

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Мирјана Н. Радовановић

**ИМОБИЛИЗАЦИЈА АЛФА-АМИЛАЗЕ НА
ПОИАНИЛИНУ И МАГНЕТНИМ
ЧЕСТИЦАМА МОДИФИКОВАНИМ
ПОИАНИЛИНОМ**

докторска дисертација

Београд, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Mirjana N. Radovanović

**IMMOBILIZATION OF ALFA-AMYLASE ON
POLYANILINE AND MAGNETIC PARTICLES
MODIFIED BY POLYANILINE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Ментор:

Др Зорица Кнежевић- Југовић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Чланови комисије:

Др Милица Гвозденовић, ванредни професор,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Дејан Безбрадица, ванредни професор,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Мирјана Антов, редовни професор,
Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет

Датум одбране: _____

Докторска дисертација „Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“ урађена је на Агрономском факултету у Чачку, Универзитета у Крагујевцу и на Технолошко-металуришком факултету, Универзитета у Београду. Велики број особа, свако на свој начин, допринео је овој докторској дисертацији.

Захваљујем ментору проф. др Зорици Кнежевић-Југовић на указаном поверењу, подршци у осамостаљивању, идеји докторске дисертације и на корекцијама које су допринеле квалитету објављених радова и тезе. Др Милицы Гвозденовић захваљујем на практичним саветима, литератури и корисним сугестијама. Захваљујем др Бранимиру Југовићу на залагању и подршци, као и проф. др Енис Џунузовићу на практичној помоћи. Колегиницама и колегама са катедре за Биохемијско инжењерство и биотехнологију захвална сам на пријатној сарадњи, посебно др Наташи Шекуљици на издвојеном времену и несебичној помоћи у експерименталном раду.

Квалитет ове докторске дисертације значајно је побољшан захваљујући проф. др Бранимиру Гргуру, др Милану Николићу, др Бојану Јокићу и др Миодрагу Митрићу и њиховој помоћи у синтези и карактеризацији честица носача. Хвала др Душану Мијину, др Данијели Брковић и Ђурђи Бркић на сарадњи и практичној помоћи.

Захвална сам колегама са Агрономског факултета, посебно са катедре за Прехрамбену технологију на разумевању и помоћи у реализовању текућих обавеза. Др Љиљани Гајић-Крстајић хвала на охрабривању и искреној вери у мој успех. Хвала колегиници Весни Ђуровић на несебичној помоћи у експерименталном раду и сталној подршци; колеги Душану Марковићу на помоћи у коришћењу софтверских програма и др Далибору Томићу на подстицају у писању и објављивању радова. Захваљујем проф. др Мирославу Спасојевићу на идеји и раду на електрохемијској редукцији моносахарида, као и др Томиславу Тришовићу на практичним решењима електрохемијских реактора. Драгим студентима хвала што су непресушна инспирација мом личном развоју и усавршавању; посебно Бранимиру Рачићу на помоћи у експерименталном раду и доприносу у почетној фази ове дисертације.

Бескрајну захвалност дугујем Фериди Недељковић на исцрпној литератури и практичним примерима из скробарске индустрије.

Највећу захвалност дугујем својој породици и проф. др Ленки Рибих-Зеленовић, јер су ми враћали вољу изнова и давали смисао сваком мом раду. Најтоплије се захваљујем супругу, деци и мами на љубави, неизмерном разумевању, пожртвованости и стрпљењу. Захваљујем се сестри и њеној породици што су увек били уз мене. Породицама Радовановић и Мијатовић хвала на подршци и разумевању. Посебно желим да се захвалим проф. др Ленки Рибих-Зеленовић, јер је веровала у мене и мотивисала ме да истрајем. Поред тога, захвална сам јој на професионално и несебично пружаном знању.

Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином

РЕЗИМЕ

Циљ ове дисертације био је имобилизација α -амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином методом адсорпције ради добијања вишефункционалног биокатализаторског система погодног за виšekратну хидролизу скроба. Истраживања у оквиру ове тезе могу се поделити у три дела.

У првом делу рада извршена је синтеза и карактеризација честица носача и карактеризација α -амилазе из *Bacillus licheniformis* ензимског препарата TermamyL. Магнетне честице (MAG) синтетисане су копреципитацијом FeCl_3 и FeSO_4 у базној средини, а затим обложене полианилинском превлаком (MAG-PANI). Честице полианилина (PANI) синтетисане су хемијски на граници фаза двофазног система вода/хлороформ. Испитане су морфолошке особине, магнетна својства, IR спектри, расподела величине честица и зета потенцијала MAG и MAG-PANI. Показано је да су синтетисани агломерати наночестица MAG и MAG-PANI. Површина магнетних честица униформно је пресвучена полианилином влакнасте структуре. Честице MAG карактерише бимодална, а MAG-PANI тримодална расподела величина честица.

У другом делу рада извршена је имобилизација ензима α -амилазе на честицама MAG, MAG-PANI и PANI. Одређени су оптимални услови имобилизације на MAG-PANI: време, почетна концентрација ензима, рН и температура. Испитивањем кинетичких параметара K_m и V_m утврђено је да имобилисана α -амилаза на MAG-PANI показује већи афинитет према супстрату него имобилисана α -амилаза на MAG, а нижи афинитет од слободне α -амилазе. Утврђен је Ленгмиров (Langmuir) модел адсорпције α -амилазе на честицама MAG-PANI.

У трећем делу рада испитана је стабилност имобилисане α -амилазе, могућност употребе кроз више циклуса као и оперативна стабилност у проточном биореактору са континуалним и повратним током. Утврђена је рН стабилизација α -амилазе имобилизацијом на MAG честицама и померање температурног оптимума

имобилизацијом на MAG-PANI. Имобилисана α -амилаза на MAG-PANI задржала је око 55,5% почетне активности након 9 циклуса коришћења и око 80,3% почетне активности након 50 дана чувања. Време полу-живота биокатализатора при континуалним условима рада било је 6,2 h.

Кључне речи: α -амилаза, имобилизација, магнетне честице, полианилин

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Биохемијско инжењерство и биотехнологија

УДК број:

Immobilization of alpha-amylase on polyaniline and magnetic particles modified by polyaniline

ABSTRACT

The aim of this dissertation is to examine immobilization α -amylase on polyaniline and magnetic particles coated with polyaniline via adsorption in order to obtain a more stable biocatalyst system, with the possibility of repeated use with easy separation from the reaction medium. This thesis can be divided into three parts.

In the first part, the synthesis and characterization of the carrier particles was carried out. Magnetic particles (MAG) were synthesized by co-precipitation of FeCl_3 and FeSO_4 in the base medium. Magnetic particles are coated with a polyaniline (MAG-PANI). Polyaniline particles (PANI) are synthesized chemically at the interface of the water/chloroform system. Morphological, magnetic properties, IR spectrums, particle size distribution and zeta potential of the buffer suspension of the carrier particles were examined. It has been shown that the agglomerates of MAG and MAG-PANI nanoparticles are synthesized. The surface of the magnetic particles is coated uniformly with polyaniline fibrous structure. MAG particles are present in bimodal, and MAG-PANI is a trimodal particle size distribution.

In the second part of the work, immobilization of the α -amylase enzymes onto MAG, MAG-PANI and PANI was carried out. The optimal immobilization conditions at MAG-PANI were determined: time, initial concentration of enzymes, pH and temperature. Certain kinetic parameters: K_m and V_m immobilized α -amylases show a higher affinity for immobilized α -amylase on MAG-PANI compared to α -amylase immobilized on MAG and lower both of immobilisates than free α -amylase. Langmuir adsorption model of α -amylase was determined for particles MAG-PANI.

In the third part of the dissertation, pH, temperature and operational stability of α -amylase immobilized on MAG-PANI particles in recycle packed bed reactor and continuous packed bed reactor without recycling has been studied. Immobilized enzyme particles MAG-PANI retained about 55.5% of initial activity after 9 successive use cycles and about 80.3% of

initial activity after 50 days. In a bioreactor with a packed bed MAG-PANI-A can be used over several cycles with the increase in the time required for the hydrolysis of the same amount of starch. The half-life of the biocatalyst under continuous working conditions was 6.2 h.

Key words: α -amylase, immobilization, magnetic particles, polyaniline

Scientific field: Engineering technology

Scientific subfield: Biochemical Engineering and Biotechnology

UDC number:

САДРЖАЈ:

1. УВОД	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО	4
2.1. Амилазе	5
2.1.1. Скроб као амилолитички супстрат	6
2.1.2. Скробно-јодни комплекс	9
2.1.3. Алфа-амилазе	10
2.1.3.1. Механизам деловања алфа-амилаза	12
2.1.3.2. Алфа-амилазе изоловане из <i>Bacillus licheniformis</i>	14
2.1.4. Примена алфа-амилаза	15
2.2. Имобилизација ензима	16
2.2.1. Адсорпција ензима на чврстим носачима	17
2.2.2. Магнетне честице као носачи за имобилизацију ензима	19
2.2.3. Полианилин као носач за имобилизацију ензима	21
2.2.3.1. Хемијска синтеза полианилина	23
2.2.3.2. Електрохемијска синтеза полианилина	25
2.2.4. Полианилинска превлака на магнетним честицама	26
2.2.5. Имобилизација алфа-амилаза на магнетним честицама и полианилину	28
2.2.6. Утицај ултразвучних таласа на активност ензима	31
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	33
3.1. Материјали	34
3.2. Методе	36
3.2.1. Методе синтезе носача	36
3.2.1.1. Хемијска синтеза полианилина и издвајање фракција полианилинских честица	36
3.2.1.2. Електрохемијска синтеза полианилина	36
3.2.1.3. Хемијска синтеза магнетних честица и магнетних честица пресвучених полианилином	37
3.2.2. Методе карактеризације носача	38

3.2.2.1. Магнетна својства MAG и MAG-PANI	38
3.2.2.2. Скенирајућа електронска микроскопија	38
3.2.2.3. Инфрацрвена спекторскопија са Фуријеовим трансформацијама	38
3.2.2.4. Расподела величине честица и зета потенцијала	39
3.2.3. Методе карактеризације ензимског препарата Termamyl	39
3.2.3.1. UV спектар ензимског препарата Termamyl	39
3.2.3.2. IR спектар ензимског препарата Termamyl	39
3.2.3.3. Расподела величине молекула и зета потенцијала α -амилазе у ензимском препарату Termamyl	40
3.2.4. Имобилизације алфа-амилазе	40
3.2.5. Одређивање активности алфа-амилазе	41
3.2.6. Методе одређивања садржаја протеина	44
3.2.6.1. Одређивање протеина методом по Лорију (Lowry)	44
3.2.6.2. Одређивање протеина мерењем карактеристичних апсорбанција у UV области	46
3.2.7. Методе оптимизације услова имобилизације α -амилазе на MAG-PANI	46
3.2.7.1. Испитивање оптималног времена имобилизације	47
3.2.7.2. Испитивање оптималне почетне концентрације алфа-амилазе	47
3.2.7.3. Испитивање оптималне pH	47
3.2.7.4. Испитивање оптималне температуре	48
3.2.7.5. Испитивање утицаја CaCl_2 на имобилизацију α -амилазе	48
3.2.8. Стабилност имобилисане алфа-амилазе	49
3.2.8.1. Десорпција α -амилазе под дејством NaCl и Triton X100	49
3.2.8.2. Испитивање pH стабилности имобилисане алфа-амилазе	49
3.2.8.3. Испитивање термичке стабилности имобилисане алфа-амилазе	49
3.2.8.4. Испитивање утицаја ултразвука на активност слободне и имобилисане алфа-амилазе	50
3.2.8.5. Испитивање оперативне стабилности имобилисане алфа-амилазе	50
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	53
4.1. Синтеза и карактеризација честица носача	54

4.1.1. Синтеза полианилина на граници двофазног система	54
4.1.2. Морфологија MAG и MAG-PANI	56
4.1.3. Магнетна својства MAG и MAG-PANI	58
4.1.4. Анализа MAG и MAG-PANI инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовим трансформацијама	61
4.1.5. Расподела величине честица и зета потенцијал MAG и MAG-PANI	63
4.2. Карактеризација ензимског препарата α -амилазе Termamyl	65
4.2.1. UV спектар ензимског препарата α -амилазе Termamyl	65
4.2.2. FTIR спектар ензимског препарата α -амилазе Termamyl	67
4.2.3. Расподела величине честица и зета потенцијал α -амилазе из ензимског препарата Termamyl	68
4.3. Иммобилизација алфа-амилазе	70
4.3.1. Утицај времена имобилизације на активност имобилисане α -амилазе	71
4.3.2. Утицај почетне концентрације на масени принос α -амилазе и релативну активност имобилизата	72
4.3.3. Утицај pH на масу адсорбованог ензима	73
4.3.4. Утицај температуре на масу имобилисане α -амилазе	74
4.3.5. Параметри Ленгмирове (Langmuir) и Фројндлихове (Freundlich) адсорпционе изотерме	75
4.3.6. Утицај CaCl ₂ на имобилизацију α -амилазе	76
4.3.7. Кинетички параметри слободне и имобилисане α -амилазе	77
4.3.8. Природа интеракција α -амилаза-носач	81
4.3.8.1. Утицај NaCl и Triton X100 на десорпцију α -амилазе	83
4.4. Стабилност имобилисане α -амилазе	83
4.4.1. pH стабилност слободне и имобилисане α -амилазе	83
4.4.2. Термичка стабилност слободне и имобилисане α -амилазе	85
4.4.3. Утицај ултразвучних таласа на слободну и имобилисану α -амилазу	86
4.4.4. Могућност вишекратне употребе биокатализатора и стабилност током чувања	88
4.4.5. Оперативна стабилност имобилисане α -амилазе	90

4.4.5.1. Утицај величине честица на оперативну активност MAG-PANI-A	90
4.4.5.2. Утицај величине честица на активност PANI	94
5. ЗАКЉУЧЦИ	97
6. ЛИТЕРАТУРА	100
Биографија аутора	113
Изјава о ауторству	114
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије	115
Изјава о коришћењу	116

1. УВОД

У савременој технологији скробних хидролизата, разградња скроба катализована киселинама је делимично или потпуно замењена ензимским поступцима. Биокатализа се најчешће одвија у умереним условима, при нижим температурама и атмосферском притиску за разлику од неорганске катализе. На овај начин смањени су трошкови енергије и онемогућено је стварање споредних производа који се редовно јављају под драстичним реакционим условима. Специфичност ензима доприноси добијању чистијих производа, а тиме и већем приносу реакција. Хидролизу скроба катализују амилолитички ензими, а α -амилаза је кључна у фазама утечњавања супстрата.

Брз развој ензимских технологија поред многих предности у односу на класичне хемијске катализе, донео је и нове изазове као што су здравствени ризик од алергеног деловања ензима, питања економичности, могућности виšekратне употребе и контаминације производа. Један од начина превазилажења ограничавајућих фактора за имплементацију ензима јесте њихова имобилизација на чврстим носачима. Развој имобилисаних биокатализаторских система омогућава да се ензими могу издвојити из реакционог медијума и користити у више реакционих циклуса. Имобилизација алфа-амилазе интензивно се испитује тек последњих деценија, због ниже цене и веће приступачности у слободном стању у односу на остале ензиме.

Везивање ензима на честицама носача магнетних својстава омогућава лаку сепарацију биокатализатора из реакционог медијума, а у условима вискозних раствора и смањење дифузионих лимитација дејством спољашњег магнетног поља. Последњих деценија велику пажњу истраживача привлачи имобилизација ензима на магнетним честицама са полимерном превлаком. Полимерна превлака ствара повољну микрооколину за дејство ензима, стабилизује честице носача и штити од спољашњих оштећења. Полианилин је, због једноставности синтезе, флексибилности, отпорности и проводљивости нашао широку примену у биотехнологији.

Основни циљ ове дисертације био је испитивање имобилизације α -амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином методом адсорпције ради добијања вишефункционалног биокатализаторског система погодног за виšekратну хидролизу скроба. Ковалентно везивање ензима на честицама носача углавном утиче на смањење активности услед чврстих веза које смањују фину покретљивост ензима, некада кључну у катализи. Због тога је циљ био испитати имобилизацију α -амилазе једноставним

поступком адсорпције. И поред многих недостатака, као што су неспецифичност и десорпција ензима, адсорпција се може унапредити правилним избором и модификацијом површине носача. Посебна пажња посвећена је разумевању успостављених интеракција између α -амилазе и честица носача.

