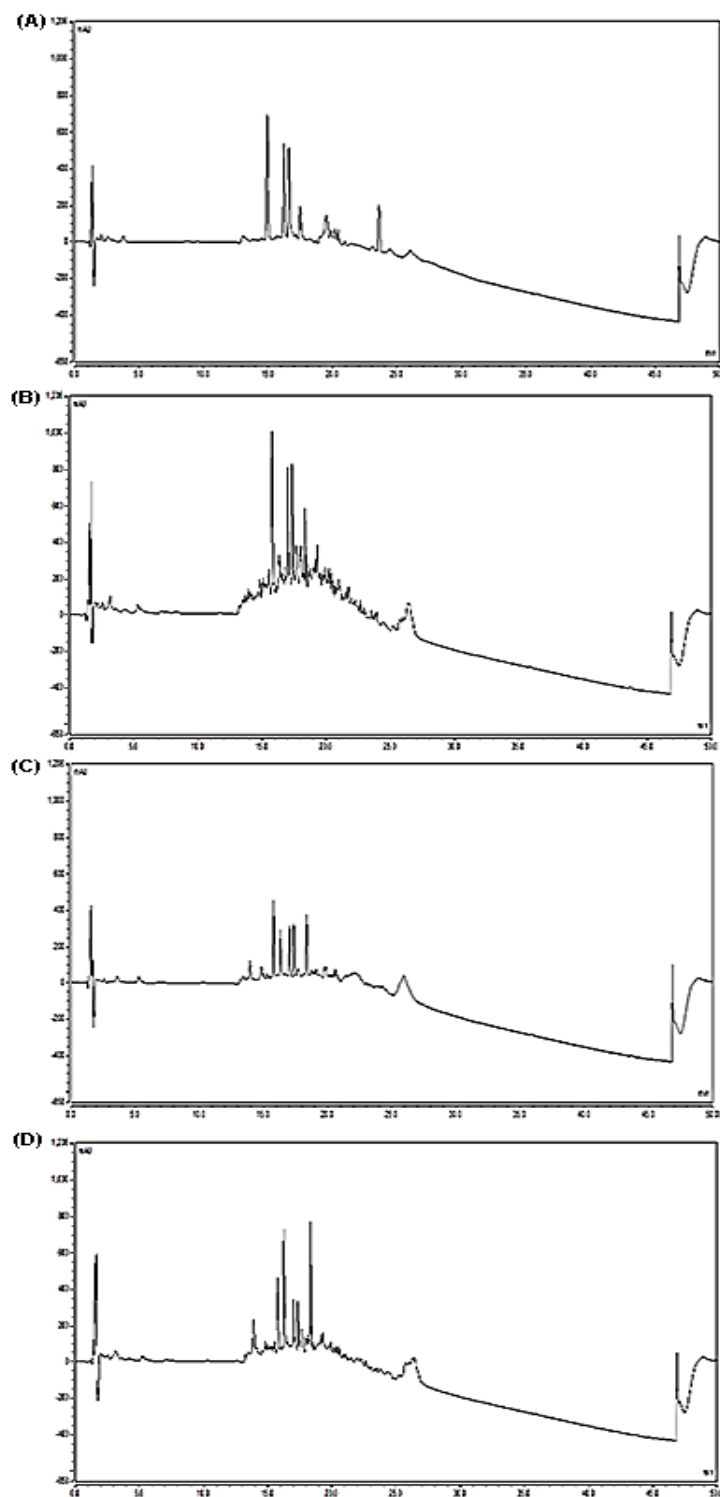
Hidroliza proteinskog izolata sa kombinacijom ova dva imobilisana preparata se pokazala kao najbolja jer je ostvareni prinos veći za 1,5 i 3 puta u odnosu na primenu imobilisane Alkalaze ili imobilisanog Flavourzyme-a, redom.

Uzimajući u obzir kompleksnost reakcije hidrolize, reakcione smeše dobijene nakon osmočasovne hidrolize katalizovane imobilisanom alkalazom i Flavourzyme-om su analizirane na HPLC-u po metodi za detekciju proteina (poglavlje 3.2.12.2.2.) (slika 4.57.).

Na osnovu hromatograma prikazanih na slici 4.57. vidi se da je u odnosu na proteinski izolat suncokretove sačme čiji je hromatogram prikazan na slici 4.57. (A) došlo do pojave novih pikova čime je potvrđeno razlaganje proteina većih molekulskih masa prisutnih u proteinskom izolatu na više proteina manjih molekulskih masa u svim analiziranim reakcionim smešama (slika 4.57. (B), (C) i (D)).

Najintenzivnija hidroliza proteinskog izolata se odigrala prilikom upotrebe samo imobilisane alkalaze na GFNS nanočestice i kombinacijom imobilisanih preparata alkalaze i Flavourzyme-a što je u skladu sa rezultatima dobijenim primenom ninhidrinske metode.

Na kraju se može zaključiti da kovalentno imobilisana alkalaza i Flavourzyme imaju šanse za primenu u reakciji hidrolize proteinskog izolata suncokretove sačme radi dobijanja enzimskog proteinskog hidrolizata visokih nutritivnih vrednosti.



Slika 4.57. Hromatogrami proteinskog izolata suncokretove sačme (A) i reakcionih smeša nakon 8 h hidrolize kada su kao katalizatori korišćeni: imobilisana alkalaza na GFNS nanočestice (B), imobilisan Flavourzyme na CCAFNS nanočestice (C) i kombinacija ova dva imobilisana preparata (D).

5. Zaključak

Na osnovu rezultata eksperimenata izvedenih u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Optimizacijom reakcije modifikacije površine neporoznih pirogenih nanočestica silike (FNS) amino-organosilanom (APTMS-om) ustanovljeno je da se pri masenom odnosu FNS:APTMS=1:1 na 25 °C tokom 48 h i u inertnoj atmosferi dobija najveća koncentracija amino grupa (4,58 $\mu\text{mol/mg}$) na površini amino-modifikovanih nanočestica silike (AFNS).
2. Optimalni uslovi za reakciju aktivacije cijanuril-hloridom (CC) amino-modifikovanih nanočestica silike (AFNS) su: maseni odnos AFNS:CC 1:5, vreme 1 h i temperatura 0 °C.
3. Optimizacijom modifikacije površine nanočestica silike epoksi-organosilanom (GOPTMS-om) dobijeno je da su optimalni uslovi reakcije modifikacije 1 h na 25 °C u inertnoj atmosferi. Variranjem koncentracije upotrebljenog epoksi-organosilana za modifikaciju nanočestica silike utvrđeno je da se najveće koncentracije imobilisane aktivnosti lipaze iz *C. rugosa* dobijaju kada se koncentracije uvedenih epoksi grupa na površinu epoksi-modifikovanih nanočestica silike (GFNS) kreću u opsegu od 440 do 520 $\mu\text{mol/g}$.
4. Najvažniji zaključak ove disertacije je da izbor tipa hemijske modifikacije nanosilike za primenu u imobilizaciji direktno zavisi od vrste enzima:
 - a. U imobilizaciji lipaza je dokazano da se najefikasnija imobilizacija odigrava formiranjem kovalentnih veza između enzima i hloridnih, odnosno epoksi grupa prisutnih na površini CCAFNS i GFNS nanočestica.
 - b. U imobilizaciji β -galaktozidaze primećen je drugačiji trend pa se imobilisani enzim najveće aktivnosti dobija formiranjem privlačnih elektrostatičkih interakcija između negativno naelektrisanih karboksilnih grupa prisutnih na površini molekula enzima i pozitivno naelektrisanih amino grupa prisutnih na površini AFNS nanočestica.
 - c. U imobilizaciji proteaza opet je primećeno da su pogodni nosači koji omogućuju formiranje kovalentnih veza sa enzimom. Imobilisana alkalaza najveće aktivnosti je dobijena formiranjem kovalentnih veza između molekula enzima i epoksi grupa GFNS nanočestica u 1 M puferu. S druge

strane, enzimima koji čine komercijalni preparat Flavourzyme najviše za vezivanje u kontekstu imobilisane aktivnosti odgovaraju CCAFNS nanočestice.