Побољшања рН, температурне као и оперативне стабилности имобилисане α -амилазе на магнетним честицама пресвученим полианилином омогућила би потенцијалну примену α -амилазе у индустријским условима где промена појединих параметара драстично смањује активност или доводи до потпуне инактивације нативног ензима. Развој биокатализаторског система са наведеним побољшаним својствима заједно са могућношћу лаке сепарације из реакционог медијума допринела би вишефункционалности имобилисане α -амилазе.

2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1. Амилазе

Амилазе су ензими који катализују хидролизу скроба и сличних угљенохидратних макромолекула дајући различите производе: декстрине и прогресивно мање полимере изграђене из глукозних јединица [1]. Припадају великој подгрупи хидролаза гликозидазама и првој под-подгрупи карбохидразама (Е.С.3.2.1) [2]. Важна улога скроба и гликогена у снабдевању организама енергијом условила је широку распрострањеност амилаза у живом свету. Хидролиза скроба катализована амилазама есенцијална је током клијања семена, али се одиграва и у другим биљним органима, ослобађајући нискомолекуларна једињења која снабдевају биљку енергијом. Амилазе су код животиња присутне у дигестивним соковима, у јетри, мишићима, белим крвним зрнцима, урину итд. [3]. Микроорганизми најчешће синтетишу екстрацелуларне амилазе, јер се биодеградација скроба као нерастворног у води одвија изван ћелије, док поједини сојеви микроорганизама, из још непознатих разлога, продукују интрацелуларне амилазе [4].

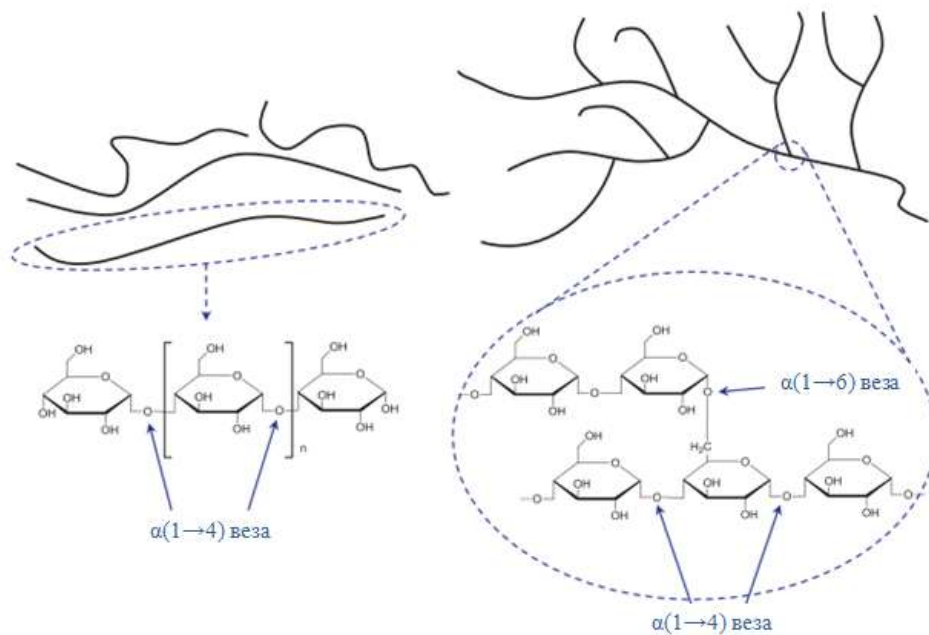
Ферментација угљенохидратних сировина користи се успешно хиљадама година, а детаљна испитивања узрочника ових процеса започета су тек крајем 18. и у првој половини 19. века. Кирхофовим (Kirchhoff) радовима показано је да скроб може прећи у шећер под дејством киселине, али и дејством екстракта слада [5]. Пајен (Payen) и Персу (Persoz) су 1833. године изоловали биоактивну супстанцу која хидролизује скроб, из воденог раствора таложењем у присуству алкохола [5,6]. Добијен ензим назван је дијастаза, назив који се и данас понекад користи за амилазе [6].

Амилолитички ензими класификовани су на више начина. Првобитна подела извршена је према облику аномерних шећера насталих хидролитичким деловањем ензима слада на α - и β -амилазе [7]. Разјашњавањем механизма деловања појединих амилаза извршена је подела на: ендоамилазе, које делују насумично унутар макромолекула супстрата, и егзоамилазе, које делују постепено са нередукујућег краја макромолекула, док су према значају у технологији скроба подељене на α -амилазе, β -амилазе и глукоамилазе [8].

Најчешћи супстрат који амилазе разграђују јесте скроб. Познавање физичких и хемијских особина скроба су основ разумевања механизма деловања амилаза.

2.1.1. Скроб као амилолитички супстрат

Скроб се у биљним ћелијама налази у виду скробних гранула чији облик и димензије зависе од ботаничког порекла. Грађа и особине скробних гранула су изванредно прилагођене природној функцији складиштења енергије, јер су грануле карактеристично густо паковане, нерастворљиве у води, а истовремено приступачне катаболичким ензимима биљке. Пречник скробних гранула (1 μm до 100 μm) и облик (овалан, сферни, полигоналан, лентикуларан, издужен и пасуљаст) карактеристични су за сваку биљну врсту [9]. Скроб је хомополисахарид изграђен из великог броја глукозних јединица са врло сложеном тродимензионалном структуром. У линеарној фракцији скроба амилози, молекули глукозе међусобно су повезани α -1,4 -гликозидним везама (Слика 2.1.А) [10].

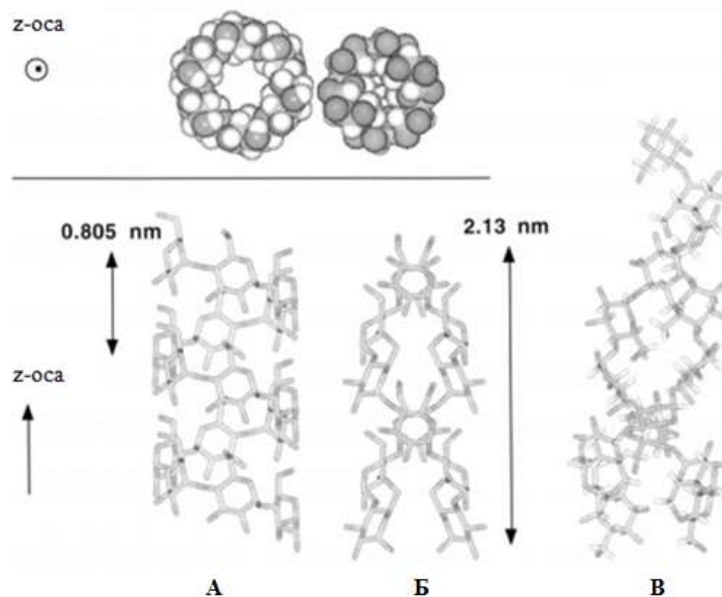


Слика 2.1. Структурна формула: амилозе (лево), амилопектина (десно) [10]

Молекулска маса издвојене амилозе креће се од $1 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^6$, а типични хидродинамички радијус овог макромолекула је у опсегу од 7 до 22 nm [11]. Већина скрובהа садржи од 20 до 25% амилозе. Амилопектин, разграната фракција скроба (Слика 2.1.Б) садржи до два милиона моносахаридних јединица и представља један од највећих

природних полимера са молекулском масом око 10^8 . Хидродинамички радијус амилопектина креће се од 21 до 75 nm [12]. У молекулу амилопектина поред α -1,4 присутне су и α -1,6-гликозидне везе на местима рачвања на сваких 20-25 глукозних јединица. Разграђени амилопектин помоћу изоамилазе испитан гел-филтрационом хроматографијом показао је бимодалну расподелу величине макромолекула са пиковима за степене полимеризације (degree polimerization- DP) 12-14 и ~ 45 [12]. Краће ланчане фракције многих амилопектина су 18-20 DP [13,14]. Амилопектин може имати и дуже ланце, довољно неискриване да се везују са јодом [15,16].

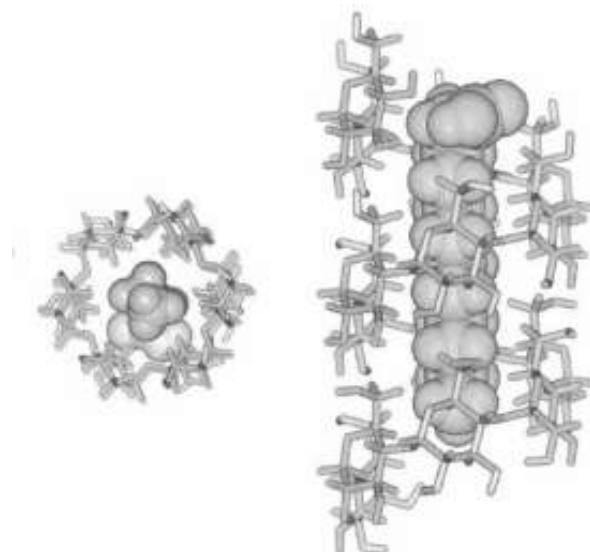
У свеже припремљеном воденом раствору амилоза се јавља у виду савијених флексибилних увојака. Неуједначени увојци састоје се од линеарних сегмената спиралне структуре (Слика 2.2 А).



Слика 2.2. Хеликоидна структура компоненти скроба: А) једнострука спирала (корак 0,805 nm; Б) двоструки хеликс (корак 2,13 nm) и В) двоструки хеликс између два кратка ланца амилопектина. Пресек хеликоидне структуре указује на присуство шупљине унутар једноструког хеликса, за разлику од двоструког (горе) [13]

Спирални сегменти изграђени су од 2 до 20 спиралних корака, при чему сваки корак садржи 6 до 8 глукозних јединица. Између глукозних јединица суседних корака успостављају се водоничне везе, а растојање између суседних спиралних корака износи приближно 0,8 nm. Растојање од 0,26 до 0,28 nm између атома кисеоника примарне хидроксилне групе (са 6. С атома) и кисеоника из ОН групе са 2. и 3. С атома глукозних јединица суседних корака је идентично са растојањима водоничних мостова [8]. Оваква структура није стабилна и тежи формирању појединачних хеликоидних комплекса са одговарајућим комплексирајућим агенсима, у чијем одсуству амилозне фракције теже међусобно да се удружују у двоструки хеликс (Слика 2.2.Б). Стварање једноструког и двоструког хеликса амилозе резултује нижим енергетским стањем и термодинамички је фаворизовано [17].

У једноструким хеликоидним комплексима линеарни део молекула скроба својом хидрофобном страном окренутом ка шупљини хеликса интерагује са неполарним комплексирајућим агенсима (Слика 2.3). Са комплексирајућим агенсом који је лако доступан у воденом раствору, једноструким хеликоидни комплекс формира се тренутно. У одсуству комплексирајућег агенса, формирање двоструког хеликса захтева поравнање два молекула линеарних ланаца и због тога је временски зависан процес.



Слика 2.3. Модел комплекса амилоза-масна киселина: укључење алифатичног дела масне киселине у хидрофобну шупљину једноструког хеликса амилозе [13]

Сличан начин везивања присутан је и у скробно-јодном комплексу. Јод у виду полијодата I_5^- се понаша као комплексирајући агенс и улази у хидрофобну шупљину хеликса амилозе. Кинетичка проучавања показала су да формирање дуплог хеликса зависи од димензија молекула амилозе, њене концентрације и температуре. Потребно је да степен полимеризације буде минимум 10 како би се формирао дупли хеликс из чистих раствора олигосахарида [18]. Сматра се да су индивидуални ланци амилозе у скробној гранули радијално оријентисани и насумично распоређени међу радијалним ланцима амилопектина [19].

2.1.2. Скробно-јодни комплекс

Скроб са јодом тренутно формира комплекс тамно плаве боје [20] који је основ великог броја аналитичких метода. Иако откривена још почетком 19. века скробно-јодна реакција је због своје сложености и данас често фокус многих истраживања. Усавршавање поступака фракционисања скроба допринело је разумевању улога амилозе и амилопектина у скробно-јодној реакцији. Карактеристична тамно плава боја скробно-јодног комплекса последица је везивања амилозе са јодом, док амилопектинска фракција скроба даје са јодом љубичасто обојење. Прва фаза скробно-јодне реакције је апсорпција и за њу је углавном одговорна амилоза. Друга фаза представља адсорпциони процес који је описан Фројндлиховом (Freundlich) адсорпционом изотермом и у овој фази учествују обе фракције скроба (Слика 2.4.) [21].



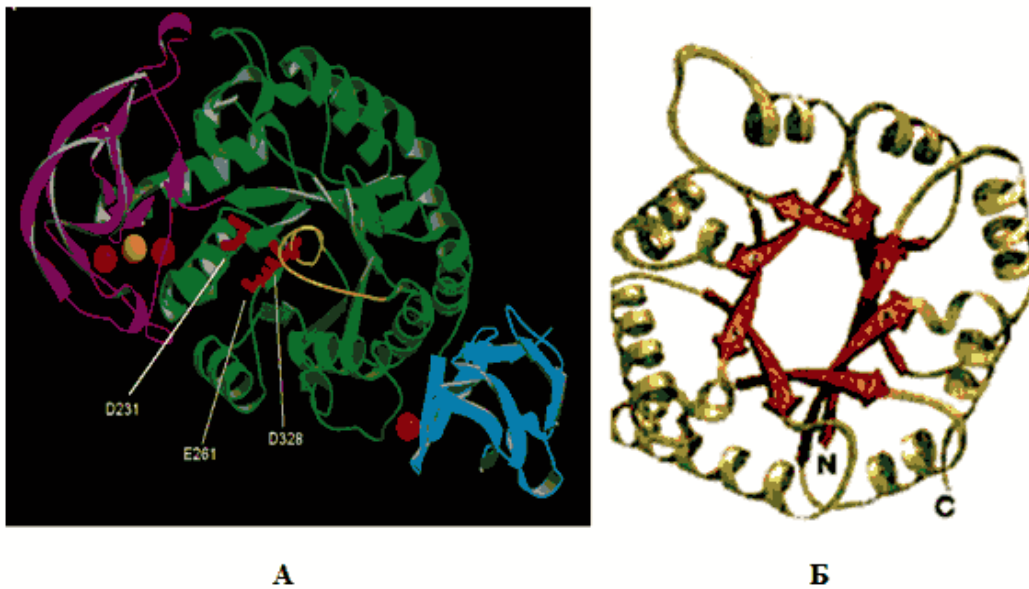
Слика 2.4. Сорпциона изотерма скробно-јодног комплекса [21]

Скробно-јодна реакција је због своје осетљивости нашла широку примену у аналитици. Напредовање хидролизе скроба прати се смањењем интензитета обојености овог комплекса. Развијене су различите методе, а најчешће се у супстрат (скроб) додаје раствор ензима док се реакција прекида додатком раствора HCl . Након прекидања ензимске реакције додаје се јодни реагенс, а у зависности од методе мерења, апсорбације формираног скробно-јодног комплекса мере се у опсегу таласних дужина од 580 до 700 nm. Најстарија примена скробно-јодног комплекса је у квалитативном доказивању скроба или јода. Скроб је индикатор у јодиметријским титрацијама, при чему је подесније користити чисту амилозу јер је прелаз боје много оштрији.

2.1.3. Алфа-амилазе

Алфа-амилазе носе ензимску ознаку EC 3.2.1.1 и назив 1,4- α -D-глюкан-глюканохидролазе. Комисија за ензиме (EC) извршила је значајну и често навођену поделу ензима према реакцији коју катализују. Ова класична подела ензима је временом превазиђена захваљујући радовима 90-их година 20. века када се уводи нови вид класификације чији је основ секвенцијална сличност аминокиселинских остатака ензима [22]. Према наведеној класификацији α -амилазе припадају породици GH - гликозил хидролазама и доступна је у бази података Carbohydrate-Active enZymes, CAZy [23]. CAZy класификује α -амилазе у неколико фамилија: GH13 (која заједно са фамилијама GH70 и GH77, формира GH-H), GH57, GH119 и евентуално у GH126 (у којој α -амилазна активност није у потпуности потврђена). Фамилија GH13 поред амилаза садржи и друге бројне ензиме који имају активност хидролаза, трансгликозидаза и изомераза [24]. За све ензиме из ове групе заједничко је: 1) деловање на α -гликозидне везе и хидролиза супстрата до α -аномера моно- и олигосахарида (хидролиза), формирање 1-4- или 1-6- гликозидних веза (трансгликолиза) или комбинација обе активности, 2) поседовање карактеристичне $(\beta/\alpha)_8$ или TIM буре структуре и 3) постојање четири секвенционе регије у примарној структури које садрже аминокиселине за формирање активног центра као и аминокиселине неопходне за стабилност $(\beta/\alpha)_8$ структуре [25]. Све α -амилазе имају исту каталитичку функцију, иако постоје значајне разлике у секвенци аминокиселина α -амилаза различитог

порекла. Секвенцијална сличност α -амилаза бактерија, гљива, биљака и животиња мања је од 10%. Само четири секвенционе регије полипептидног ланца очуване су у свим α -амилазама [26]. Алфа-амилазу чини једноставан полипептидни ланац савијен у три домена: А, В и С (Слика 2.5.А).



Слика 2.5. А. Структура α -амилазе из *Bacillus licheniformis*: А домен (зелено), В домен (љубичасто), С домен (плаво) [27] В. $(\beta/\alpha)_8$ структура А домена

А домен садржи N-крај полипептидног низа. Налази се у виду тзв. $(\beta/\alpha)_8$ структуре (Слика 2.5 Б) која се састоји се од централно постављених осам паралелних β набраних равни (црвене стрелице) окружених са осам α -хеликса (зелене спирале). Активни центар чине остаци две аспарагинске и једне глутаминске аминокиселине.

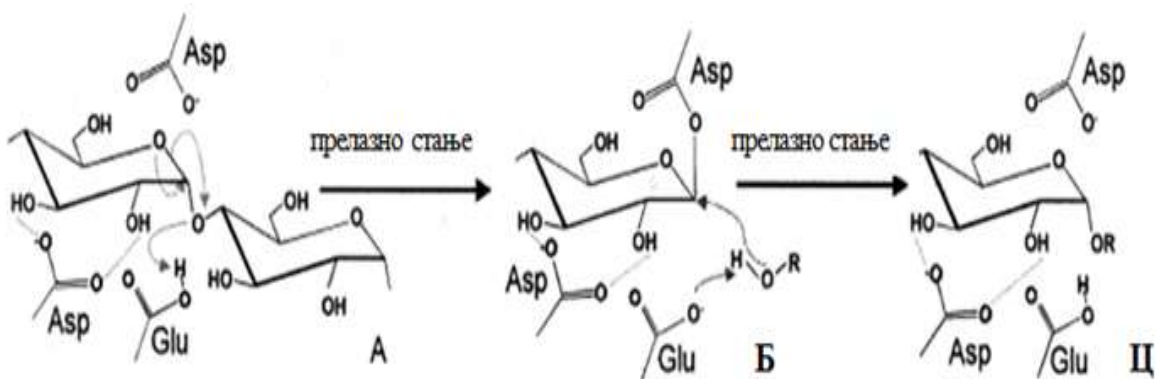
В домен се налази између треће β -набране равни и трећег α -хеликса домена А. Има прилично неправилну структуру богату β -набраним равнима. Овај домен веома варира у дужини (од 44 до 133 аминокиселинска ланца) и редоследу аминокиселина у зависности од порекла и врсте ензима. Домен В формира велики део шупљине за везивање супстрата што узрокује разлике у специфичности према супстрату између појединих α -амилаза [24]. Домен С налази се на супротној страни од домена В у односу на $(\beta/\alpha)_8$ структуру. Садржи C-терминални део секвенце и има структуру са мотивом грчког кључа [28].

Уз неке изузетке, све α -амилазе садрже Ca^{2+} јон смештен на граници између домена А и домена В. У зависности од порекла ензима варира и број Ca^{2+} јона од један до десет. Одређен број Ca^{2+} јона може да се уклони дијализом или додавањем агенаса који везују метале, као што је етилендиаминтетрасирћетна киселина (EDTA) при чему ензим постаје мање активан и стабилан. Враћањем Ca^{2+} јона под одређеним условима, ензим обнавља активност. Претпоставља се да је улога Ca^{2+} јона у одржавању структуре ензима, јер је доста удаљен од активног центра да би учествовао директно у катализи [29]. Међутим, произведена је и α -амилаза независна од Ca^{2+} јона, а показано је да заменом Ca^{2+} јона Na^+ јонима протеин задржава своју активност [30]. Без обзира на разлике у идентитетима, неке од кључних аминокиселина, њихово позиционирање и везивање лиганата унутара Ca^{2+} везујућег места, су готово идентичне у свим α -амилазама, што указује да је улога Ca^{2+} јона слична у животињским, бактеријским и гљивичним α -амилазама [30].

2.1.3.1. Механизам деловања алфа-амилаза

Алфа-амилазе су специфичне према α , 1-4 гликозидним везама. Делују насумично унутар молекула супстрата, а као продукте дају декстрине, олигосахариде и глукозу α -конфигурације. Алфа-амилазе карактерише брже деловање од β -амилаза јер могу деловати било где унутар макромолекула уз могућност да заобиђу места гранања. Деловање на амилозну фракцију скроба у почетку се одвија брзо уз настајање декстрина и олигосахарида са 6-7 глукозних јединица. Долази до брзог пада вискозитета раствора скроба и интензитета обојења са јодом. То је последица хаотичног деловања ензима при чему ензим одједном отцепљује шест остатака глукозе, јер својим активним групама обухвата цео један завој у спирали супстрата. Дужим деловањем, настали декстрини и олигосахариди разграђују се до малтозе и глукозе. У овој фази долази до јачег редукционог деловања. Хидролизом амилопектина, прво настају декстрини, због чега се α -амилаза назива и декстриногена амилаза. Уколико делују довољно дуго, α -амилазе могу разложити 80 до 90% амилопектина. Пошто α -амилаза не раскида α , 1-6 гликозидне везе, као крајњи продукти деловања на скроб настају и веће количине α , 1-6 везаних шећера, посебно изомалтозе [2, 3].

Алфа-гликозидна веза је веома стабилна при чему је брзина спонтане хидролизе на собној температури око $2 \cdot 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ [31]. Хидролиза α -гликозидне везе описана је SN2 механизмом дупле измене при чему настаје α -аномерни C атом на редукујућем крају продукта [32]. У каталитичком центру присутни су остаци једне глутаминске и две аспарагинске киселине. Глутаминска киселина има улогу кисело/базног катализатора, а аспарагинска је нуклеофил (Слика 2.6).



Слика 2.6. SN2 механизам деловања α -амилаза [33]

Само један остатак аспарагинске киселине учествује у механизму хидролизе, док се други веже за OH2 и OH3 групе супстрата водоничним везама и тиме утиче на деформацију супстрата. На основу теорије SN2 механизма претпоставља се да карбоксилна база иницира раскидање везе нуклеофилним нападом на C1 атом глюкопиранозне јединице која хидролизује. Истовремено, гликозидни кисеоник се замењује и протонује карбоксилном групом. Нападнута карбоксилна група формира β -везан ацетал-естар, дајући интермедијер глюкопиранозил-ензим. Ова високоенергетска веза постепено хидролизује водом. Реакција са водом олакшана је карбоксилном групом друге аспарагинске киселине активног центра. Карбоксилна група издваја протон из воде, чинећи воду нуклеофилнијом за напад на β -везан ацетал-естар. Аномерни угљеников атом глюкозне јединице ослобођене из ензимског комплекса има α -конфигурацију задржавајући конфигурацију продукта на редукујућем крају [33].

2.1.3.2. Алфа-амилазе изоловане из *Bacillus licheniformis*

Молекулска маса алфа-амилазе из *Bacillus licheniformis* (BLA) износи 55,2 kDa (483 аминокиселинска остатка) [34]. Као и све α -амилазе поседује карактеристичну $(\beta/\alpha)_8$ структуру домена А. Домен А чини 291 остатак аминокиселина (од 3. до 103. и од 207. до 396. аминокиселинског остатка). Домен В чини секвенца од 104. до 206. аминокиселинског остатка. У домену С су остаци од 379. до 482. аминокиселине скупљени у осам антипаралелних β -равни у облику грчког кључа [34]. BLA реагује са молекулима скроба преко више везујућих места на површини молекула ензима: His105, Asp231, His235, Glu261, His289 и Asp328. Ова места, за која се претпоставља да имају важну улогу у адсорпцији и хидролизи скроба, поред тога што садрже три остатка аминокиселина каталитичког центра: Asp231, Glu261 и Asp328, садрже и два остатка аминокиселина за везивање супстрата: His105 и His235 [35]. BLA садржи Ca-Na-Ca трочлани мост између домена А и домена В (Слика 2.5.А, Ca^{2+} јон црвене, а Na^+ јон наранџаста сфера). Претпоставља се да трочлани мост јона метала има важну улогу у одржавању структуре домена В и у укупној конформацији шупљине активног центра, али нема улогу у термостабилности [33].

Термичка стабилност BLA је неочекивана, с обзиром да *Bacillus licheniformis* припада мезофилним бактеријама често изолованим из земљишта умереног климата. Активност на високим температурама је разлог интензивне примене у индустрији скроба. Предмет је честих истраживања протеинским инжењерингом ради побољшања индустријски фаворизованих особина и испитивања молекуларних основа ензимске термостабилности у академским лабораторијама широм света. Посебно је интересантно што је BLA термички стабилнија од себи знатно хомологих амилаза у погледу примарне и терцијарне структуре: α -амилазе из *Bacillus amyloliquefaciens* (БАА) и α -амилаза из *Bacillus stearothermophilus* (BStA) [34].

2.1.4. Примена алфа-амилаза

У савременим индустријама скроба, амилолитички ензими су потиснули употребу класичних киселинских катализатора. Процес хидролизе скроба хлороводоничном киселином захтева високе температуре и притисак, као и скупу опрему отпорну на дејство киселина. Део настале глукозе под наведеним условима се разлаже и подлеже реверзији, а хидролизат је обојен и потребно га је додатно пречишћавати. Насупрот томе, хидролиза скроба амилазама омогућава добијање веће количине хидролизата у чистијем стању. Прва фаза хидролизе скробне суспензије-ликвификација (утечњавање) одвија се помоћу α -амилаза које разграђују макромолекул насумично на једињења мање молекулске масе. Даљу разградњу настављају глукоамилазе током фазе назване сахарификација (ошећерење) где се скроб може разградити до основне градивне јединице - глукозе [25].

Алфа-амилазе се као додаток брашну користе у пекарству јер хидролизујући скроб ослобађају брзо велику количину шећера лако доступног квасцима. На овај начин тесто се припрема брже, скраћује се време печења и добија хлеб веће запремине, са бојом коре пожељном за потрошаче, бољим укусом, мирисом и продуженим роком трајања [25, 36]. Пекарска индустрија прва је почела са додавањем ензима у своје производе још 1970. године, са сталним порастом њихове употребе последњих 30 година.

Сахарификација скроба у савременим индустријама пива врши се помоћу амилаза уместо слада, чинећи поступак много економичнијим. Процес производње пива се убрзава, а коначни производ је стабилнији и бистрији. Алфа-амилазе се такође употребљавају у производњи јаких алкохолних пића и сокова [37].

Поред прехрамбене, α -амилазе се примењују и у другим индустријским гранама. Алкалне амилазе су заједно са протеазама, целулазама, липазама и мананазама саставни део формула за детергенте [38]. У савременој текстилној производњи додаје се скроб за јачање влакана током ткања. По завршетку ткања скроб се излаже дејству амилаза, разграђује се и раствара у води, а влакна текстила остају непромењена [39]. Како у текстилној тако и у папирној индустрији скроб се додаје као агенс за заштиту од механичких напрезања током обраде. Алфа-амилаза има улогу делимичне хидролизе скроба чинећи га мање вискозним, а тиме и погоднијим за наношење на папир [40]. Развојем нових технологија фармацеутске индустрије амилазе се користе за добијање

оптички чистих лекова и агрохемикалија [41]. Алфа-амилазе су активна компонента у различитим лековима за дигестивне болести [42]. Последњих деценија развојем нових аналитичких метода испитивања α -амилазе су нашле примену у медицинској и клиничкој хемији [43]. У области заштите животне средине, α -амилазе се користе за третман скроба у отпадним водама [44] и добијање биоетанола [45].

Стални развој ензимских технологија и замена хемијских процеса ензимским довела је до експанзије употребе ензима последњих четрдесет година у различитим индустријским гранама. Паралелно са тим повремено су спровођена и истраживања о алергеном дејству ензима, међу којима и α -амилазе. Показано је да изложеност финим честицама ензима у брашненим формулама за припрему теста и аеросолима узрокује алергије и респираторне сметње код пекара [46]. Алергене реакције се јављају и на амилазе у детергентима. Протеинским инжењерингом производе се нови ензими са измењеним секвенцама аминокиселина због добијања ензима индустријски фаворизованих особина. Овакви ензими су данас врло заступљени и потенцијални су алергени, уз отежану детекцију због измењених секвенци аминокиселина.

2.2. Имобилизација ензима

Примена ензима у слободном стању ограничена је за индустрију, због високе цене и немогућности поновне употребе. Изналажење решења за издвајање ензима из реакционог медијума, за вишекратну употребу, повећање стабилности на повишеним температурама и у средини са измењеном рН, довели су до развоја имобилисаних биокатализаторских система. Од 80-их година прошлог века почињу интензивна истраживања о имобилисаним ензимским системима. Иако се истражује више од 100 година, имобилизација ензима је и данас техника пробе и грешке јер су многа питања још увек неразјашњена [47].

Имобилизација ензима у најширем смислу подразумева свако ограничавање слободе кретања молекула ензима у простору. Развијен је велики број поступака за имобилизацију ензима, али не постоји њихова јединствена подела. Генерално начини имобилизације могу се категорисати према типу интеракција које се успостављају између

ензима и носача: адсорпцијом, ковалентним везивањем, обухватањем ензима носачем, укључивањем ензима у једну од фаза двофазног система и микроинкапсулацијом ензима [48].

Поред многих предности имобилизација ензима има и недостатака, па у неким случајевима није економски и технолошки оправдана. Током имобилизације долази до промене активности ензима због: претрпљеног хемијског третмана, утицаја површине носача, ефеката расподеле супстрата и осталих компоненти у систему (инхибитора, активатора, водоникових јона), стерних сметњи и конформационих промена и промена конформационе флексибилности ензима [2]. Имајући то у виду може се разумети све већа тежња за унапређењем једноставнијих поступака имобилизације као што је адсорпција.

2.2.1. Адсорпција ензима на чврстим носачима

При пасивној физичкој адсорпцији ензими се могу везати за носач интермолекулским поларним, хидрофобним интеракцијама и јонским везама које су нестабилне у поређењу са ковалентним везама [49]. Релативни допринос врсте међумолекулске интеракције при адсорпцији зависи од хемијске природе носача и ензимских група, као и од услова одвијања адсорпције. Ове силе углавном нису оријентисане и релативно су неспецифичне, тако да је један од основних недостатака ове методе што се тешко може стандардизовати и користити за добијање биокатализатора са јасно дефинисаним својствима. Поред тога молекули ензима могу се лако десорбовати, услед присуства јонских супстанци или протеина у раствору. Предности ове методе су приступачност и ниска цена адсорбенса, једноставност поступка без употребе скувих и токсичних хемикалија, једноставна регенерација носача и у већини случајева очување ензимске специфичности и активности. Адсорпција се може унапредити и тиме учинити специфичнијом правилним избором и модификацијом носача и оптимизацијом услова одвијања. Површине носача могу да се третирају супстанцама које садрже велики број функционалних група способних да реагују са групама у молекулу ензима [2]. На овај начин, на површини носача се ствара „мека“ подлога са великим бројем функционалних група и обезбеђује повољна микрооколина за ензим што омогућава јаче везивање.

Адсорпција је сложен динамичан процес и може се посматрати кроз неколико фаза: 1) транспорт до површине, 2) адсорпција, 3) структурна реорганизација временски

зависна, 4) десорпција или измена и 5) транспорт са површине. У зависности од система, брзину адсорпције углавном контролише први или други ступањ [50].

Носачи имају често хетерогене површине, што уз саму комплексност протеина, отежава предвиђање начина интеракције протеина са површином носача. Главни фактор који утиче на адсорпцију протеина је површинска енергија [51]. Групе на површини протеина углавном реагују са површином носача, иако унутрашње групе могу бити такође доступне кроз конформационе промене. Максимална количина адсорбованог протеина често се постиже при изоелектричној тачки протеина вероватно услед минималних интермолекулских и бочних одбијања адсорбованих молекула протеина [50, 52].

Утицај површинског наелектрисања на адсорпцију ензима није увек лако предвидети, јер и протеини који носе исто наелектрисање као и носач и даље могу да се адсорбују на локално супротно наелектрисаним местима. Понекад наелектрисане честице могу да се адсорбују на хидрофилне површине са истим наелектрисањем чак иако је реакција везивања ендотермна [50]. Покретачка сила у оваквим случајевима је пораст ентропије услед конформационих промена протеина који резултује губитком секундарне структуре. Ово се базира на гледишту да је адсорпција електростатички контролисана на хидрофилним површинама за конформационо стабилне протеине и кратке пептиде.