5. Odabrani preparati imobilisane lipaze su primenjeni u sintezi estara. Ustanovljeno je da vrsta primenjene modifikacije nanočestica silike utiče na afinitet imobilisane lipaze prema esterifikaciji, s obzirom da je lipaza imobilisana na GFNS derivat pokazala dva puta veću aktivnost u reakciji esterifikacije u odnosu na CCAFNS derivat. Dodatno povećanje esterifikacione aktivnosti lipaze B producenta *C. antarctica* (CAL B) u reakciji sinteze askorbil-oleata postignuto je prilikom imobilizacije na fenilamino-modifikovane nanočestice (PAPMS-FNS). Najmanju esterifikacionu aktivnost je imala lipaza imobilisana na FNS nanočestice pošto reakciji sinteze askorbil-oleata puno više odgovaraju enzimi imobilisani na hidrofobne nosače.
6. Prilikom primene imobilisane β -galaktozidaze u reakciji sinteze bioaktivnih galaktozida (galakto-oligosaharida (GOS) i galaktozida-galaktitola) konstatovano je da imobilisan enzim na AFNS nanočestice ima bolji afinitet ka sintezi galaktozida u odnosu na slobodan enzim. Takođe, imobilisan enzim na AFNS je pokazao veće procenete konverzije laktoze što je veoma bitno sa ekonomske tačke gledišta, jer se olakšava separacija proizvoda.
7. Korišćenjem imobilisane alkalaze na GFNS nanočestice i imobilisanog Flavourzyme-a na CCAFNS nanočestice u reakciji hidrolize proteinskog izolata suncokretove sačme utvrđeno je da se najintenzivnija hidroliza proteinskog izolata odigrava prilikom sukcesivne upotrebe oba ova imobilisana preparata.

6. Literatura

1. Weetall HH: Applications of immobilized enzymes: Academic Press New York; 1975.
2. Liang JF, Li YT, Yang VC. Biomedical application of immobilized enzymes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000; 89(8):979-990.
3. Guisán JM: Immobilization of Enzymes and Cells: Humana Press; 2006.
4. Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*. 2007; 35(6):1583-1587.
5. Saifuddin N, Raziah AZ, Junizah AR. Carbon Nanotubes: A Review on Structure and Their Interaction with Proteins. *Journal of Chemistry*. 2013; 2013:18.
6. DiCosimo R, McAuliffe J, Poulouse AJ, Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42(15):6437-6474.
7. Girelli AM, Mattei E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B*. 2005; 819(1):3-16.
8. Scouten WH, Luong JHT, Stephen Brown R. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends in Biotechnology*. 1995; 13(5):178-185.
9. Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*. 2015; 29(2):205-220.
10. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004; 35(2–3):126-139.
11. Demetrius L. Thermodynamics and Kinetics of Protein Folding: An Evolutionary Perspective. *Journal of Theoretical Biology*. 2002; 217(3):397-411.
12. Liese A, Hilterhaus L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42(15):6236-6249.
13. Brena BM, Batista-Viera F: Immobilization of enzymes: a literature survey. In: *Immobilization of Enzymes and Cells*. vol. 22, Third edition edn; 2013: 15-30.

14. Lau SC, Lim HN, Basri M, Fard Masoumi HR, Ahmad Tajudin A, Huang NM, Pandikumar A, Chia CH, Andou Y. Enhanced Biocatalytic Esterification with Lipase-Immobilized Chitosan/Graphene Oxide Beads. *PLOS ONE*. 2014; 9(8):e104695.
15. Tischer W, Wedekind F: Immobilized Enzymes: Methods and Applications. In: *Biocatalysis - From Discovery to Application*. Edited by Fessner W-D, Archelas A, Demirjian DC, Furstoss R, Griengl H, Jaeger KE, Morís-Varas E, Öhrlein R, Reetz MT, Reymond JL *et al.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1999: 95-126.
16. Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2011; 353(16):2885-2904.
17. Mateo C, Grazú V, Pessela BCC, Montes T, Palomo JM, Torres R, López-Gallego F, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. *Biochemical Society Transactions*. 2007; 35(6):1593-1601.
18. López-Gallego F, Betancor L, Mateo C, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora-Ortiz G, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology*. 2005; 119(1):70-75.
19. Knežević Z: Enzimologija. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet; 2007.
20. Knežević Z: Imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* na polimernim nosačima i na vlaknima od regenerisane celuloze u dijalizatoru. *Doktorska disertacija*. Tehnološko-metalurški fakultet: Univerzitet u Beogradu; 2003.
21. Klibanov AM. Enzyme stabilization by immobilization. *Analytical Biochemistry*. 1979; 93:1-25.
22. Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Fernandez-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42(15):6290-6307.
23. Yang H-H, Zhang S-Q, Chen X-L, Zhuang Z-X, Xu J-G, Wang X-R. Magnetite-Containing Spherical Silica Nanoparticles for Biocatalysis and Bioseparations. *Analytical Chemistry*. 2004; 76(5):1316-1321.

24. Kim J, Grate JW, Wang P. Nanobiocatalysis and its potential applications. Trends in biotechnology. 2008; 26(11):639-646.
25. Wang P. Nanoscale biocatalyst systems. Current Opinion in Biotechnology. 2006; 17(6):574-579.
26. de Dios AS, Díaz-García ME. Multifunctional nanoparticles: analytical prospects. Analytica chimica acta. 2010; 666(1):1-22.
27. Shi X, Gu W, Li B, Chen N, Zhao K, Xian Y. Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles. Microchimica Acta. 2014; 181(1):1-22.
28. Gokhale AA, Lu J, Lee I. Immobilization of cellulase on magneto-responsive graphene nano-supports. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013; 90:76-86.
29. Ding Y, Hu Y, Zhang L, Chen Y, Jiang X. Synthesis and Magnetic Properties of Biocompatible Hybrid Hollow Spheres. Biomacromolecules. 2006; 7(6):1766-1772.
30. Netto CGCM, Toma HE, Andrade LH. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013; 85–86:71-92.
31. Dyal A, Loos K, Noto M, Chang SW, Spagnoli C, Shafi KVPM, Ulman A, Cowman M, Gross RA. Activity of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on γ -Fe₂O₃ Magnetic Nanoparticles. Journal of the American Chemical Society. 2003; 125(7):1684-1685.
32. Iron Oxide Nanoparticles, Characteristics and Applications [<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/technology-spotlights/iron-oxide-nanoparticles-characteristics-and-applications.html>]
33. Tassa C, Shaw SY, Weissleder R. Dextran-coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy. Accounts of chemical research. 2011; 44(10):842-852.
34. Cui Y, Li Y, Yang Y, Liu X, Lei L, Zhou L, Pan F. Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and application for lipase immobilization. Journal of Biotechnology. 2010; 150(1):171-174.