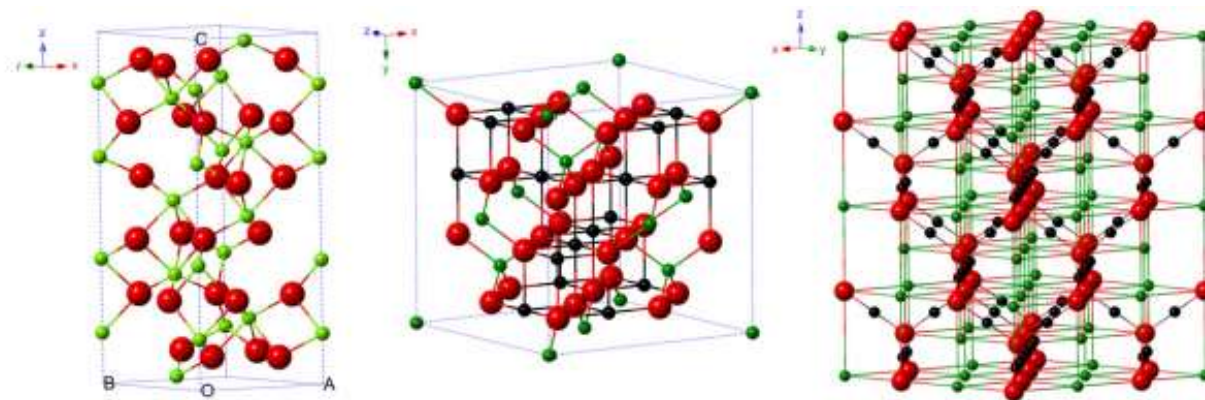
Промена структуре ензима, али и покретљивост могу узроковати смањење ензимске активности услед имобилизације. Фина померања кичме протеина и бочних група која су битна за катализу су отежана због везивања за носач. Наелектрисане аминокиселине изложене површини могу стварати електростатичке интеракције са носачем. Привлачење и контакт између јонских група ензима и површине носача смањују слободну енергију система, али истовремено могу довести и до извијања ензима.

Услед сложености поступка имобилизације потребно је сагледати утицај великог броја различитих фактора на везивање и стабилност ензима. Главни задатак у дизајнирању имобилисаног ензима је одабир одговарајућег носача (некаталитички део имобилизата), услова (рН, температура и природа реакционе средине) и ензима (који карактерише порекло, природа и чистоћа) [53].

2.2.2. Магнетне честице као носачи за имобилизацију ензима

Последњих 20 година јавља се велико интересовање за истраживање синтезе магнетних честица, посебно суперпарамагнетних наночестица због њихове употребе у медицини, у производњи биосензора, за биосепарације итд. [54]. Носачи магнетних својстава омогућавају лаку сепарацију имобилизата из реакционог медијума. Поред тога, могу се смањити дифузионе лимитације услед кретања биокатализатора кроз реакциону смешу под дејством спољашњег магнетног поља. Имобилизат не трпи механичка оштећења која су уобичајена приликом сепарације центрифугирањем или филтрирањем.

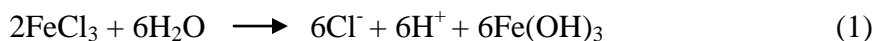
У природи се оксиди гвожђа најчешће налазе у облику ромбоударског хематита α - Fe_2O_3 , кубних спинела магнетита Fe_3O_4 и магхемита γ - Fe_3O_4 (Слика 2.7). Хематит нема практични значај као друга два оксида гвожђа магнетит и магхемит, због својих слабих магнетних особина.



Слика 2.7. Кристална структура хематита, магнетита и магхемита редом (црне кугле означавају Fe^{2+} , зелене Fe^{3+} , а црвене O^{2-} јоне) [54]

У литератури је описан велики број метода за синтезу честица магнетних својстава. Метода копреципитације магнетита мешањем водених раствора FeCl_3 и FeSO_4 под одређеним условима је један од начина добијања наночестица магнетних особина. Копреципитација се објашњава кроз неколико ступњева [55].

Први ступањ је хидролиза соли гвожђа према следећим једначинама:





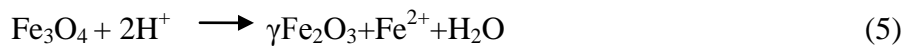
Затим NH_4^+ реагује са анјонима Cl^- и SO_4^{2-} насталим хидролизом соли гвожђа:



Нуклеација Fe_3O_4 може се приказати реакцијом:



Завршетак преципитације очекује се при рН између 8 и 14 са стехиометријским односом 2:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) у одсуству кисеоника [56]. Међутим, магнетит (Fe_3O_4) није стабилан и прелази у магхемит ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) у присуству кисеоника.



Иако је копреципитација једноставан поступак којим се може добити већа количина магнетних наночестица, контрола расподеле величине честица је ограничена јер само кинетички фактори контролишу раст кристала.

Копреципитацију чине две фазе: нуклеација (формирање кристализационих центара) и раст честица (спор раст нуклеуса дифузијом растворене супстанце из раствора ка површини кристала) [57-61]. За добијање монодисперзних наночестица оксида гвожђа наведене фазе би требало раздвојити (нуклеацију треба избегавати током периода раста кристала) [62]. Релативна брзина ова два процеса одређује полидисперзитет и величину честица оксида гвожђа. Мање честице диспергованих колоида формирају се када је брзина нуклеације већа, а брзина раста честица мања. Ово се постиже брзим додавањем и снажним мешањем реагенаса. Пораст температуре значајно убрзава стварање феритних честица. На овај начин добијају се магнетне честице нанодимензија.

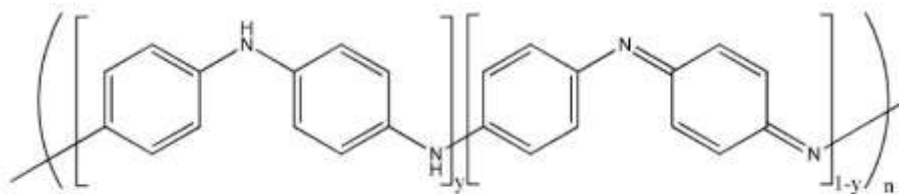
Честице синтетисане копреципитацијом су макро-јони. Површинско наелектрисање ових јона потиче од специфично адсорбованих хидроксилних група. Имају негативно наелектрисање у алкалној средини и позитивно наелектрисање у киселој средини. OH^- лиганди имају изоелектричну тачку на рН 7,5. Показано је да ће OH^- лиганди

остати на магнетним честицама при рН 6-10. Ове хидроксилне групе на површини магнетних честица одговорне су за везивање протеина [63].

2.2.3. Полианилин као носач за имобилизацију ензима

Полианилин (PANI) је један од највише проучаваних полимера са широким спектром примене базираним пре свега на проводљивости, али и лакој синтези, ниској цени, јединственим редокс особинама и хемијској стабилности. Примењује се у медицини [64,65], електрореолошким флуидима [66], гасним [67] и електрохемијским сензорима [68]. Такође, PANI, али и различити PANI-композити препознати су као погодни носачи за имобилизацију ензима [69,70].

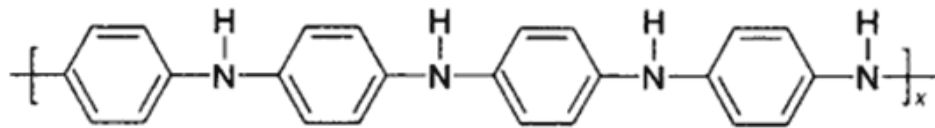
Полианилин је изграђен из amino и imino јединица. Amino јединица (y) састоји се из два бензоева прстена, а imino јединица ($1-y$) се састоји из једног бензеновог и једног хиноидног прстена (Слика 2.8.). У зависности од услова синтезе и доповања, полианилин може да се добије у различитим облицима.



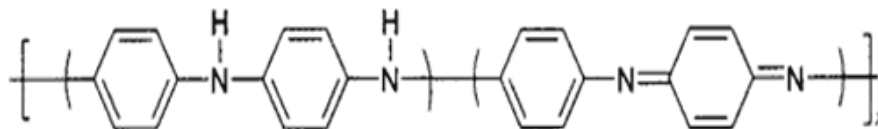
Слика 2.8. Структура полианилина који се састоји из редукованих amino јединица (y) и оксидованих imino јединица ($1-y$)

Када је $y=1$ полианилин је у потпуно редукованом облику. Јединица која се понавља је искључиво амин, а полимер се назива леукоемалдин база (LEB). У потпуно оксидисаном облику ($y=0$) полимер носи назив пернигранилин (PB), основну јединицу чини само имин [71]. Средња оксидациона стања, када је $y=0,35-0,65$ означена су као емералдин база (EB). Конверзија између облика може да се постигне преко електродног потенцијала или излагањем погодним оксидационим или редукованим средствима [72].

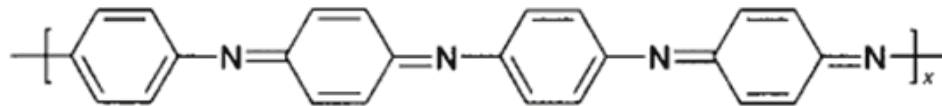
Потпуно редуковани облик полианилина ЛЕВ је нестабилан, врло лако се оксидује. Полуоксидована форма PANI, емералдин база-ЕВ је стабилна на ваздуху и може се чувати без икаквих хемијских промена.



А



Б



В

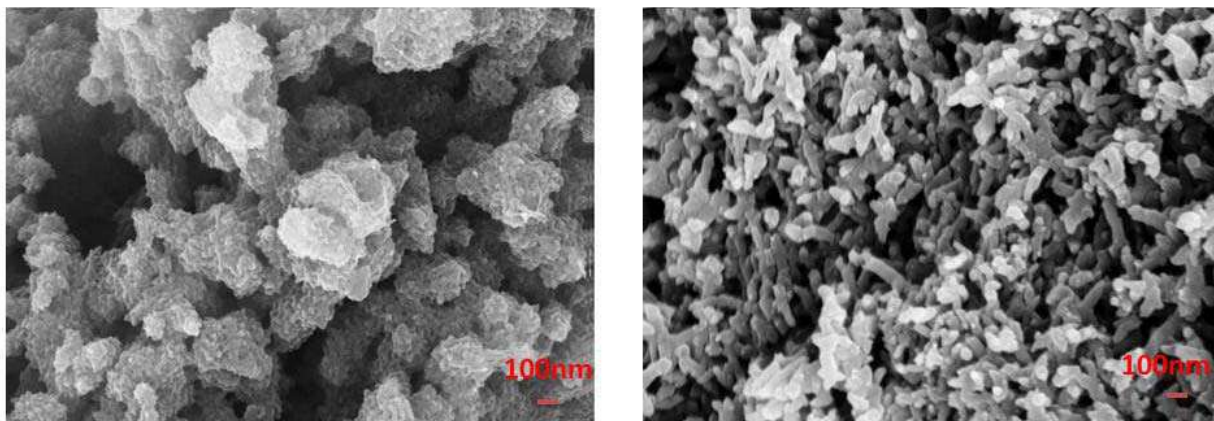
Слика 2.9. Прелаз amino у имино јединице оксидацијом полианилина

Електрична проводљивост органских полимера креће се од 10^{-12} до $10^{-22} \text{ Scm}^{-1}$. Ово својство их је сврстало међу најбоље изолаторе. Међутим, седамдесетих година прошлог века група аутора показала је да се електрична проводљивост полиацетилена драстично повећава третирањем јаким оксидационим или редукционим средствима [73]. Протекле три деценије уложено је доста у истраживања коњугованих полимера, јер се показало да имају необичне електричне и оптичке особине које су раније приписиване искључиво неорганским материјалима. Коњуговане двоструке везе и планарна структура молекула одговорни су за проводљивост полимера. У проводним полимерима, сваки sp^2 хибридизован С атом формира три везе које леже у истој равни. Четврти валентни

електрон налази се у нехибридизованој p_z орбитали орјентисаној нормално на раван коју формирају σ везе. Преклапањем p_z орбитала формирају се делокализоване π везе. Овај систем веза описан је електронским таласним функцијама које су делокализоване у читавом ланцу. Делокализација омогућава мобилност наелектрисања дуж кичме полимера [74]. Проводни полианилин може се синтетисати хемијски или електрохемијски, при чему обе методе имају одређене предности и недостатке.

2.2.3.1. Хемијска синтеза полианилина

Хемијском синтезом полианилина могућа је производња и пост-ковалентна модификација веће количине полимера уз више могућности за ковалентну модификацију кичме полианилина. Недостаци су немогућност добијања танког филма и сложеност саме синтезе. Хемијска синтеза полианилина типично се изводи у киселој средини у присуству оксиданса, најчешће $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ [75]. Један од начина добијања нановлакана полианилина јесте полимеризација на граници фаза [76]. Коришћењем воде и органског растварача ствара се гранична површина која има способност да адсорбује нуклеусе анилина. Анилин се раствара у органском растварачу, а оксидант амонијум-преоксидисулфат у воденом раствору киселине. Облик и димензије нановлакана не зависе од врсте органског растварача. Додатак минералних киселина, као што су хлороводонична, сумпорна, азотна или перхлорна узрокује стварање врло униформних нановлакана полианилина, за разлику од класичног хемијског поступка синтезе полианилина са истим киселинама, када се ствара грануларни полианилин. Врста киселине утиче на димензије добијених нановлакана. Тако је нпр. средњи пречник нановлакана насталих у хлороводоничној киселини око 30 nm (Слика 2.10.), док је у камфорсулфонској киселини око 50 nm.



Слика. 2.10. Честице полианилина у виду гранула (лево) и нановлакана (десно) [76]

Показано је да температура не утиче на облик нановлакана полианилина. Концентрација анилина у опсегу од $0,032$ до $1,6 \text{ mol dm}^{-3}$ (при чему се количина додатог анилина не мења, већ се смањује запремина органског растварача) не утиче значајно на морфологију нановлакана. Квалитет/униформност нановлакана полианилина зависи само од концентрације киселине у воденој фази. Нпр. при вишим концентрацијама HCl ($0,5$ - 2 mol dm^{-3}) већи је принос висококвалитетних нановлакана. Ако је концентрација киселине мања, почињу да расту значајне количине грануларних честица које онда преовладају у односу на нановлакна. Са HCl концентрације 1 mol dm^{-3} добија се полианилин проводљивости $0,5 \text{ Scm}^{-1}$ слично као и при класичној хемијској синтези [77].

Синтеза полианилина на граници фаза као и класична хемијска синтеза дају бимодалну расподелу величине честица. Међутим, синтезом на граници фаза доминантне су крупније честице супротно од једнофазне хемијске синтезе. У међуфазној синтези присутан је мањи број нуклеационих места у поређењу са једнофазном синтезом. У хомогеном једнофазном систему класичне синтезе молекули иницијатори помешани су тродимензионално са молекулима мономера у раствору. Због тога је сваки молекул иницијатор способан да формира центар нуклеације за раст ланца полианилина. Међутим, код међуфазне полимеризације интеракција између молекула иницијатора и мономера ограничена је на дводимензионални простор-граница двофазног система вода/органски растварач. Само они молекули који су иницијатори на граници способни су да формирају центар нуклеације. То је вероватно разлог већег удела компоненти веће молекулске масе у међуфазној полимеризацији полианилина. Протоновани полианилин у облику емералдин

соли је хидрофилан због чега се распоређује у воденој фази. У међуфазној полимеризацији полианилин прелази у водени слој иако има већу густину од воде ($\sim 1,3 \text{ g cm}^{-3}$) [78]. Пошто се полимеризација одвија на граници фаза, полимеризација се завршава преласком, када полианилин напусти дводимензионални гранични простор. Међутим, код класичне хемијске полимеризације полианилин је стално окружен мономерима и оксидационим врстама због чега полианилин коначно расте у неправилни грануларни облик. Због тога је међуфазна полимеризација ефикасна у спречавању секундарног раста полимера, јер долази до брзог уклањања насталих нановлакна из реакционог простора [78].

2.2.3.2. Електрохемијска синтеза полианилина

Електрохемијска синтеза је једноставна, могуће је синтетисати танак филм полианилина као и постићи заробљавање молекула у полимеру, а доповање се одвија истовремено [79]. Поред тога, електрохемијском синтезом ствара се значајно нижа количина токсичних једињења у односу на обичну хемијску синтезу чиме је смањен ризик од инактивације ензима током имобилизације. Главни недостатак електрохемијске синтезе је тешкоћа уклањања филма полимера са електроде као и тежа пост-ковалентна модификација веће количине проводног полимера.