35. Li Y-J, Ma M-J, Zhu J-J. Dual-Signal Amplification Strategy for Ultrasensitive Photoelectrochemical Immunosensing of α -Fetoprotein. *Analytical Chemistry*. 2012; 84(23):10492-10499.
36. Cosnier S, Gondran C, Senillou A, Grätzel M, Vlachopoulos N. Mesoporous TiO₂ films: New catalytic electrode fabricating amperometric biosensors based on oxidases. *Electroanalysis*. 1997; 9(18):1387-1392.
37. Chavhan P, Reddy V, Kim C. Nanostructured titanium oxide platform for application to ascorbic acid detection. *Int J Electron Sc*. 2012; 7(6):5420-5428.
38. Younes NRB, Amara S, Mrad I, Ben-Slama I, Jeljeli M, Omri K, El Ghoul J, El Mir L, Rhouma KB, Abdelmelek H. Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015; 22(11):8728-8737.
39. Bang SH, Jang A, Yoon J, Kim P, Kim JS, Kim Y-H, Min J. Evaluation of whole lysosomal enzymes directly immobilized on titanium (IV) oxide used in the development of antimicrobial agents. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011; 49(3):260-265.
40. Sadjadi MS, Farhadyar N, Zare K. Improvement of the alkaline protease properties via immobilization on the TiO₂ nanoparticles supported by mesoporous MCM-41. *Superlattices and Microstructures*. 2009; 46(1–2):77-83.
41. Raghava S, Singh PK, Ranga Rao A, Dutta V, Gupta MN. Nanoparticles of unmodified titanium dioxide facilitate protein refolding. *Journal of Materials Chemistry*. 2009; 19(18):2830-2834.
42. Hu Q, Wang S, Jiang P, Xu H, Zhang Y, Tang W. Synthesis of ZnO nanostructures in organic solvents and their photoluminescence properties. *Journal of Alloys and Compounds*. 2010; 496(1):494-499.
43. Zhao Z, Lei W, Zhang X, Wang B, Jiang H. ZnO-Based Amperometric Enzyme Biosensors. *Sensors*. 2010; 10(2):1216.
44. Ansari SA, Husain Q. Immobilization of *Kluyveromyces lactis* β galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles—Its future aspects in biosensor applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011; 70(3–4):119-126.

45. Guncheva M, Dimitrov M, Zhiryakova D. Novel nanostructured tin dioxide as promising carrier for *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry*. 2011; 46(11):2170-2177.
46. Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1968; 26(1):62-69.
47. Cangialosi D, Boucher VM, Alegría A, Colmenero J. Free volume holes diffusion to describe physical aging in poly(methyl methacrylate)/silica nanocomposites. *The Journal of Chemical Physics*. 2011; 135(1):014901.
48. Tan W, Wang K, He X, Zhao XJ, Drake T, Wang L, Bagwe RP. Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Medicinal Research Reviews*. 2004; 24(5):621-638.
49. Hartmann M, Kostrov X. Immobilization of enzymes on porous silicas - benefits and challenges. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42(15):6277-6289.
50. Popat A, Hartono SB, Stahr F, Liu J, Qiao SZ, Qing Lu G. Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. *Nanoscale*. 2011; 3(7):2801-2818.
51. Xiao Q-G, Tao X, Zou H-K, Chen J-F. Comparative study of solid silica nanoparticles and hollow silica nanoparticles for the immobilization of lysozyme. *Chemical Engineering Journal*. 2008; 137(1):38-44.
52. Wu Y, Chen C, Liu S. Enzyme-Functionalized Silica Nanoparticles as Sensitive Labels in Biosensing. *Analytical Chemistry*. 2009; 81(4):1600-1607.
53. Tiwari P, Vig K, Dennis V, Singh S. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*. 2011; 1(1):31.
54. Granmayeh Rad A, Abbasi H, Afzali MH. Gold Nanoparticles: Synthesising, Characterizing and Reviewing Novel Application in Recent Years. *Physics Procedia*. 2011; 22:203-208.
55. Zhang S, Wang N, Niu Y, Sun C. Immobilization of glucose oxidase on gold nanoparticles modified Au electrode for the construction of biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005; 109(2):367-374.

56. Li D, He Q, Cui Y, Duan L, Li J. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 355(2):488-493.
57. Zhang S, Wang N, Yu H, Niu Y, Sun C. Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor. *Bioelectrochemistry*. 2005; 67(1):15-22.
58. Rangnekar A, Sarma TK, Singh AK, Deka J, Ramesh A, Chattopadhyay A. Retention of Enzymatic Activity of α -Amylase in the Reductive Synthesis of Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2007; 23(10):5700-5706.
59. Mukhopadhyay K, Phadtare S, Vinod VP, Kumar A, Rao M, Chaudhari RV, Sastry M. Gold Nanoparticles Assembled on Amine-Functionalized Na-Y Zeolite: A Biocompatible Surface for Enzyme Immobilization. *Langmuir*. 2003; 19(9):3858-3863.
60. Cipolatti EP, Silva MJA, Klein M, Feddern V, Feltes MMC, Oliveira JV, Ninow JL, de Oliveira D. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014; 99:56-67.
61. Yang Y, Guo M, Yang M, Wang Z, Shen G, Yu R. Determination of pesticides in vegetable samples using an acetylcholinesterase biosensor based on nanoparticles ZrO₂/chitosan composite film. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2005; 85(3):163-175.
62. Yang Y, Yang H, Yang M, Shen G, Yu R. Amperometric glucose biosensor based on a surface treated nanoporous ZrO₂/Chitosan composite film as immobilization matrix. *Analytica Chimica Acta*. 2004; 525(2):213-220.
63. Chen YZ, Yang CT, Ching CB, Xu R. Immobilization of Lipases on Hydrophobilized Zirconia Nanoparticles: Highly Enantioselective and Reusable Biocatalysts. *Langmuir*. 2008; 24(16):8877-8884.
64. Kulakova II. Surface chemistry of nanodiamonds. *Physics of the Solid State*. 2004; 46(4):636-643.
65. Krueger A. The structure and reactivity of nanoscale diamond. *Journal of Materials Chemistry*. 2008; 18(13):1485-1492.

66. Deng D, Yu L, Pan X, Wang S, Chen X, Hu P, Sun L, Bao X. Size effect of graphene on electrocatalytic activation of oxygen. *Chemical Communications*. 2011; 47(36):10016-10018.
67. Wu L, Deng D, Jin J, Lu X, Chen J. Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012; 35(1):193-199.
68. Singh N, Srivastava G, Talat M, Raghubanshi H, Srivastava ON, Kayastha AM. Cicer α -galactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications. *Food Chemistry*. 2014; 142:430-438.
69. Muzzarelli RAA. Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. *Enzyme and Microbial Technology*. 1980; 2(3):177-184.
70. Klein MP, Nunes MR, Rodrigues RC, Benvenuto EV, Costa TMH, Hertz PF, Ninow JL. Effect of the Support Size on the Properties of β -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2012; 13(8):2456-2464.
71. Biró E, Németh ÁS, Sisak C, Feczko T, Gyenis J. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2008; 70(6):1240-1246.
72. Tang Z-X, Qian J-Q, Shi L-E. Preparation of chitosan nanoparticles as carrier for immobilized enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007; 136(1):77-96.
73. Huang X-J, Ge D, Xu Z-K. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*. 2007; 43(9):3710-3718.
74. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*. 2004; 339(16):2693-2700.
75. Quellec P, Gref R, Perrin L, Dellacherie E, Sommer F, Verbavatz JM, Alonso MJ. Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998; 42(1):45-54.

76. Meister A: *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, vol. 54: John Wiley & Sons; 2009.
77. Naushad M, Alothman ZA, Khan AB, Ali M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012; 51(4):555-560.
78. Gupta MN, Kaloti M, Kapoor M, Solanki K. Nanomaterials as Matrices for Enzyme Immobilization. *Artificial Cells, Blood Substitutes & Biotechnology*. 2011; 39(2):98-109.
79. Asuri P, Karajanagi SS, Vertegel AA, Dordick JS, Kane RS. Enhanced Stability of Enzymes Adsorbed onto Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2007; 7(4-1):1675-1678.
80. Du X, He J. Spherical silica micro/nanomaterials with hierarchical structures: Synthesis and applications. *Nanoscale*. 2011; 3(10):3984-4002.
81. Yang P, Gai S, Lin J. Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Chemical Society Reviews*. 2012; 41(9):3679-3698.
82. Rahman IA, Padavettan V. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites; A Review. *Journal of Nanomaterials*. 2012; 2012:15.
83. Ensor DS: *Aerosol Science and Technology: History and Reviews*: RTI Press; 2011.
84. Vassiliou AA, Papageorgiou GZ, Achilias DS, Bikiaris DN. Non-Isothermal Crystallisation Kinetics of In Situ Prepared Poly (ϵ -caprolactone)/Surface-Treated SiO₂ Nanocomposites. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2007; 208(4):364-376.
85. Gutsch A, Krämer M, Michael G, Mühlenweg H, Pridöhl M, Zimmermann G. Gas-Phase Production of Nanoparticles. *KONA Powder and Particle Journal*. 2002; 20:24-37.
86. Strobel R, Pratsinis SE. Flame aerosol synthesis of smart nanostructured materials. *Journal of Materials Chemistry*. 2007; 17(45):4743-4756.
87. Swihart MT. Vapor-phase synthesis of nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2003; 8(1):127-133.

88. Wu M, Windeler R, Steiner C, Börs T, Friedlander S. Controlled synthesis of nanosized particles by aerosol processes. *Aerosol Science and Technology*. 1993; 19(4):527-548.
89. Pratsinis SE. Flame aerosol synthesis of ceramic powders. *Progress in Energy and Combustion Science*. 1998; 24(3):197-219.
90. Park JT, Seo JA, Ahn SH, Kim JH, Kang SW. Surface modification of silica nanoparticles with hydrophilic polymers. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2010; 16(4):517-522.
91. Salh R: Defect Related Luminescence in Silicon Dioxide Network: A Review. In: *Crystalline Silicon - Properties and Uses*. Rijeka: InTech; 2011.
92. Kim S, Kim E, Kim S, Kim W. Surface modification of silica nanoparticles by UV-induced graft polymerization of methyl methacrylate. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005; 292(1):93-98.
93. Zou H, Wu S, Shen J. *Polymer/Silica Nanocomposites: Preparation, Characterization, Properties, and Applications*. Chemical Reviews. 2008; 108(9):3893-3957.
94. Hong RY, Feng B, Ren ZQ, Xu B, Li HZ, Zheng Y, Ding J, Wei DG. Thermodynamic, hydrodynamic, particle dynamic, and experimental analyses of silica nanoparticles synthesis in diffusion flame. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2009; 87(1):143-156.
95. Balać I: *Biomaterijali*. Beograd: Institut tehničkih nauka Srpske Akademije Nauke i Umetnosti 2010.
96. Nenadović T: *Fizika i tehnika tankih slojeva*. Beograd: Institut za nuklearne nauke "Vinča"; 1997.
97. Kim S, Jang J, Kim H, Choi H, Lee K, Choi I-H. The Effects of Silica Nanoparticles in Macrophage Cells. *Immune Network*. 2012; 12(6):296-300.
98. Cone MT, Musser JA, Figueroa E, Mason JD, Fry ES. Diffuse reflecting material for integrating cavity spectroscopy, including ring-down spectroscopy. *Appl Opt*. 2015; 54(2):334-346.
99. Mitkov M: *Metalurgija prahova*: Institut za nuklearne nauke "Vinča"; 1998.

100. Huang X, Young NP, Townley HE. Characterization and comparison of mesoporous silica particles for optimized drug delivery. *Nanomaterials and Nanotechnology*. 2014; 4:2.
101. Zu L, Cui X, Jiang Y, Hu Z, Lian H, Liu Y, Jin Y, Li Y, Wang X. Preparation and Electrochemical Characterization of Mesoporous Polyaniline-Silica Nanocomposites as an Electrode Material for Pseudocapacitors. *Materials*. 2015; 8(4):1369.
102. Griffiths PR: *Chemical Infrared Fourier Transform Spectroscopy*. New York: Wiley Interscience; 1975.
103. Feifel SC, Lisdat F. Silica nanoparticles for the layer-by-layer assembly of fully electro-active cytochrome c multilayers. *Journal of Nanobiotechnology*. 2011; 9(1):59.
104. Lundqvist M, Sethson I, Jonsson B-H. Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability. *Langmuir*. 2004; 20(24):10639-10647.
105. Yang H, Zheng K, Zhang Z, Shi W, Jing S, Wang L, Zheng W, Zhao D, Xu J, Zhang P. Adsorption and protection of plasmid DNA on mesoporous silica nanoparticles modified with various amounts of organosilane. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012; 369(1):317-322.
106. Skrastina D, Petrovskis I, Lieknina I, Bogans J, Renhofa R, Ose V, Dishlers A, Dekhtyar Y, Pumpens P. Silica Nanoparticles as the Adjuvant for the Immunisation of Mice Using Hepatitis B Core Virus-Like Particles. *PLoS ONE*. 2014; 9(12):e114006.
107. Wang L, Zhao W, Tan W. Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications. *Nano Res*. 2008; 1(2):99-115.
108. <http://www.thecarycompany.com/media/pdf/adobe/Evonik/Aerosil-380-TDS.pdf>
[<http://www.thecarycompany.com/media/pdf/adobe/Evonik/Aerosil-380-TDS.pdf>]
109. <http://corporate.evonik.com/en/company/pages/default.aspx>
[<http://corporate.evonik.com/en/company/pages/default.aspx>]
110. Palacio R, Gallego J, Gabelica Z, Batiot-Dupeyrat C, Barrault J, Valange S. Decomposition of ethanol into H₂-rich gas and carbon nanotubes over Ni, Co and

- Fe supported on SBA-15 and Aerosil. *Applied Catalysis A: General*. 2015; 504:642-653.
111. <https://www.aerosil.com/sites/lists/RE/DocumentsSI/II-2129-SIPERNAT-and-AEROSIL-in-the-Food-Industry-EN.pdf>
[<https://www.aerosil.com/sites/lists/RE/DocumentsSI/II-2129-SIPERNAT-and-AEROSIL-in-the-Food-Industry-EN.pdf>]
112. <https://www.aerosil.com/product/aerosil/en/industries/feed-food/food-additive-certification/pages/default.aspx>
[<https://www.aerosil.com/product/aerosil/en/industries/feed-food/food-additive-certification/pages/default.aspx>]
113. Bagwe RP, Hilliard LR, Tan W. Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding. *Langmuir*. 2006; 22(9):4357-4362.
114. Gradzik B., El Fray M., Wiśniewska E. Surface modification of TiO₂ and SiO₂ nanoparticles for application in polymeric nanocomposites. *CHEMIK*. 2011; 65(7):621-626.
115. Chan C-M, Wu J, Li J-X, Cheung Y-K. Polypropylene/calcium carbonate nanocomposites. *polymer*. 2002; 43(10):2981-2992.
116. Simon A, Cohen-Bouhacina T, Porté MC, Aimé JP, Baquey C. Study of Two Grafting Methods for Obtaining a 3-Aminopropyltriethoxysilane Monolayer on Silica Surface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2002; 251(2):278-283.
117. Oh C, Lee J-H, Lee Y-G, Lee Y-H, Kim J-W, Kang H-H, Oh S-G. New approach to the immobilization of glucose oxidase on non-porous silica microspheres functionalized by (3-aminopropyl)trimethoxysilane (APTMS). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006; 53(2):225-232.
118. Arslan G, Özmen M, Gündüz B, Xunli Z, Ersöz M. Surface Modification of Glass Beads with an Aminosilane Monolayer. *Turkish Journal of Chemistry*. 2006; 30(2):203-210.
119. Kim J. Investigation of the Formation and Structure of APTES Films on Silicon Substrates.