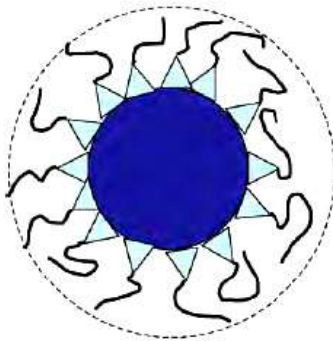
Електрохемијска синтеза често се користи због једноставности, а може се спровести при константној струји или константном потенцијалу. У раду са константном струјом стално се мора пратити потенцијал радне електроде. Густина струје не би требало да пређе 10 mA cm^{-2} . Електрохемијска синтеза се углавном изводи у киселим воденим растворима, у реакционим условима сличним онима код хемијске полимеризације. Оксидациона стања електрохемијски синтетисаног полианилина зависе од потенцијала радне електроде. Депозиција почиње на позитивно наелектрисаној радној електроди-аноде. Мономери на површини радне електроде се оксидују и формирају радикалске катјоне који реагују са другим мономерима или радикалским катјонима. На овај начин се формира нерастворни ланчани молекул на површини електроде, а полимеризација увек води ка настанку протонованог облика емералдина, тзв. емералдин соли ES. ES се лако може превести у неутралну емералдин базу EB третирањем раствором амонијака.

2.2.4. Полианилинска превлака на магнетним честицама

Полианилинска, као и превлаке других полимера примењује се у пасивизацији метала штитећи га од корозије [80]. Пресвлачење материјала полимером често се користи због проводних особина у дизајнирању сензора [81], где проводни полимер обезбеђује „активне особине“, док је носач одговоран за механичке особине. Полимерне превлаке штите површину од спољашњих оштећења, повећавају стабилност и обезбеђују повољну микрооколину за везивање и активност ензима.

Познато је да PANI образује суб-микрометарски филм на површини предмета уроњених у полимерizacionу смешу под одређеним условима синтезе. PANI филмови могу се формирати на различитим врстама честица: проводним, изолационим, хидрофобним и хидрофилним. Адхезија полианилина је снажна тако да полимер прекрива и рељефну наноструктуру зароњеног предмета [82]. Дебљина, униформност и морфологија полианилинског филма зависе од хемијске природе прекривене површине и услова синтезе [83]. Хидрофобни материјали прекривају се више или мање униформним PANI филмом, док је филм на хидрофилним микрочестицама обично дисконтинуалног карактера [84].

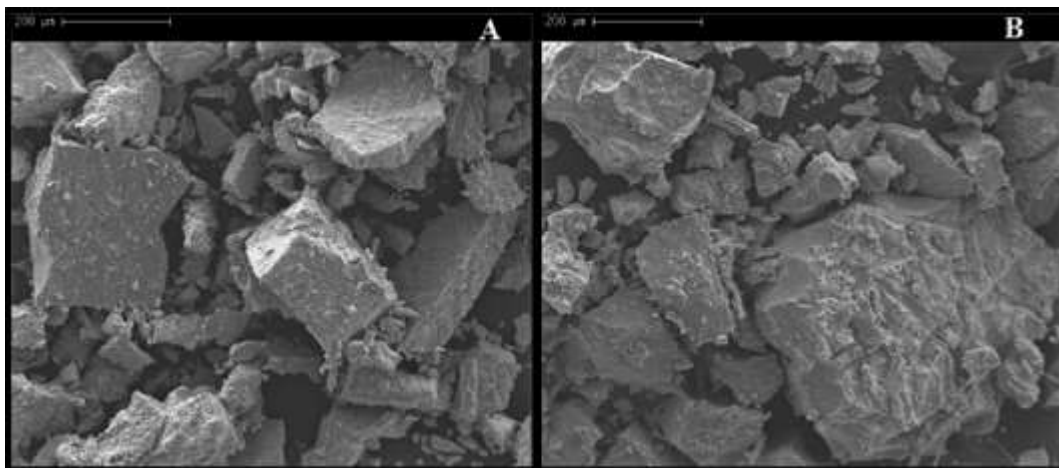
Ланци полианилина расту на површини чврстих честица уроњених у реакциону смешу. Настала PANI превлака има структуру сличну четкици, која може бити уједначене или глобуларне природе, што зависи од хидрофилности површине. Превлаке на различитим материјалима сличне су филмовима PANI створеним на равним површинама, уз једину разлику у величини и облику површине подлоге. Уочено је да увођење подлоге са великом специфичном површином убрзава полимеризацију анилина, посебно скраћујући индукциони период. Гранична површина тада има важну улогу у расту PANI нуклеуса. Хидрофобност превлаке може варирати избором одговарајуће киселине и њене концентрације за протоновање PANI [85].



Слика 2.11. Полианилинска превлака на магнетним честицама [82]

Адсорпција хидрофобних нуклеуса на хидрофобним површинама је униформнија. На хидрофилној површини, хидрофобни нуклеуси образују капљице, и PANI расте из њих формирајући грануларну структуру, где је смањена организација полимерних ланаца. Ако површина носача садржи истовремено хидрофобне и хидрофилне делове, филм проводног полимера расте преферирајући хидрофобне површине [85].

Показано је да полианилинска превлака не утиче значајно на морфологију магнетних микрочестица коришћених као носач за имобилизацију β -галактозидазе [86].



Слика 2.12. Микрографије магнетних честица (A) и магнетних честица пресвучених полианилином (B) [86]

И поред великог броја радова синтетисања магнетних честица са полимерном превлаком, за науку је то и даље велики изазов због различите хидрофилности магнетних честица и полимера. Sim и сар. [87] синтетисали су протоноване магнетне честице и на њима извршили полимеризацију анилина бележећи електостатичке и водоничне интеракције између Fe_3O_4 и PANI.

2.2.5. Имобилизација α -амилаза на магнетним честицама и на полианилину

У литератури је присутан велики број радова аутора који су испитивали имобилизацију α -амилаза на магнетним честицама. Talekar и сар. [88] испитивали су умрежавање α -амилазе са модификованим магнетним наночестицама амино групама. С обзиром на то да α -амилаза садржи само 6% остатка лизина (Lys) од свог укупног садржаја аминокиселина [89], није погодна за имобилизацију умрежавањем, па је неопходна функционализација магнетних честица. Наночестице због своје велике специфичне површине могу бити прекривене огромним бројем амино група, што доприноси механичкој стабилности умрежених ензима са ниским садржајем Lys као што је случај са α -амилазом [88]. Ковалентна имобилизација α -амилазе на модификованим магнетним наночестицама силицијум-диоксидом и амино групама омогућила је добијање биокатализатора који се лако издваја из система и задржава 86% ензимске активности након 30 дана чувања [90]. Singh и сар. [91] имобилисали су α -амилазу на хематиту (Fe_2O_3), магнетиту (Fe_3O_4), као и модификованом хематиту честицама злата и модификованом магнетиту силицијум-диоксидом. Као главни проблем примењених магнетних наночестица наводи се неконтролисана оксидација и иреверзибилна агрегација, што је решено пресвлачењем магнетних честица златом и силика полимером [91]. Mizuki и сар. [92] испитивали су утицај ротационог магнетног поља на активност α -амилазе имобилисане на магнетне наночестице прекривене декстраном. Показали су да активност расте са порастом фреквенције ротације кластера, али је број дисосованих појединачних честица такође растао, због чега треба избегавати високе фреквенције ротације, а најбоља ефикасност се постиже при 5 Hz [92].

Husain [93] је дао врло користан преглед радова имобилизације амилитичких ензима на наночестицама у коме значајно место заузима имобилизација α -амилазе на

магнетним наночестицама. Prakasham и сар. [94] имобилисали су дијастазу на феритним честицама импрегнираним у наночестицама силицијум-диоксида. На овај начин имобилисана дијастаза је задржала скоро целокупну почетну активност и после 50 циклуса употребе [94]. За ковалентно имобилисану α -амилазу магнетне наночестице пресвучене су целулозом оксидованом до диалдехида перјодатним третманом [95]. Mukherjee и сар. [96] презентовали су статистичку оптимизацију имобилисане алкалне α -амилазе из *Bacillus alcalophilus* на наносуперпарамагнетним оксидима гвожђа. Имобилисана α -амилаза показала је значајно високу специфичну активност, термичку стабилност и стабилност током чувања као и могућност вишекратне употребе [96]. Показане су предности примене имобилисане α -амилазе на магнетним Fe_2O_3 наночестицама у хидролизи скроба с обзиром на то да је имобилизат хидролизовао више скроба (92%) након 8 h на температури од 40°C од слободне α -амилазе која је под идентичним условима хидролизовала свега 73% скроба [97]. Овако имобилисана α -амилаза задржала је 94% своје каталитичке активности на нижем рН оптимуму у поређењу са слободном α -амилазом, уз умерен температурни оптимум ка вишим температурама [97]. Jalal и сар. [98] имобилисали су α -амилазу на магнетним Fe_3O_4 наночестицама ковалентним везивањем преко карбодиимида. Имобилисана α -амилаза показала је већу ефикасност везивања на собној температури и мању задржану активност у поређењу са имобилисаном α -амилазом на 4°C . Kim и сар. [99] конструисали су проточни биореактор за хидролизу скроба помоћу α -амилазе имобилисане на магнетним наночестицама које су омогућиле хидролизу 70% скроба (30 gdm^{-3}) за 1 h. Алфа-амилаза из *Bacillus licheniformis* адсорбована је на хемијски комплексном систему: магнетним наночестицама поли[2-хидроксиетил метакрилат-N-метакрилоил-(1)- фенилаланин] [100]. На овај начин постигнута је значајно висока ефикасност везивања: 705 mg α -амилазе/g наночестица. Показано је да поновна адсорпција и десорпција не утичу на већи губитак ензимске активности [100]. Магнетне наночестице модификоване адипинском киселином коришћене су за имобилизацију α -амилазе из *Bacillus sp. strain TS-23* [101]. Имобилисана α -амилаза показала је повећану стабилност током загревања, већу стабилност током чувања од слободне α -амилазе и могућност коришћења 20 пута без губитка почетне активности [101]. Lee и сар. [102] имобилисали су α -амилазу на магнетним молекулски

утиснутим полимерним композитима. Примењени носач показао је предности високе специфичне површине, суспендовања, лаког издвајања из реакције и брзе обнове ензима у поређењу са конвенционалним каталитичким процесима [102]. Имобилисана α -амилаза на 3-аминопропилтриетоксисилан(APTES)- Fe_3O_4 магнетним наночестицама показала је изразито високу стабилност током загревања без промене почетне активности након три узастопна коришћења [103]. Sohrabi и сар.[104] имобилисали су α -амилазу ковалентним везивањем на магнетним наночестицама пресвученим силицијум-диоксидом функционализованим 3-APTES. Након имобилизације повећала се термичка стабилност α -амилазе. Имобилисана α -амилаза задржала је 85% почетне активности након 6 узастопних коришћења [104]. Sawarnatha et al. [105] имобилисали су ковалентним везивањем α -амилазу на магнетним наночестицама стабилизаним помоћу арапске гуме. Имобилисано је 60% α -амилазе на модификованим и 20% на немодификованим магнетним наночестицама. Забележен је пораст термичке стабилности везаног ензима на модификованим честицама носача уз задржавање 70% активности након 6 h коришћења [105]. Baskar и сар. [106] користили су имобилисану α -амилазу на магнетним наночестицама за хидролизу скроба слатког кромпира до глукозе, при чему је скроб слатког кромпира показао већи афинитет према имобилисаној α -амилази. Испитана је имобилизација алфа-амилазе ковалентно везане за модификоване магнетне наночестице амино групама третиране са 3-APTES преко глутаралдехида [107]. Имобилисана α -амилаза показала је веома високу термичку стабилност и задржавање 68% почетне активности након 9 циклуса употребе [107]. Eslamipour и Hejazi [108] испитивали су ефекат различитих оперативних услова на ковалентну имобилизацију α -амилазе на магнетним наночестицама. Забележено је задржавање 50% почетне активности након 12 h и 40% почетне активности након 6 циклуса коришћења [108]. Имобилизација α -амилазе на магнетним наночестицама показала се значајном у брзом открићу потенцијалних инхибитора α -амилазе из лековитог биља помоћу ligand-screening методе интегрисане са течним хроматографом високих перформанси (HPLC) [109].

Имобилизација α -амилазе на полианилину је недовољно проучена и поред неких предности који је дати полимер показао при имобилизацији трипсина [110], глукозо-оксидазе [111], холестерол естеразе и холестерол оксидазе [112]. Ashly и сар. [113]

испитивали су имобилизацију α -амилазе на полианилину у различитим формама: емералдин базе и емералдин соли ковалентном имобилизацијом и адсорпцијом. Наноконтрополимери сребра и полианилина коришћени су као носач за ковалентну имобилизацију α -амилазе [114] која је показала високу рН и температурну стабилност у поређењу са слободном α -амилазом. Алфа-амилаза из *Aspergillus niger* имобилисана је на полианилину модификованим глутаралдехидом [115]. У поређењу са слободном, имобилисана α -амилаза је показала мању осетљивост на инхибицију Zn^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{2+} . Показано је да је термичка стабилност расла у присуству $CaCl_2$ [115].

У литератури не постоје подаци о имобилизацији α -амилазе на магнетним честицама пресвученим полианилином, што је основни предмет проучавања у овој тези.

2.2.6. Утицај ултразвучних таласа на активност ензима

Последњих година порасло је интересовање за испитивањем утицаја ултразвучних таласа ниских фреквенција на ензиме, због све чешће примене у биотехнологији и прехранбеној индустрији [116]. Хемијски ефекат ултразвука не огледа се у директној интеракцији са молекулским врстама, већ преко кавитационог ефекта, који се огледа у ослобађању велике количине локализоване енергије. Акустична и хидродинамичка кавитација, за разлику од оптичке и честичне, генеришу интензитета неопходне да изазову физичке и хемијске промене у систему. Током звучне кавитације формирају се слободни радикали захваљујући дисоцијацији испарења заробљеним у шупљинама. Ови радикали могу да убрзају хемијске реакције на собној температури иако су иначе потребни драстичнији услови.

У литератури се јављају контрадикторни наводи о утицају ултразвучних таласа на ензиме. Утицај ултразвука на каталитичку активност ензима углавном је негативан [117-119] због локализоване високе температуре и јаких ударних таласа. Међутим, у последње време показано је да при деловању ултразвука нижих фреквенција не долази до инактивације свих ензима, шта више долази до повећања активности појединих биокатализатора. Ултразвучни таласи нижих фреквенција и умереног интензитета производе пролазни кавитациони ефекат [120]. Ултразвук може позитивно утицати на активност имобилисаних ензима побољшавајући активност ензима [121], оперативну

стабилност [122] и термодинамичку контролу [123]. Ултразвучни ефекат директно мења структуру ензима и тако га чини доступним за реакцију са супстратом [124]. Због потенцијала у побољшању ензимске активности све више се последњих година испитује утицај ултразвука на ензиме [125]. Испитивањем утицаја ултразвука на активност α -амилазе и амилоглукозидазе утврђено је да ултразвук мења понашање ензима, јер је за температуре до 50°C активност ензима била увек већа у присуству него у одсуству ултразвучног зрачења [126]. Oliveira и сар. [127] показали су да ултразвук инактивира α -амилазу из *Aspergillus oryzae* и из *Bacillus amyloliquefaciens*, а супротно томе ултразвук је активирао α -амилазе из *Bacillus licheniformis*: термостабилну и Liquozyme амилазу [127].

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Материјали

За хемијску синтезу полианилина коришћене су следеће хемикалије:

- анилин (Merck, Немачка) предестилисан у атмосфери аргонана Катедри за физичку хемију и електрохемију Технолошко-металуршког факултета,
- амонијум-пероксидисулфат (Lach-Nera, Република Чешка),
- хлороформ (Centrochem, Стара Пазова),
- концентрована хлороводонична киселина (Zorka Pharma, Шабац).

Синтеза и третман магнетних честица вршени су коришћењем следећих хемикалија:

- гвожђе(III)-хлорид хексахидрат (Dispochem, дистрибуција Superlab, Србија),
- гвожђе(II)-сулфат хептахидрат (Dispochem, дистрибуција Superlab, Србија),
- 25 %-ни амонијум-хидроксид (NRK Inženjering, Београд),
- калијум-перманганат (Centrochem, Стара Пазова),
- лимунска киселина монохидрат (Centrochem, Стара Пазова).

За формирање полианилинске превлаке на магнетним честицама поред предестилисаног анилина коришћена је и:

- азотна киселина (Zorka Pharma, Шабац).

Имобилисана је α -амилаза (EC 3.2.1.1) из *Bacillus licheniformis* из ензимског препарата Termamyl, (Novozymes, A/S, Данска) који је био следећег састава: α -амилаза 2%, вода 51,8%, сахароза 32%, натријум-хлорид 14 % и калијум-сорбат 0,2%.

Испитивање активности α -амилазе вршено је употребом следећих хемикалија:

- динатријум-хидрогенфосфат (Dispochem, дистрибуција Superlab, Србија),

- натријум-хидрогенфосфат дихидрат (Centrohem, Стара Пазова),
- растворни скроб (Centrohem, Стара Пазова),
- калијум-јодид (Т.Т.Т.д.о.о., Хрватска),
- јод (NRK Inženjering, Београд) и
- концентрована хлороводонична киселина (Zogka Pharm, Шабац).

Основни раствор јода добијан је растварањем 500 mg J₂ и 5,0 g KI у 100 cm³ дестиловане воде. Радни раствор јода добијан је стоструким разблажењем основног раствора, а припреман је непосредно пре употребе.

За мерење садржаја протеина заосталих у раствору коришћени су:

- бакар(II)-сулфат пентахидрат (Beta-Нем, Београд),
- калијум, натријум-тартарат тетрахидрат (Centrohem, Стара Пазова),
- натријум-хидроксид (NRK Inženjering, Београд) и
- Folin-Ciocalten-ов реагенс (Sigma, St. Louis, САД).

За испитивање утицаја Ca²⁺ јона на имобилизацију поред наведеног коришћен је и

- калцијум-хлорид (Centrochem, Стара Пазова).

Десорпција ензима са носача праћена је уз коришћење:

- Triton X-100 (Sigma, St. Louis, САД) и
- натријум-хлорид (Centrohem, Стара Пазова).

За снимање IR спектра употребљаван је

- калијум-бромид IR grade (Sigma, St. Louis, САД).

3.2. Методе

3.2.1. Методе синтезе носача

3.2.1.1. Хемијска синтеза полианилина и издвајање фракција полианилинских честица

За синтезу полианилина коришћен је хемијски поступак полимеризације мономера анилина на граници две фазе вода/хлороформ по поступку који су описали аутори Huang и Kaner [76]. У стакленој виали запремине (7 cm^3) растварано је (93 mg) анилина у (3 cm^3) хлороформа. У другој виали исте запремине припреман је раствор амонијум-пероксидисулфата растварањем (55 mg) амонијум-пероксидисулфата у (3 cm^3) хлороводоничне киселине концентрације 1 mol dm^{-3} . Пажљивим додатком водене фазе на органску фазу идентичне запремине стварао се гранични слој вода/органски растварач. Након кратког индукционог времена, око 30 s , јављао се зелени полианилин на граници две фазе који је прелазео у водену фазу. Полимеризација је остављена 24 сати да се заврши, а затим је производ сакупљан и филтриран. Синтеза је вршена и у већим реакционим посудама (50 и 100 cm^3) с тим да се увек водило рачуна да је моларни однос анилина и амонијум-пероксидисулфата $4:1$.

Полианилин је издвајан филтрирањем, испиран дестилованом водом до $\text{pH } 7,0$, осушен на 105°C и уситњен у авану. Пропуштањем уситњеног полианилина кроз низ спојених ситаса пречником пора од 800 , 500 , 315 , 160 и $90 \text{ }\mu\text{m}$ добијане су четири фракције честица величине: $90\text{-}160\text{ }\mu\text{m}$, $160\text{-}315\text{ }\mu\text{m}$, $315\text{-}500\text{ }\mu\text{m}$ и од $500\text{-}800 \text{ }\mu\text{m}$. Синтетисане фракције полианилина чуване су на собној температури и без накнадног третмана коришћене су за имобилизацију α -амилазе.

3.2.1.2. Електрохемијска синтеза полианилина

Електрохемијска полимеризација анилина вршена је на Катедри за физичку хемију и електрохемију Технолошко-металуршког факултета. Синтеза је извођена на графитној електроди галваностатски, при константној густини струје од 2 mA cm^{-2} из воденог раствора хлороводоничне киселине која је садржала $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ анилина.

Графитна електрода површине 100 cm^2 била је постављена између две плоче од нерђајућег челика површине по 50 cm^2 . Полимеризација је извођена у електрохемијском реактору од полиетилена запремине $0,8 \text{ dm}^3$. Након синтезе прах полианилина механички је уклањан са електроде. Прах полианилина испиран је дестилованом водом до негативне реакције на хлоридне јоне и сушен на 90°C под вакуумом. Олигомери растворни у ацетону издвајани су у Соксхлет (Sokshlet) апаратури током 3 сата након чега је полианилин испиран дестилованом водом и сушен 3 сата. Добијане су честице полианилина у форми емералдин базе (EB) и емералдин соли (ES) [70].

3.2.1.3. Хемијска синтеза магнетних честица и магнетних честица пресвучених полианилином

Магнетне честице (MAG) синтетисане су методом коопреципитације FeCl_3 и FeSO_4 у вишку амонијака [56]. Растворено је $5,6 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $10,8 \text{ g FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ у 300 cm^3 дестиловане воде. Добијени раствор је загреван на 80°C у воденом купатилу (TKST, Хрватска) са 200 cm^3 25%-ног NH_4OH . Раствор је непрестано и енергично мешан 60 минута, након чега је смеша филтрирана. Добијане честице даље су третиране према поступку описаном у литератури [86]: испиране су темељно дестилованом водом до рН 7,0, сушене на 105°C , а након тога просејаване ($<100 \mu\text{m}$). Честице ($4,56 \pm 0,05 \text{ g}$) су затим остављане у раствору 100 cm^3 $0,1 \text{ M KMnO}_4$ на 50°C 24 h и испиране дестилованом водом. Добијене честице означене су као MAG. Магнетне честице пресвучене полианилином синтетисане су тако што је $4,50 \pm 0,04 \text{ g MAG}$ честица урањано у 100 cm^3 $0,5 \text{ M}$ раствора анилина у $0,1 \text{ M HNO}_3$. Смеша је остављана 2 h да анилин полимеризује. Настале магнетне честице пресвучене полианилином испиране су сукцесивно дестилованом водом, раствором $0,1 \text{ M}$ лимунске киселине и дестилованом водом.

3.2.2. Методе карактеризација честица носача

3.2.2.1. Магнетна својства MAG и MAG-PANI

Магнетне величине носача MAG и MAG-PANI мерене су помоћу Quantum Design MPMS (Magnetic Property Measurement System) XL-5 SQUID магнетометра којим је могуће мерити магнетизацију узорка у интервалу температуре 1,8 до 400 К и опсегу магнетног поља од -5 до 5 Т. Мерења су вршена у Лабораторији за теоријску физику и физику кондензоване материје Института за нуклеарне науке Винча.

3.2.2.2. Скенирајућа електронска микроскопија

Морфологија магнетних честица и магнетних честица пресвучених полианилином испитивана је помоћу скенирајуће електронске микроскопије емисијом електрона-применом поља (FESEM). Мерења су вршена на Технолошко-металуршком факултету на електронском микроскопу (MIRA3 XMU, Република Чешка). Пре снимања, уклањан је гас и на узорке је наносен танак филм злата распршивањем помоћу инструмента Polaron SC502 Sputter Coater (Fison Instruments, Уједињено Краљевство). Средњи пречник и стандардна девијација величине честица одређиван је помоћу MIRA TESCAN софтвера.

3.2.2.3. Инфрацрвена спекторскопија са Фуријеовим трансформацијама

Спектри честица носача у инфрацрвеној области (IR) снимани су помоћу спектрофотометра Bomem Hartman Braun (Немачка) на катедри за Органску хемију Технолошко-металуршког факултета. Узорак за снимање припреман је мешањем 0,01 g носача MAG/MAG-PANI са 0,1 g KBr, након чега је хомогена смеша пресована у форми пелета (под притиском од 1,01 kPa) у трајању од 2 min. FT-IR спектар је сниман у распону таласног броја $400-4000\text{ cm}^{-1}$.

3.2.2.4. Расподела величине честица и зета потенцијала

Зета потенцијал и расподела величине честица мерена је методом динамичког расипања светлости (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Уједињено Краљевство) на Технолошком факултету у Новом Саду. Пре сваког мерења узорци су дисперговани у дејонизованој води. Средња вредност хидродинамичког радијуса, R_h и полидисперзност одређени су на основу Stokes– Einstein-ове једначине:

$$R_h = \frac{k \cdot T}{6\pi\eta D} \quad (1)$$

где је k -Болцманова константа, T - апсолутна температура при којој се изводе мерења, η - вискозитет медијума и D -коэффициент дифузије.

3.2.3. Методе карактеризације ензимског препарата Termamyl

3.2.3.1. UV спектар ензимског препарата Termamyl

Максимуми апсорпције ензимског препарата Termamyl испитани су у UV области помоћу спектрофотометра (Cary 300 UV-Vis, Agilent, САД). Спектри су снимани у опсегу од 190-350 nm. FT-IR спектар је сниман у распону таласног броја 400-4000 cm^{-1} .

3.2.3.2. IR спектар ензимског препарата Termamyl

IR спектри ензимског препаата Termamyl снимани су помоћу спектрофотометра (Bomem Hartman Braun, Немачка). Termamyl је пре снимања спектра сушен у вакуум сушници у танком слоју на 60°C и након мешања са KBr у односу 1:10 пресован у форми пелета (под притиском од 1,01 kPa). FT-IR спектар је сниман у распону таласног броја 400-4000 cm^{-1} .

3.2.3.3. Расподела величине молекула и зета потенцијала α -амилазе у ензимском препарату Termamyl

Димензије и зета потенцијал α -амилазе у ензимском препарату Termamyl одређене су методом динамичког расипања светлости (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Уједињено Краљевство). Узорак је припреман растварањем Termamyl препарата у дејонизованој води.

3.2.4. Имобилизација алфа-амилазе

Алфа-амилаза из *Bacillus licheniformis* (Termamyl Novozymes A/S Danska) имобилисана је методом адсорпције на честицама полианилина, магнетним честицама и магнетним честицама са полианилинском превлаком. Ензим је растваран у 40 mM фосфатном пуферу. Раствору ензима (5 cm³) претходно инкубираног на одређеној температури $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (Termo 120 DEMA, Piraska Bistrica, Словенија) додавано је по 50 mg носача. Имобилизација на честицама MAG и MAG-PANI одвијала се уз константну брзину мешања од 250 o/min у орбиталном шејкеру (ИКА, Немачка). Брзина мешања током имобилизације на честицама PANI и на електрохемијски синтетисаном полианилину у форми емералдин базе (ЕВ) била је 500 o/min. Током имобилизације одржавана је константна температура у термостату (Termo 120 DEMA, Piraska Bistrica, Словенија) (Слика 3.1.)



Слика 3.1. Имобилизација α -амилазе мешањем на орбиталном шејкеру у термостату

Након имобилизације из смеше је издвајан имобилизат филтрирањем (PANI, EB) или помоћу спољњег магнетног поља (MAG и MAG-PANI). Одређивана је активност α -амилазе и садржај протеина у супернатанту и у раствору од испирања имобилизата. Такође је праћена и активност добијеног имобилизата који је након реакције хидролизе скроба испиран и чуван у 5 cm³ пуфера на 4°C.

Ефикасност имобилизације оцењивана је на основу једначина (2) и (3):

$$Y_m = \frac{m_E}{m_0} 100 \quad (2)$$

$$Y_A = \frac{SA_i}{SA_a} 100 \quad (3)$$

где је Y_m - принос масе α -амилазе, %, Y_A - принос активности α -амилазе, m_E - маса везаног ензима за носач, mg, m_0 - почетна маса ензима, mg, SA_i - специфична активност имобилизата, $U \text{mg}^{-1}$ рачунато по маси везаног ензима, SA_a – специфична активност слободног ензима, $U \text{mg}^{-1}$.

3.2.5. Одређивање активности алфа-амилазе

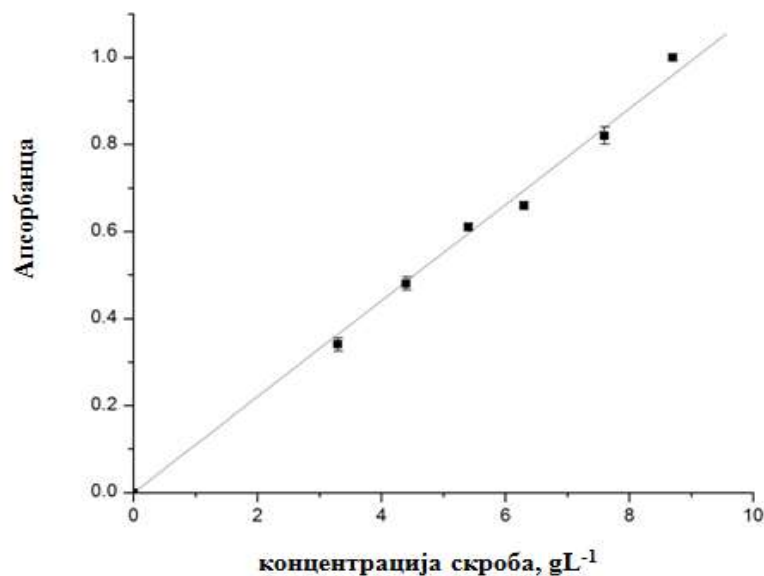
Активност слободне и имобилисане алфа-амилазе одређивана је мерењем почетне брзине реакције хидролизе (2%, w/v) раствора скроба, при одређеним рН вредностима и температурама [128]. У раствор супстрата (смеша 3 cm³ 2%, w/v, раствора скроба и 2,5 cm³ 40 mM фосфатног пуфера одређене рН) додавано је по 0,1 cm³ раствора ензима (или 50 mg имобилизата). Из реакционог суда узимано је по 0,1 cm³ аликуота у одређеним временским интервалима (на 5 min или чешће у зависности од активности ензима). Аликуот је додаван у раствор јода укупне запремине 10,9 cm³ (5 cm³ 0,1 M HCl, 5 cm³ радног раствора јода и 0,9 cm³ 40 mM фосфатног пуфера рН 6,9 на собној температури). Апсорбанца формиране плаве боје је мерена спектрофотометријски на 600 nm (Cary 300 UV-Vis, Agilent, САД). Једна јединица ензимске активности (U) дефинисана је као количина ензима неопходна да разгради 1 mg скроба на одређеној температури и рН. Сва мерења понављана су најмање два пута.

Конструисање калибрационе криве зависности апсорбанце од концентрације супстрата (скроба) неопходно је за превођења мерених апсорбанци скробно-јодног комплекса у ензимске јединице (Слика 3.2.).

На основу Ламбер-Беровог закона:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = a \cdot b \cdot c \quad (4)$$

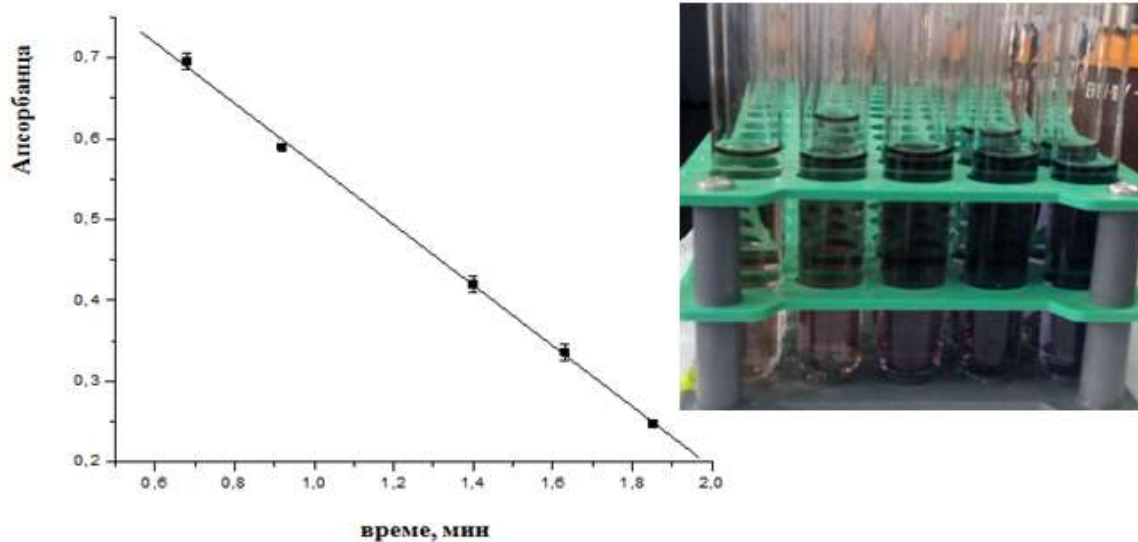
где је A -апсорбанца очитана на спектрофотометру, I_0 -интензитет упадне светлости, I -интензитет пропуштене светлости, b -ширина кивете (1 cm), a -апсорпциони коефицијент (са калибрационе криве: $a=0,11\text{cm}^2\text{mg}^{-1}$), c -концентрација супстрата, mgcm^{-3} .