120. Pasternack RM, Rivillon Amy S, Chabal YJ. Attachment of 3-(aminopropyl) triethoxysilane on silicon oxide surfaces: dependence on solution temperature. *Langmuir*. 2008; 24(22):12963-12971.
121. Mora-Barrantes I, Valentín JL, Rodríguez A, Quijada-Garrido I, Paris R. Poly (styrene)/silica hybrid nanoparticles prepared via ATRP as high-quality fillers in elastomeric composites. *Journal of Materials Chemistry*. 2012; 22(4):1403-1410.
122. Matyjaszewski K, Davis TP: *Handbook of radical polymerization*: John Wiley & Sons; 2003.
123. Radhakrishnan B, Ranjan R, Brittain WJ. Surface initiated polymerizations from silica nanoparticles. *Soft Matter*. 2006; 2(5):386-396.
124. Ueda J, Sato S, Tsunokawa A, Yamauchi T, Tsubokawa N. Scale-up synthesis of vinyl polymer-grafted nano-sized silica by radical polymerization of vinyl monomers initiated by surface initiating groups in the solvent-free dry-system. *European polymer journal*. 2005; 41(2):193-200.
125. Gromada J, Matyjaszewski K. Simultaneous reverse and normal initiation in atom transfer radical polymerization. *Macromolecules*. 2001; 34(22):7664-7671.
126. Junior WS, Emmler T, Abetz C, Handge UA, dos Santos JF, Amancio-Filho ST, Abetz V. Friction spot welding of PMMA with PMMA/silica and PMMA/silica-g-PMMA nanocomposites functionalized via ATRP. *Polymer*. 2014; 55(20):5146-5159.
127. Jones DM, Smith JR, Huck WTS, Alexander C. Variable Adhesion of Micropatterned Thermoresponsive Polymer Brushes: AFM Investigations of Poly(N-isopropylacrylamide) Brushes Prepared by Surface-Initiated Polymerizations. *Advanced Materials*. 2002; 14(16):1130-1134.
128. Allan LE, MacDonald JP, Reckling AM, Kozak CM, Shaver MP. Controlled radical polymerization mediated by amine-bis (phenolate) iron (III) complexes. *Macromolecular rapid communications*. 2012; 33(5):414-418.
129. Granel C, Dubois P, Jérôme R, Teyssié P. Controlled radical polymerization of methacrylic monomers in the presence of a bis (ortho-chelated) arylnickel (II) complex and different activated alkyl halides. *Macromolecules*. 1996; 29(27):8576-8582.

130. Fischer H. The persistent radical effect in controlled radical polymerizations. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 1999; 37(13):1885-1901.
131. von Werne T, Patten TE. Atom transfer radical polymerization from nanoparticles: a tool for the preparation of well-defined hybrid nanostructures and for understanding the chemistry of controlled/"living" radical polymerizations from surfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 2001; 123(31):7497-7505.
132. Tu H, Heitzman CE, Braun PV. Patterned poly (N-isopropylacrylamide) brushes on silica surfaces by microcontact printing followed by surface-initiated polymerization. *Langmuir*. 2004; 20(19):8313-8320.
133. Husseman M, Malmström EE, McNamara M, Mate M, Mecerreyes D, Benoit DG, Hedrick JL, Mansky P, Huang E, Russell TP. Controlled synthesis of polymer brushes by "living" free radical polymerization techniques. *Macromolecules*. 1999; 32(5):1424-1431.
134. El Harrak A, Carrot G, Oberdisse J, Eychenne-Baron C, Boué F. Surface- atom transfer radical polymerization from silica nanoparticles with controlled colloidal stability. *Macromolecules*. 2004; 37(17):6376-6384.
135. Moad G, Rizzardo E, Thang SH. Radical addition-fragmentation chemistry in polymer synthesis. *Polymer*. 2008; 49(5):1079-1131.
136. Moad G, Chong Y, Postma A, Rizzardo E, Thang SH. Advances in RAFT polymerization: the synthesis of polymers with defined end-groups. *Polymer*. 2005; 46(19):8458-8468.
137. Peng C-H, Kong J, Seeliger F, Matyjaszewski K. Mechanism of halogen exchange in ATRP. *Macromolecules*. 2011; 44(19):7546-7557.
138. Baum M, Brittain WJ. Synthesis of Polymer Brushes on Silicate Substrates via Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Technique. *Macromolecules*. 2002; 35(3):610-615.
139. Tsujii Y, Ejaz M, Sato K, Goto A, Fukuda T. Mechanism and Kinetics of RAFT-Mediated Graft Polymerization of Styrene on a Solid Surface. 1. Experimental Evidence of Surface Radical Migration. *Macromolecules*. 2001; 34(26):8872-8878.

140. Bartholome C, Beyou E, Bourgeat-Lami E, Chaumont P, Zydowicz N. Nitroxide-mediated polymerizations from silica nanoparticle surfaces: “graft from” polymerization of styrene using a triethoxysilyl-terminated alkoxyamine initiator. *Macromolecules*. 2003; 36(21):7946-7952.
141. Blomberg S, Ostberg S, Harth E, Bosman AW, Van Horn B, Hawker CJ. Production of crosslinked, hollow nanoparticles by surface-initiated living free-radical polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2002; 40(9):1309-1320.
142. Shin Y, Lee D, Lee K, Ahn KH, Kim B. Surface properties of silica nanoparticles modified with polymers for polymer nanocomposite applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2008; 14(4):515-519.
143. Yoshinaga K, Shimada J, Nishida H, Komatsu M. Effects of Secondary Polymer Covalently Attached to Monodisperse, Poly (maleic anhydride–styrene)-Modified Colloidal Silica on Dispersibility in Organic Solvent. *Journal of colloid and interface science*. 1999; 214(2):180-188.
144. Liu Y-L, Hsu C-Y, Su Y-H, Lai J-Y. Chitosan– silica complex membranes from sulfonic acid functionalized silica nanoparticles for pervaporation dehydration of ethanol– water solutions. *Biomacromolecules*. 2005; 6(1):368-373.
145. Kang S, Hong SI, Choe CR, Park M, Rim S, Kim J. Preparation and characterization of epoxy composites filled with functionalized nanosilica particles obtained via sol–gel process. *Polymer*. 2001; 42(3):879-887.
146. Magner E. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42(15):6213-6222.
147. Gun'ko VM, Zarko VI, Voronin EF, Turov VV, Mironyuk IF, Gerashchenko II, Goncharuk EV, Pakhlov EM, Guzenko NV, Leboda R *et al*. Impact of Some Organics on Structural and Adsorptive Characteristics of Fumed Silica in Different Media. *Langmuir*. 2002; 18(3):581-596.
148. Wu X, Wu M, Zhao JX. Recent development of silica nanoparticles as delivery vectors for cancer imaging and therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014; 10(2):297-312.

149. Mathé C, Devineau S, Aude J-C, Lagniel G, Chédin S, Legros V, Mathon M-H, Renault J-P, Pin S, Boulard Y *et al.* Structural Determinants for Protein adsorption/non-adsorption to Silica Surface. PLoS ONE. 2013; 8(11):e81346.
150. Soleimani M, Khani A, Najafzadeh K. α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2012; 74(1–2):1-5.
151. Galliker P, Hommes G, Schlosser D, Corvini PFX, Shahgaldian P. Laccase-modified silica nanoparticles efficiently catalyze the transformation of phenolic compounds. Journal of Colloid and Interface Science. 2010; 349(1):98-105.
152. Hwang S, Lee K-T, Park J-W, Min B-R, Haam S, Ahn I-S, Jung J-K. Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels. Biochemical Engineering Journal. 2004; 17(2):85-90.
153. Zucca P, Sanjust E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. Molecules. 2014; 19(9):14139-14194.
154. Juntapram K, Praphairaksit N, Siraleartmukul K, Muangsin N. Synthesis and characterization of chitosan-homocysteine thiolactone as a mucoadhesive polymer. Carbohydrate Polymers. 2012; 87(4):2399-2408.
155. Rodrigues RC, Godoy CA, Volpato G, Ayub MA, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: critical role of chemical amination. Process Biochemistry. 2009; 44(9):963-968.
156. Morales-Sanfrutos J, Lopez-Jaramillo J, Ortega-Muñoz M, Megia-Fernandez A, Perez-Balderas F, Hernandez-Mateo F, Santoyo-Gonzalez F. Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization. Organic & biomolecular chemistry. 2010; 8(3):667-675.
157. Moreno J, Sinisterra J. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports. Journal of molecular catalysis. 1994; 93(3):357-369.
158. Nilsson K, Mosbach K. [3] Tresyl chloride-activated supports for enzyme immobilization. Methods in enzymology. 1987; 135:65-78.
159. Carrara CR, Rubiolo AC. Immobilization of β -Galactosidase on Chitosan. Biotechnology Progress. 1994; 10(2):220-224.