Слика 3.2. Калибрациона крива супстрата (раствора скроба), $y=0,11x$, мерено у 40 mM фосфатном пуферу pH 6,9 и на 25 °C

Активности слободне и имобилиране α -амилазе одређиване су праћењем промене боје скробно-јодног комплекса у зависности од времена (Слика 3.3.).

Из зависности $A=f(t)$ (A -апсорбанца, t -време) читане су вредности нагиба $\Delta A \Delta t^{-1}$ чијим је уврштавањем у једначину (5) одређивана активност слободног или у једначину (6) активност имобилисаног ензима.



Слика 3.3. Пример одређивања почетне брзине слободне α -амилазе, мерена са 2%-ним раствором скроба, при рН 6, 30 °С, концентрацији ензима 1,5 mg cm^{-3} , $y=-0,375x+0,944$

$$A_a = \frac{\Delta A \cdot V_{rs}}{a \cdot \Delta t \cdot V_u} \quad (5)$$

$$A_i = \frac{\Delta A \cdot V_{rs}}{a \cdot \Delta t \cdot m_i} \quad (6)$$

где је A_a -активност слободне α -амилазе (U cm^{-3}), $\Delta A/\Delta t$ -почетна брзина хидролизе скроба (min^{-1}), V_{rs} -запремина реакционе меше (cm^3), a -апсорпциони коефицијент, $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$, добијен из једначине (4) V_u -запремина раствора ензима (cm^3), A_i -активност имобилисане α -амилазе (U mg^{-1}), m_i -маса имобилизата, mg .

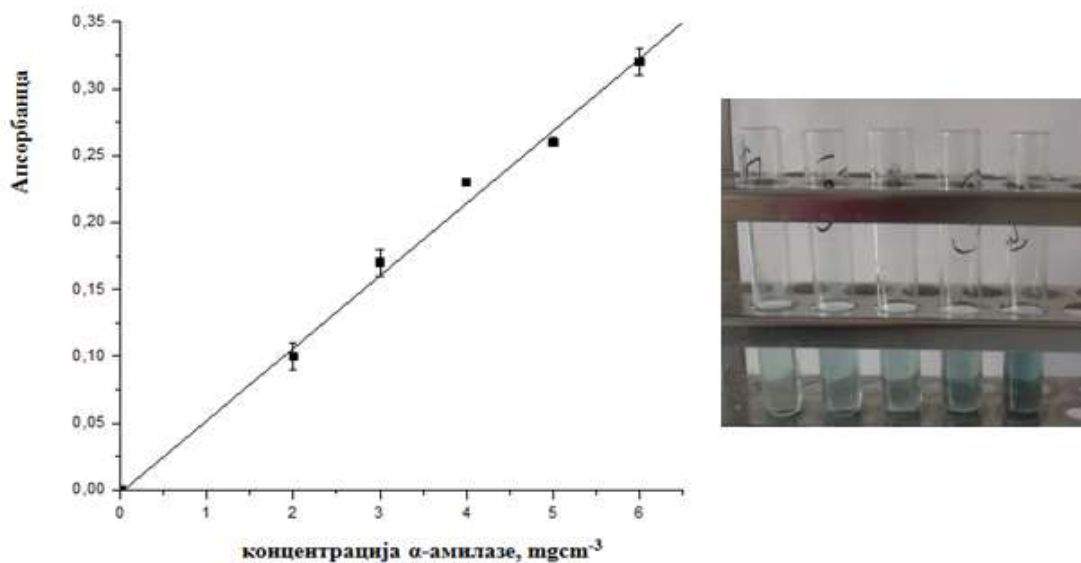
3.2.6. Методе одређивање садржаја протеина

3.2.6.1. Одређивање протеина методом по Лорију(Lowry)

Садржај протеина мерен је спектрофотометријски мерењем интензитета обојених производа ароматичних аминокиселина са Folin-Ciocalten реагенсом у комбинацији са биуретском реакцијом за пептидне везе [129]. Концентрација насталих обојених производа мерена је на 500 nm. Са Folin-Ciocalten-овим реагенсом реагују аминокиселине које садрже хидроксилну групу фенолског карактера као што су тирозин и триптофан. Велика осетљивост методе омогућава је да се одреди 10^{-5} до 10^{-4} g протеина у проби. Недостатак ове реакције је што интензитет боје зависи од аминокиселинског састава протеина. Као стандард приликом одређивања садржаја протеина најчешће се користи говеђи серум албумина, али због наведеног недостатка методе стандардна крива конструисана је за коришћену α -амилазу (Termamyl). На развијање боје може да утиче и присуство многих других супстанци. Због тога је важно да се за конструисање калибрационе криве током анализе користи исти растварач као и за припрему узорака који се анализирају. Потребни реагенси припремани су на следећи начин:

- Реагенс А: 2 %-ни (m/v) раствор Na_2CO_3 у 0,1 М NaOH,
- Реагенс Б: 1 %-ни (m/v) CuSO_4 у дестилованој води,
- Реагенс Ц: 2 %-ни (m/v) К, Na-тартарат у дестилованој води,
- Реагенс Д припреман је мешањем 1 cm^3 реагенса Б и 1 cm^3 реагенса Ц у мерном суду од 100 cm^3 који је допуњен реагенсом А. Припреман је непосредно пре употребе.

Стандардна крива конструисана је пре сваке серије експерименталних мерења (Слика 3.4.).



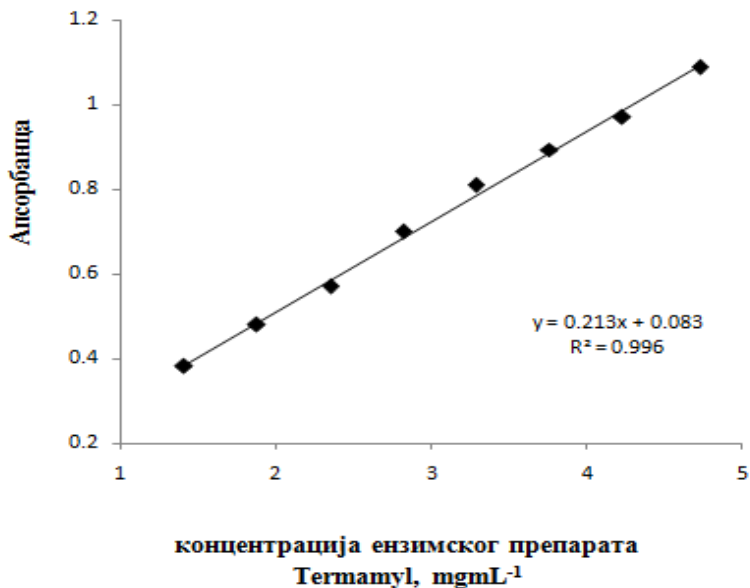
3.4. Калибрациона крива за одређивање садржаја протеина, мерено у 40 mM фосфатном пуферу pH 6,9 на 25 °C на 500 nm

Стандардни раствори у опсегу 0,1 до 0,5 mg cm^{-3} добијали су се разблаживањем основног раствора концентрације 1 mg cm^{-3} , који се припремао растварањем 10 mg стандардног протеина (Тетмау1) у 10 cm^3 дестиловане воде. У епрувете су додаване одређене запремине основног раствора микропипетом (0,1-1 cm^3), а затим дестилована вода (1,9- 1 cm^3) тако да се постизала укупна запремина од 2 cm^3 . У раствор је затим додавано 4 cm^3 реагенса Д и након мешања раствори су остављани да стоје 10 минута на собној температури. После тога додавано је по 0,4 cm^3 Folin-Ciocalten-овог реагенса и садржај епрувета добро промешан. Развијање боје трајало је по 45 минута на собној температури, након чега је мерен апсорбанца спектрофотометријски на 500 nm.

За одређивање садржаја протеина у растворима у којима се налази CaCl_2 конструисана је калибрациона крива зависности мерених апсорбанци од концентрације ензимског препарата Тетмау1 припремањем основног раствора у 40 mM фосфатном пуферу pH 6,9 који је садржао 5 mM CaCl_2 .

3.2.6.2. Одређивање протеина мерењем карактеристичних апсорбанција у UV области

Ензимски препарат Termamyl показивао је максимуме апсорпције на 200 и 255 nm (Слика 4.1). Максимум на 255 nm потиче само од присутне α -амилазе, због чега је конструисана калибрациона крива мерењем апсорбанци на овој таласној дужини (Слика 3.5).



Слика 3.5. Калибрациона крива ензимског препарата Termamyl на 255 nm

3.2.7. Методе оптимизације услова имобилизације на MAG-PANI

Имобилизација α -амилазе на магнетним честицама пресвученим полианилином оптимизована је тако што је ензимски препарат Termamyl мешан са честицама MAG-PANI под идентичним условима уз варирање само једног од следећих параметара: времена, почетне концентрације ензимског препарата Termamyl, pH и температуре. Свака серија експеримената извођена је у две паралелне пробе, а резултат је приказан као средња вредност са стандардном девијацијом.

3.2.7.1. Испитивање оптималног времена имобилизације

Испитивање оптималног времена имобилизације ензимског препарата Termamyl на честицама MAG-PANI праћено је у опсегу од 15 до 90 min. Мешано је по 50 mg MAG-PANI са по 5 cm³ раствора ензимског препарата Termamyl (концентрације 3 mgcm⁻³) у 40 mM фосфатном пуферу рН 6,9 (претходно инкубираног на 25°C). Мешање реакционе смеше извођено је при константној брзини од 250 o/min. Након имобилизације под дејством спољњег магнетног поља, имобилизат је одвојен од супстрата и испитана му је активност по поступку описаном под 3.2.5.

3.2.7.2. Испитивање оптималне почетне концентрације ензима

Оптимална почетна концентрација ензимског препарата Termamyl за имобилизацију на честицама MAG-PANI испитивана је у опсегу од 0,7 до 5 mgcm⁻³ на температури од 25°C. Мешано је по 50 mg MAG-PANI са по 5 cm³ раствора ензимског препарата Termamyl (одређене концентрације) у 40 mM фосфатном пуферу рН 6,9 (претходно инкубираног на 25°C). Мешање реакционе смеше извођено је при константној брзини од 250 o/min. Након имобилизације под дејством спољњег магнетног поља, имобилизат је одвојен од супстрата и испитана му је активност по поступку описаном под 3.2.5.

3.2.7.3. Испитивање оптималне рН имобилизације

Оптимална рН имобилизације ензимског препарата Termamyl на честицама MAG-PANI испитивана је у опсегу рН од 6,2 до 7,8. Мешано је по 50 mg MAG-PANI са по 5 cm³ раствора ензимског препарата Termamyl (концентрације 3 mgcm⁻³) у 40 mM фосфатном пуферу одређене рН (претходно инкубираног на 25°C). Мешање реакционе смеше извођено је при константној брзини од 250 o/min. Након имобилизације под дејством спољњег магнетног поља, имобилизат је одвојен од супстрата и испитана му је активност по поступку описаном под 3.2.5.

3.2.7.4. Испитивање оптималне температуре имобилизације

Оптимална температура имобилизације ензимског препарата Termamyl на честицама MAG-PANI испитивана је у опсегу од 30 до 70°C. Мешано је по 50 mgMAG-PANI са по 5 cm³ раствора ензимског препарата Termamyl (концентрације 3 mgcm⁻³) у 40 mM фосфатном пуферу рН 6,9 (претходно инкубираног на одређеној температури). Мешање реакционе смеше извођено је при константној брзини од 250 o/min. Након имобилизације под дејством спољњег магнетног поља имобилизат је одвојен од супстрата и испитана му је активност по поступку описаном под 3.2.5.

3.2.7.5. Испитивање утицаја CaCl₂ на имобилизацију α-амилазе

Испитана је имобилизација ензимског препарата Termamyl на MAG и MAG-PANI у две серије експеримената. Имобилено је по 50 mg носача са 5 cm³ раствора ензимског препарата Termamyl у 40 mM фосфатном пуферу рН 6,9 на 30°C 60 min. Имобиленација је извођена уз константно мешање од 250 o/min у орбиталном шејкеру (IKA, Немачка) одржавањем константне температуре у инкубатору (Termo 120 DEMA, Pirska Bistrica, Словенија). У пуферном раствору Termamyl-а налазило се 5 mM CaCl₂. Након имобилизације дејством спољњег магнетног поља, имобилизат је одвајан од супернатанта и испитана му је активност, а у супернатанту је одређиван садржај протеина. Имобиленан ензим испиран је 3 пута са по 5 cm³ фосфатног пуфера рН 6,9, а раствори од испирања такође су остављани за одређивање садржаја протеина. С обзиром на то да је у систем увођен CaCl₂ за одређивање протеина, конструисана је нова калибрациона крива за α-амилазу у присуству CaCl₂.

3.2.8. Стабилност имобилисане алфа-амилазе

3.2.8.1. Десорпција α -амилазе под дејством NaCl и Triton X100

Извршене су две паралелне серије експеримената: 1. имобилизат код кога је испитан утицај додатка NaCl на десорпцију и 2. имобилизат код кога је испитан утицај додатка Triton X100 на десорпцију. Имобилизација α -амилазе и у првој и другој серији вршена је засебно на два носача: MAG и MAG-PANI. Имобилизација је извођена под следћим условима: одмеравано је по 100 mg носача са 10 cm³ раствора ензима у дестилованој води (концентрације 5 mgcm⁻³), 1 h на 25°C у орбиталном шејкеру при 250 omin⁻¹. Након имобилизације имобилизат је испиран три пута са по 5 cm³ дестиловане воде, након чега је суспендован : у 4 cm³ раствора NaCl код прве серије експеримената и у 4 cm³ раствора Triton X100 код друге серије експеримената.

3.2.8.2. Испитивање pH стабилности имобилисане алфа-амилазе

Испитивање стабилности имобилисане α -амилазе на честицама MAG и MAG-PANI у опсегу од pH 6,2 до pH 8,0 вршено је при константној температури од 25°C. Раствор скроба припреман у 40 mM фосфатном пуферу одређене pH вредности термостатиран је на 25°C. Имобилизати масе по 0,05 g/0,1 cm³ слободног ензима мешани су са по 5,5 cm³ раствора супстрата који је садржао 2,5 cm³ 40 mM фосфатног пуфера и 3 cm³ 2%-ног раствора скроба. Активност имобилисаног и слободног ензима одређивана је по поступку описаном под 3.2.5. Вредност pH на којој је ензим испољио максималну активност узета је као референтна (100%), а у односу на њу изражаване су остале активности.

3.2.8.3. Испитивање термичке стабилности имобилисане алфа-амилазе

Термичка стабилност имобилизата MAG-A и MAG-PANI-A испитана је у опсегу температура од 30 до 70°C уз одржавање константне pH 6,9. Имобилизати масе по 0,05 g мешани су са по 5,5 cm³ раствора супстрата који је садржао 2,5 cm³ 40 mM фосфатног пуфера pH 6,9 и 3 cm³ 2%-ног раствора скроба (претходно припремљеног са 40 mM фосфатним

пуфером рН 6,9). Вредност температуре на којој је ензим испољио максималну активност узета је као референтна (100 %) за израчунавање преостале активности. Активност имобилисаног и слободног ензима одређивана је по поступку описаном под 3.2.5.

3.2.8.4. Испитивање утицаја ултразвука на активност слободне и имобилисане алфа-амилазе

За испитивање дејства ултразвучних таласа на слободну и имобилисану α -амилазу реакциони суд са раствором супстрата који је чинио 3 cm³ 2%-ног раствора скроба и 2,5 cm³ 40 mM фосфатног пуфера рН 6,9 унет је у ултразвучно водено купатило (Bandelin Sonorex digitex, Немачка). Вршене су три серије експеримената: са слободном α -амилазом у трајању од 5 min и са имобилисаном α -амилазом на MAG и на MAG-PANI по 25 min. Активност имобилисаног и слободног ензима одређивана је по поступку описаном под 3.2.5.