160. Bai Y-X, Li Y-F, Yang Y, Yi L-X. Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized nanoscale SiO₂ spheres. *Process Biochemistry*. 2006; 41(4):770-777.
161. Carević M: Proizvodnja i imobilizacija mikrobnih β-galaktozidaza za primenu u transgalaktozilacionim reakcijama. *Doktorska disertacija*. Tehnološko-metalurški fakultet: Univerzitet u Beogradu; 2016.
162. Bellezza F, Cipiciani A, Latterini L, Posati T, Sassi P. Structure and catalytic behavior of myoglobin adsorbed onto nanosized hydrotalcites. *Langmuir*. 2009; 25(18):10918-10924.
163. Liu X, Lei L, Li Y, Zhu H, Cui Y, Hu H. Preparation of carriers based on magnetic nanoparticles grafted polymer and immobilization for lipase. *Biochemical engineering journal*. 2011; 56(3):142-149.
164. Ponvel KM, Lee D-G, Woo E-J, Ahn I-S, Lee C-H. Immobilization of lipase on surface modified magnetic nanoparticles using alkyl benzenesulfonate. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2009; 26(1):127-130.
165. Wu Y, Wang Y, Luo G, Dai Y. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution. *Bioresource technology*. 2009; 100(14):3459-3464.
166. Cygler M, Schrag JD. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1999; 1441(2-3):205-214.
167. Domínguez de María P, Sánchez-Montero JM, Sinisterra JV, Alcántara AR. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnology Advances*. 2006; 24(2):180-196.
168. Bezbradica D: Sinteza estara katalizovana slobodnim lipazama i lipazama imobilisanim na polimernim nosačima. *Doktorska disertacija*. Tehnološko-metalurški fakultet: Beograd; 2007.
169. Benjamin S, Pandey A. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*. 1998; 14(12):1069-1087.
170. Akoh CC, Lee G-C, Shaw J-F. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids*. 2004; 39(6):513-526.

171. Moreno-Pirajàn JC, Giraldo L. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arabian Journal of Chemistry*. 2011; 4(1):55-62.
172. Kim J, Seidler P, Fill C, Wan LS. Investigations of the effect of curing conditions on the structure and stability of amino-functionalized organic films on silicon substrates by Fourier transform infrared spectroscopy, ellipsometry, and fluorescence microscopy. *Surface Science*. 2008; 602(21):3323-3330.
173. Pasternack RM, Rivillon Amy S, Chabal YJ. Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir*. 2008; 24(22):12963-12971.
174. Musi S, Filipovi -Vincekovi N, Sekovani L. Precipitation of amorphous SiO₂ particles and their properties. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2011; 28:89-94.
175. Isoda T, Maeda R, Minohoshi A, Kimura M, Iwamoto H, Kuramoto M. Development of a Silica Surface Modified with Reactive Amino Group as an Immobilized Carrier for Use as Biosensor Material. *Sensors and Materials*. 2015; 27(2):165-176.
176. Cazaban D, Wilson L, Betancor L. Lipase Immobilization on Siliceous Supports: Application to Synthetic Reactions. *Current Organic Chemistry*. 2017; 21(2):96-103.
177. Lee D-G, Ponvel KM, Kim M, Hwang S, Ahn I-S, Lee C-H. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 57(1-4):62-66.
178. Blotny G. Recent applications of 2, 4, 6-trichloro-1, 3, 5-triazine and its derivatives in organic synthesis. *Tetrahedron*. 2006; 62(41):9507-9522.
179. Zhang J-M, Zhai S-R, Zhai B, An Q-D, Tian G. Crucial factors affecting the physicochemical properties of sol-gel produced Fe₃O₄@ SiO₂-NH₂ core-shell nanomaterials. *Journal of sol-gel science and technology*. 2012; 64(2):347-357.
180. Li Y, Gao F, Wei W, Qu J-B, Ma G-H, Zhou W-Q. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010; 66(1):182-189.

181. González MG, Cabanelas JC, Baselga J: Applications of FTIR on epoxy resins-identification, monitoring the curing process, phase separation and water uptake. In: *Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology*. InTech; 2012.
182. Barczak M. Mesoporous silica functionalized with phenylamino and gluconamide groups: synthesis, characterization and use for sorption of diclofenac. 2016. 2016; 70(2).
183. Wu J, Cai H, Xu K, Fu Z, Liu X, Chen M. A facile route to carboxylated carbon nanofibers and their functionalization by robust octasilsesquioxanes via conjugated linkage. *Journal of Materials Chemistry C*. 2013; 1(4):646-656.
184. Tseng R-L, Wu F-C, Juang R-S. Characteristics and applications of the Lagergren's first-order equation for adsorption kinetics. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2010; 41(6):661-669.
185. S. L. Gilani GDN, A. Moghadamnia and A. H. Kamaruddin. Kinetics and isotherm studies of the immobilized lipase on chitosan support. *International Journal of Engineering Transactions A: Basics*. 2016; 29(10):1319-1331.
186. Cui JD, Li LL, Zhao YM. Simple Technique for Preparing Stable and Recyclable Cross-Linked Enzyme Aggregates with Crude-Pored Microspherical Silica Core. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2014; 53(42):16176-16182.
187. Park S, Kim SH, Won K, Choi JW, Kim YH, Kim HJ, Yang Y-H, Lee SH. Wood mimetic hydrogel beads for enzyme immobilization. *Carbohydrate Polymers*. 2015; 115:223-229.
188. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 2013; 3(1):1-9.
189. Al-Duri B, Yong YP. Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. *Biochemical Engineering Journal*. 2000; 4(3):207-215.
190. Moreno JM, Sinisterra JV. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports. *Journal of Molecular Catalysis*. 1994; 93(3):357-369.
191. Chen B, Miller EM, Miller L, Maikner JJ, Gross RA. Effects of Macroporous Resin Size on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Fraction of Active

- Molecules, and Catalytic Activity for Polyester Synthesis. *Langmuir*. 2007; 23(3):1381-1387.
192. Minovska V, Winkelhausen E, Kuzmanova S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2005; 70(4):609-624.
193. Prlainović NŽ, Knežević-Jugović ZD, Mijin DŽ, Bezbradica DI. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads®: the effect of lipase oxidation by periodates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2011; 34(7):803-810.
194. Palocci C, Chronopoulou L, Venditti I, Cernia E, Diociaiuti M, Fratoddi I, Russo MV. Lipolytic enzymes with improved activity and selectivity upon adsorption on polymeric nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2007; 8(10):3047-3053.
195. Gao S, Wang Y, Wang T, Luo G, Dai Y. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. *Bioresource technology*. 2009; 100(2):996-999.
196. Liu J-F, Liu H, Tan B, Chen Y-H, Yang R-J. Reversible immobilization of *K. fragilis* β -galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2012; 82:64-70.
197. Liu H, Liu J, Tan B, Zhou F, Qin Y, Yang R. Covalent immobilization of *Kluyveromyces fragilis* β -galactosidase on magnetic nanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2012; 35(8):1287-1295.
198. Neerupma N, Rajvinder S, Jagdeep K. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology*; Vol 9, No 5 (2006). 2006.
199. Fernandez-Lafuente R, Armisén P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente G, M. Guisán J. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1998; 93(1-2):185-197.
200. Sheldon RA. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2007; 349(8-9):1289-1307.

201. Zaborsky OR: Immobilization of Enzymes by Adsorption. In: *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins: Volume 1*. Edited by Chang TMS. Boston, MA: Springer US; 1977: 37-46.
202. Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*. 1992; 3(4):263-281.
203. Arvidsson P, Plieva FM, Lozinsky VI, Galaev IY, Mattiasson B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *Journal of Chromatography A*. 2003; 986(2):275-290.
204. Heath HB: *Source Book of Flavors*. New Yourk: Van Nostrand Reinhold; 1981.
205. Singh P, Saxena DK, Naik S. Synthesis of food flavors by enzymatic esterification process. *International Journal of Science and Research*. 2014; 3(9):2113-2116.
206. Ćorović M: Sinteza liposolubilnih askorbil-estara karboksilnih kiselina katalizovana imobilisanim lipazama. *Doktorska disertacija*. Tehnološko-metalurški fakultet: Univerzitet u Beogradu; 2016.
207. Rodrigues DS, Cavalcante GP, Ferreira AL, Gonçalves LR. Immobilization of *Candida antarctica* lipase type B by adsorption on activated carbon. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2008; 22(1):125-133.
208. Stojanović M, Veličković D, scaron, an, Dimitrijević A, Milosavić N, Knežević-Jugović Z, Bezbradica D. Lipase-Catalyzed Synthesis of Ascorbyl Oleate in Acetone: Optimization of Reaction Conditions and Lipase Reusability. *Journal of Oleo Science*. 2013; 62(8):591-603.
209. Shin H-J, Park J-M, Yang J-W. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process Biochemistry*. 1998; 33(8):787-792.
210. Albayrak N, Yang S-T. Immobilization of β -Galactosidase on Fibrous Matrix by Polyethyleneimine for Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose. *Biotechnology Progress*. 2002; 18(2):240-251.
211. Jovanovic-Malinovska R, Fernandes P, Winkelhausen E, Fonseca L. Galacto-oligosaccharides Synthesis from Lactose and Whey by β -Galactosidase Immobilized in PVA. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012; 168(5):1197-1211.

212. Carević M, Čorović M, Mihailović M, Banjanac K, Milisavljević A, Veličković D, Bezbradica D. Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. *International Dairy Journal*. 2016; 54:50-57.
213. Klein MP, Hackenhaar CR, Lorenzoni ASG, Rodrigues RC, Costa TMH, Ninow JL, Hertz PF. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*. 2016; 137:184-190.
214. Torres DPM, Gonçalves MdPF, Teixeira JA, Rodrigues LR. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010; 9(5):438-454.
215. Leusen Ev, Torringa E, Groenink P, Kortleve P, Geene R, Schoterman M, Klarenbeek B: Industrial Applications of Galactooligosaccharides. In: *Food Oligosaccharides*. John Wiley & Sons, Ltd; 2014: 470-491.
216. Pan C, Hu B, Li W, Sun Y, Ye H, Zeng X. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 61(3-4):208-215.
217. Gaur R, Pant H, Jain R, Khare SK. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*. 2006; 97(3):426-430.
218. Zhou QZK, Chen XD. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*. 2001; 9(1):33-40.
219. Irazoqui G, Giacomini C, Batista-Viera F, Brena BM, Cardelle-Cobas A, Corzo N, Jimeno ML. Characterization of Galactosyl Derivatives Obtained by Transgalactosylation of Lactose and Different Polyols Using Immobilized β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(23):11302-11307.
220. Klein MP, Fallavena LP, Schöffner JdN, Ayub MAZ, Rodrigues RC, Ninow JL, Hertz PF. High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis

- and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*. 2013; 95(1):465-470.
221. Wei W, Qi D, Zhao H-z, Lu Z-x, Lv F, Bie X. Synthesis and characterisation of galactosyl glycerol by β -galactosidase catalysed reverse hydrolysis of galactose and glycerol. *Food chemistry*. 2013; 141(3):3085-3092.
222. Liu Y, Zeng Z, Zeng G, Tang L, Pang Y, Li Z, Liu C, Lei X, Wu M, Ren P *et al.* Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds. *Bioresour Technol*. 2012; 115:21-26.
223. Qiao Y, Huang Y, Feng F, Chen Z-G. Efficient enzymatic synthesis and antibacterial activity of andrographolide glycoside. *Process Biochemistry*. 2016; 51(5):675-680.
224. Khan M, Husain Q, Naqvi AH. Graphene based magnetic nanocomposites as versatile carriers for high yield immobilization and stabilization of [small beta]-galactosidase. *RSC Adv*. 2016; 6(58):53493-53503.
225. Guidini CZ, Fischer J, Santana LNS, Cardoso VL, Ribeiro EJ. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochem Eng J*. 2010; 52(2):137-143.
226. Grimsley GR, Scholtz JM, Pace CN. A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Sci*. 2009; 18(1):247-251.
227. Pace CN, Grimsley GR, Scholtz JM. Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. *J Biol Chem*. 2009; 284(20):13285-13289.
228. Li H, Robertson AD, Jensen JH. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Struct, Funct, Bioinf*. 2005; 61(4):704-721.
229. Lindman S, Bauer MC, Lund M, Diehl C, Mulder FAA, Akke M, Linse S. pKa Values for the Unfolded State under Native Conditions Explain the pH-Dependent Stability of PGB1. *Biophys J*. 2010; 99(10):3365-3373.
230. Chen S-C, Duan K-J. Production of Galactooligosaccharides Using β -Galactosidase Immobilized on Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles with Tris(hydroxymethyl)phosphine as an Optional Coupling Agent. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(6):12499-12512.

231. Huerta LM, Vera C, Guerrero C, Wilson L, Illanes A. Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*. 2011; 46(1):245-252.
232. Zhou Y, Chu J, Zhang J, Liu K, He B. Precisely regulated galactosylation of nucleoside analogues in aqueous hydrophilic solvents catalyzed by solvent-stable [small beta]-galactosidase. *RSC Advances*. 2016; 6(69):64841-64846.
233. Gosling A, Stevens GW, Barber AR, Kentish SE, Gras SL. Effect of the Substrate Concentration and Water Activity on the Yield and Rate of the Transfer Reaction of β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59(7):3366-3372.
234. Carević M, Veličković D, Stojanović M, Milosavić N, Rogniaux H, Ropartz D, Bezbradica D. Insight in the regioselective enzymatic transgalactosylation of salicin catalyzed by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*. 2015; 50(5):782-788.
235. Zeuner B, Nyffenegger C, Mikkelsen JD, Meyer AS. Thermostable β -galactosidases for the synthesis of human milk oligosaccharides. *New biotechnology*. 2016; 33(3):355-360.
236. Aires-Trapote A, Tamayo A, Rubio J, Rumbero A, Hernáiz MJ. Sustainable synthesis of N-acetyllactosamine using an immobilized β -galactosidase on a tailor made porous polymer. *RSC Advances*. 2015; 5(50):40375-40383.
237. González-Delgado I, López-Muñoz M-J, Morales G, Segura Y. Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *International Dairy Journal*. 2016; 61:211-219.
238. Neri DFM, Balcão VM, Costa RS, Rocha ICAP, Ferreira EMFC, Torres DPM, Rodrigues LRM, Carvalho Jr LB, Teixeira JA. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*. 2009; 115(1):92-99.

239. Ansari SA, Husain Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. *Food and Bioproducts Processing*. 2012; 90(2):351-359.
240. Klewicki R. Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with β -galactosidase. *Food Chemistry*. 2007; 100(3):1196-1201.
241. Klewicki R, Belina I, Wojciechowska A, Klewicka E, Sójka M. Synthesis of Galactosyl Mannitol Derivative Using β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2017; 67(1):33.
242. Lukić N: Enzimaska sinteza galaktozida dulcitolu *Diplomski rad*. Tehnološko-metalurški fakultet: Univerzitet u Beogradu; 2016.
243. Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL. Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*. 2013; 587(8):1155-1163.
244. Grbavčić S: Proizvodnja mikrobnih lipaza i proteaza kao aditiva u formulacijama detergenata *Doktorska disertacija*. Tehnološko-metalurški fakultet: Univerzitet u Beogradu; 2015.
245. Sumantha A, Larroche C, Pandey A. Budući razvoj mikrobiologije i industrijske biotehnologije proteaza u prehrambenoj industriji. *Food Technology and Biotechnology*. 2006; 44(2):211-220.
246. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002; 13(4):345-351.
247. Ma HT, Poon RY. How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *Biochemical Journal*. 2011; 435(1):17-31.
248. Watanabe Y, Adachi S, Nakanishi K, Matsuno R. Lipase-catalyzed synthesis of unsaturated acyl l-ascorbates and their ability to suppress the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2001; 78(8):823-826.
249. Villanueva A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A, Pedroche J, Bautista J, Millán F. Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1999; 76(12):1455-1460.
250. Coríci LN, Frissen AE, van Zoelen D-J, Eggen IF, Peter F, Davidescu CM, Boeriu CG. Sol-gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for

- application in the synthesis of C-terminal peptide amides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011; 73(1–4):90-97.
251. Hoa NT, Huong TTX, Minh NP, Dao DT. Investigation of Enzymatic Optimization by Flavourzyme and Celluclast for Soy Protein Hydrolysate Powder.
252. Yust MdM, Pedroche J, Alaiz M, Girón-Calle J, Vioque J, Mateo C, Guisán JM, Millán F, Fernandez-Lafuente R. Partial Purification and Immobilization/Stabilization on Highly Activated Glyoxyl-agarose Supports of Different Proteases from Flavourzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(16):6503-6508.
253. Chae HJ, In M-J, Kim EY. Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1998; 73(2):195-204.
254. Hansupalak N, Kitsongsermthon P, Jiraratananon R: Immobilized Flavourzyme on Chitosan Beads for Seasoning Sauce Production: Covalent Binding vs Entrapment. In: *Contemporary Science of Polymeric Materials*. vol. 1061: American Chemical Society; 2010: 53-62.
255. Ferreira L, Ramos MA, Dordick JS, Gil MH. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2003; 21(4–6):189-199.
256. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/126741?lang=en®ion=SX>
[<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/126741?lang=en®ion=SX>]
257. Tardioli PW, Pedroche J, Giordano RLC, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. *Biotechnology Progress*. 2003; 19(2):352-360.
258. Merz M, Eisele T, Berends P, Appel D, Rabe S, Blank I, Stressler T, Fischer L. Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63(23):5682-5693.

259. Blinkovsky AM, Byun T, Brown KM, Golightly EJ, Klotz AV. A non-specific aminopeptidase from *Aspergillus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000; 1480(1–2):171-181.
260. Matsushita-Morita M, Tada S, Suzuki S, Hattori R, Marui J, Furukawa I, Yamagata Y, Amano H, Ishida H, Takeuchi M *et al.* Overexpression and Characterization of an Extracellular Leucine Aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Current Microbiology*. 2011; 62(2):557-564.
261. Nakadai T, Nasuno S, Iguchi N. Purification and Properties of Neutral Proteinase I from *Aspergillus oryzae* Purification and Properties of Neutral Proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1973; 37(12):2695-2708.
262. Beringer H. Murphy, D. J. (ed.): *Designer Oil Crops - Breeding, Processing and Biotechnology*, VCH Weinheim-New York, 1994. 317 pages, 29 figures, 9 tables. Price DM 184.-, £ 75.-. ISBN 3-527-30040-6. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 1994; 157(5):397-398.
263. Villanueva A, Clemente A, Bautista J, Millán F. Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo-and exo-proteases. *Grasas y aceites*. 1999; 50(6):472-476.
264. Waller GR, Feather MS: *The Maillard reaction in foods and nutrition*: ACS Publications; 1983.
265. Sosulski F, Fleming S. Chemical, functional, and nutritional properties of sunflower protein products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1977; 54(2):A100-A104.
266. Rahma E, Rao MN. Isolation and characterization of the major protein fraction of sunflower seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1981; 29(3):518-521.
267. Saeed M, Cheryan M. Sunflower protein concentrates and isolates' low in polyphenols and phytate. *Journal of Food Science*. 1988; 53(4):1127-1131.
268. Pickardt C, Neidhart S, Griesbach C, Dube M, Knauf U, Kammerer DR, Carle R. Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal. *Food Hydrocolloids*. 2009; 23(7):1966-1973.

269. Parrado J, Millan F, Hernandez-Pinzon I, Bautista J, Machado A. Characterization of enzymic sunflower protein hydrolyzates. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1993; 41(11):1821-1825.
270. San Juan L, Villamide M. Nutritional evaluation of sunflower products for poultry as affected by the oil extraction process. *Poultry science*. 2001; 80(4):431-437.
271. Appleton J. Arginine: clinical potential of a semi-essential amino acid.(Arginine). *Alternative Medicine Review*. 2002; 7(6):512-523.
272. Ivanova P, Chalova V, Koleva L, Pishtiyski I. Amino acid composition and solubility of proteins isolated from sunflower meal produced in Bulgaria. *International Food Research Journal*. 2013; 20(6):2995-3000.
273. Pešić M: Biotehnološka obrada proteinskog izolata suncokretove sačme i sporednih proizvoda separacije. *Diplomski rad*. Tehnološko-metalurški fakultet: Univerzitet u Beogradu; 2016.

Biografija

Katarina Banjanac, master inženjer tehnologije, rođena je 10.12.1984. godine u Valjevu, gde je završila osnovnu školu Milovan Glišić i Valjevsku gimnaziju. Osnovne studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2008/2009. godine. Diplomirala je na TMF-u na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i botehnologiju školske 2011/2012. godine sa ocenom na diplomskom radu 10 (deset) i prosečnom ocenom u toku studija 9,12. Master studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju je upisala školske 2012/2013. godine., koje je završila sa prosečnom ocenom 9,88 i odbranila master rad sa ocenom 10 (deset) 13.07.2013. godine. Doktorske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju pod mentorstvom dr Dejana Bezbradice upisala je školske 2013. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom poslediplomskih studija Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 10,00 uključujući i završni ispit. Katarina Banjanac izabrana je u zvanje istraživač saradnik u junu 2015. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu. Od 1.03.2017. godine Katarina Banjanac je kao istraživač saradnik zaposlena na projektu "Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti" ev. br. III 46010, koji finansira Ministarstvo nauke, prosvete i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Koautor je devet radova u časopisima međunarodnog značaja (šest M21, po jedan M22, M23 i M24), dva rada u časopisima nacionalnog značaja (po jedan M51 i M52) i sedam saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima (dva M33, četiri M34 i jedan M63).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а КАТАРИНА БАЏАНАЦ
број индекса 403812013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИМОБИЛИЗАЦИЈА ЕНЗИМА НАНОЧЕСТИЦЕ SrO_2
МОДИФИКОВАНЕ ОРГАНОСИЛАЦИМА

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

Потпис докторанда

У Београду, 18.08.2014.

Баџанац Катарина

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора КАТАРИНА БАЊАНАЦ

Број индекса 4038/2013

Студијски програм БИОХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЈА

Наслов рада ИМОБИЛИЗАЦИЈА ЕНЗИМА НА НАЈОЧЕСТИЦЕ SiO_2
МОДИФИКОВАНЕ ОРГАНОСИЛАНИМА

Ментор ПРОФ. ДРАЖИЋ БЕЗБРАДИЋА И ДОЦЕНТ АЛЕКСАНДАР
МАРИНКОВИЋ

Потписани/а КАТАРИНА БАЊАНАЦ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 18.08.2017.

Бањанца Катарица

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ИМОБИЛИЗАЦИЈА ЕНЗИМА НА НАНОЧЕСТИЉЕ
ЗНОД МОДИФИКОВАНЕ ОРГАНОСИЛАНИРА

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 18.08.2017

Бенјамин Костић