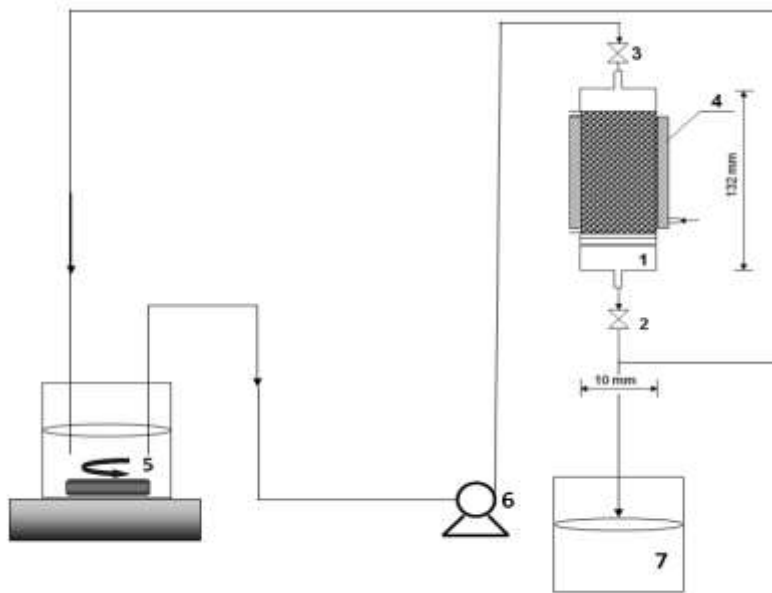
3.2.8.5. Испитивање оперативне стабилности имобилисане α -амилазе

Испитивање оперативне стабилности имобилисане α -амилазе вршено је у реакторуса пакованим слојем имобилизата на честицама MAG и MAG-PANI (< 90 μ m) са повратним током и у континуалним условима (Слика 3.6.). За испитивање утицаја величине честица носача на хидролизу скроба синтетисане честице MAG-PANI просејаване су на идентичан начин на који су издвајане четири фракције честица PANI.

Напајање реактора силазним током реакционе смеше (2% раствор скроба и фосфатног пуфера 40 mM, рН 6,9 у односу 1,2:1) вршило се перисталтичком пумпом при протоку од 6,8 cm³min⁻¹. У случају рада под континуалним условима у реактору са пакованим слојем без повратног тока, проток је износио 1 cm³min⁻¹. Време задржавања у реактору, τ израчунавано је на основу једначине:

$$\tau = \frac{V_r}{Q} \quad (7)$$

где је V_r - запремина реактора и Q - проток реакционе смеше.



Слика 3.6. Лабораторијски биореактор: фотографија биореакторског система (горе); Шематски приказ експерименталног система за ензимску хидролизу скроба у реактору са пакованим слојем: 1- реактор са пакованим слојем; 2 и 3- вентили; 4- дупликатор кроз који циркулише вода за одржавање температуре у реактору, 5- резервоар са раствором супстрата; 6- перисталтичка пумпа; 7- резервоар за производ код континуалног процеса без повратног тока (доле).

Раствор супстрата се у резервоару одржавао на 25°C и константно мешао на магнетној мешалици при 300 o/min. Коришћен је имобилизат претходно добијен мешањем 0,82 g носача и 55 mg ензима, након чега је испран 3 пута са по 5 cm³ 40 m M фосфатног пуфера рН 6,9. Имобилизат је чуван у фосфатном пуферу на 4°C, а непосредно пре експеримента је профилиран и осушен у вакуум сушници на 30°C 30 минута. У случају реактора са повратним током, циркулисао је раствор супстрата запремине 45,2 cm³ на 25 °C. Након потпуне хидролизе скроба у једном циклусу, реакција је заустављена и вршена је замена реакционе смеше са свежим супстратом. У случају континуалног извођења процеса у истом реактору, али без повратног тока, непрекидно је довођен раствор супстрата исте концентрације (2% раствор скроба и фосфатног пуфера 40 mM, рН 6,9 у односу 1,2:1). Од момента првог проласка супстрата кроз колону у правилним временским интервалима узимани су аликвоти од по 0,1cm³ (за одређивање активности имобилизата).

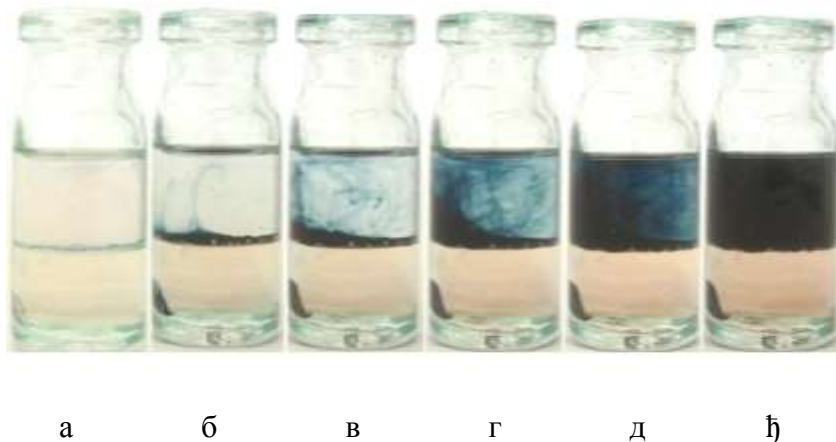
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Синтеза и карактеризација честица носача

Синтеза полианилина извршена је хемијском методом на граници двофазног система вода/хлороформ. Од добијеног полианилина издвојене су четири фракције за испитивање утицаја величине честица на имобилизацију α -амилазе. Магнетне честице синтетисане су методом копреципитације, а затим су пресвучене полианилином полимеризацијом анилина *in situ* на магнетним честицама. Синтетисане честице носача MAG и MAG-PANI карактерисане су помоћу различитих инструменталних техника како би се што боље објаснила врста успостављених интеракција носач-ензим и предвидело понашање хетерогеног биокатализаторског система у биореакторима. Испитана је морфологија, магнетна својства, IR спектри, расподела величине честица и зета потенцијала.

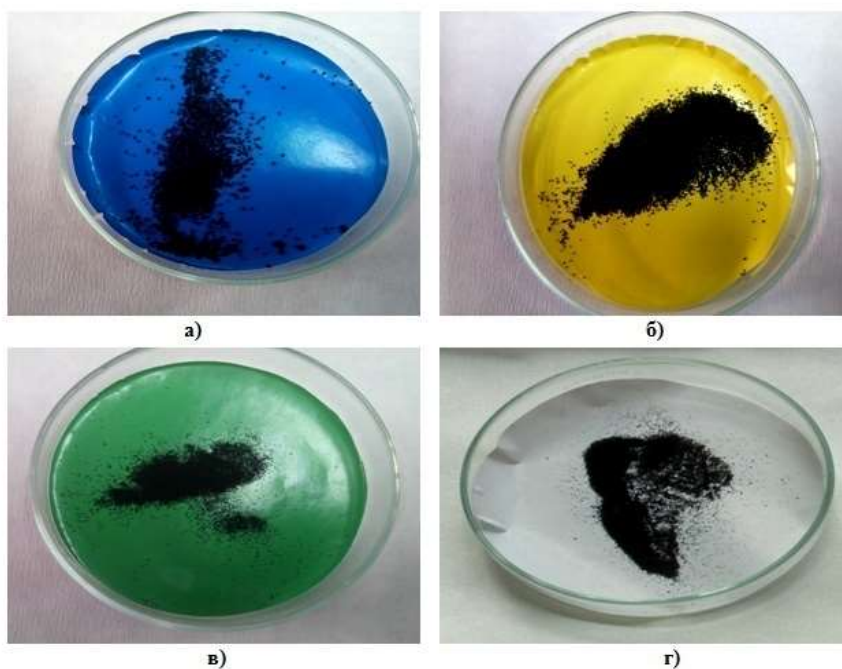
4.1.1. Синтеза полианилина на граници двофазног система

Хемијском полимеризацијом анилина на граници двофазног система (описано у 3.2.1.1) добијене су честице полианилина (PANI). Пажљивим додатком водене фазе на органску фазу идентичне запремине ствара се гранични слој вода/органски растварач (Слика 4.1).



Слика 4.1. Синтеза полианилина у двофазном систему вода/хлороформ након:
а) успостављеног контакта две фазе, б) 30 s, в) 60 s г) 75 s д) 120 s и њ) 180 s

Након кратког индукционог времена, око 30 s, јавља се зелени полианилин на граници две фазе који прелази у водену фазу. Напредовањем реакције боја органске фазе постаје наранџасто-црвена, услед формирања олигомера анилина, и након 3 минута се не мења, што указује на завршетак реакције. Након сушења издвојене су четири фракције честица микрометарских димензија (Слика 4.2). Описани поступак синтезе PANI [76] омогућава добијање честица нано димензија (Слика 2.10).

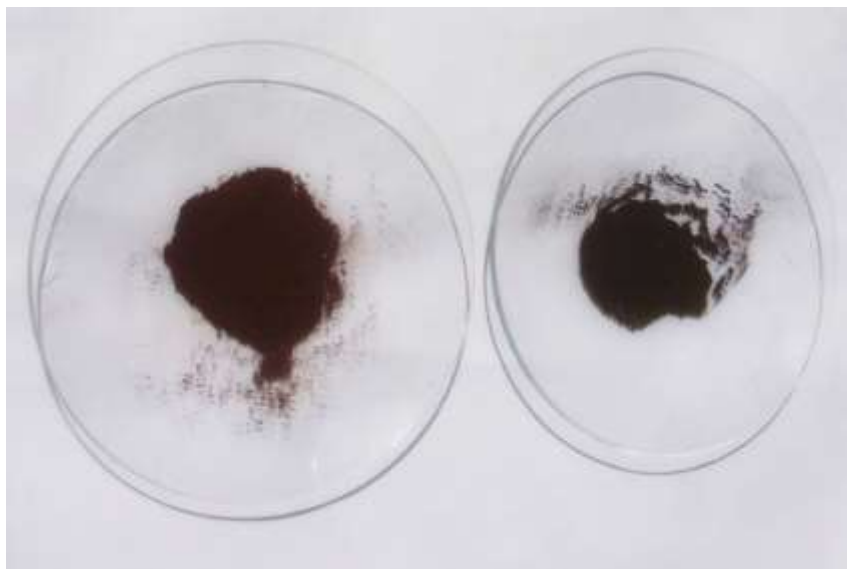


Слика 4.2. Фракције честица полианилина: а) 500-800 μm б) 315-500 μm
в) 160-315 μm г) 90-160 μm

Додатни третман агломерата наночестица (3.2.1.1) спроведен је ради добијања различитих фракција PANI микрометарских димензија које су употребљене за имобилизацију α -амилазе и анализу утицаја величине честица носача на хидролизу скроба.

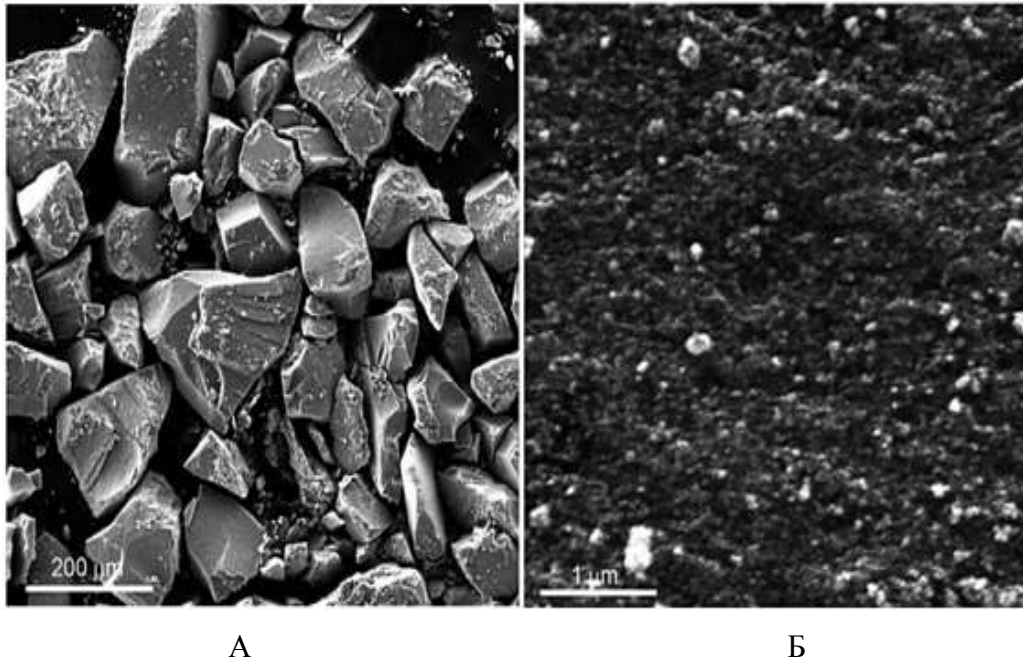
4.1.2. Морфологија MAG и MAG-PANI

Хемијском коопреципитацијом FeCl_3 и FeSO_4 у алкалној средини на повишеној температури (описано у 3.2.1.3) добијене су магнетне честице (MAG) браон боје (Слика 4.3, лево). Потапањем добијених магнетних честица у кисели раствор анилина, извршена је полимеризација анилина на магнетним честицама (MAG-PANI), а боја добијених честица је тамно браон, готово црне, услед формирање полианилинске превлаке (Слика 4.3., десно).



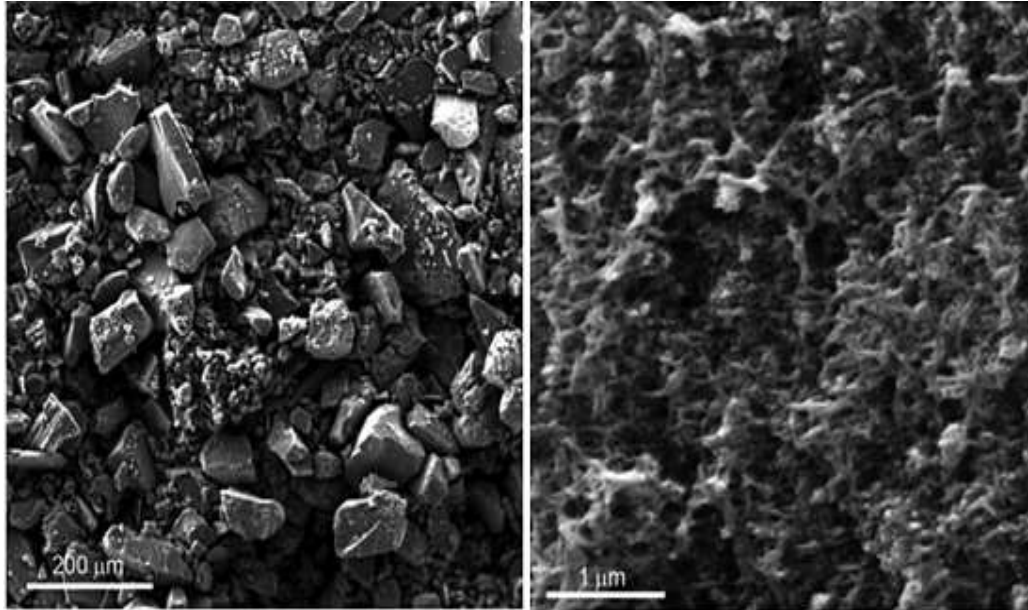
Слика 4.3. Прах MAG (лево) и MAG-PANI (десно)

Синтетисане MAG честице су хетерогеног облика (Слика 4.4., А) и представљају агломерате наночестица мањих од 100 nm (Слика 4.4, Б). Сличне микрографије презентовали су Neri и сарадници [86] (Слика 2.12) вршећи коопреципитацију мешањем 0,6 M раствора FeCl_2 и 1,1 M раствора FeCl_3 (1:1), уз додавање NH_4OH у реакциону смешу до постизања pH 11,0, 30 min на 100°C.



Слика 4.4. FESEM микрографије MAG честица: микрочестице (А) и агломерати наночестица (Б)

Микрографије MAG-PANI добијених полимеризацијом анилина на површини MAG честица приказане су на Слици 4.5. Neri и сардници наводе да полимеризација анилина *in situ* на магнетним честицама не утиче значајно на њихову морфологију [86]. Међутим на основу микрографија наноструктуре (Слика 4.4.Б и 4.5.Б) јасан је утицај полианилинске превлаке на измену морфологије магнетних честица. Уочава се фина влакнаста структура PANI која потпуно прекрива површину MAG.



А

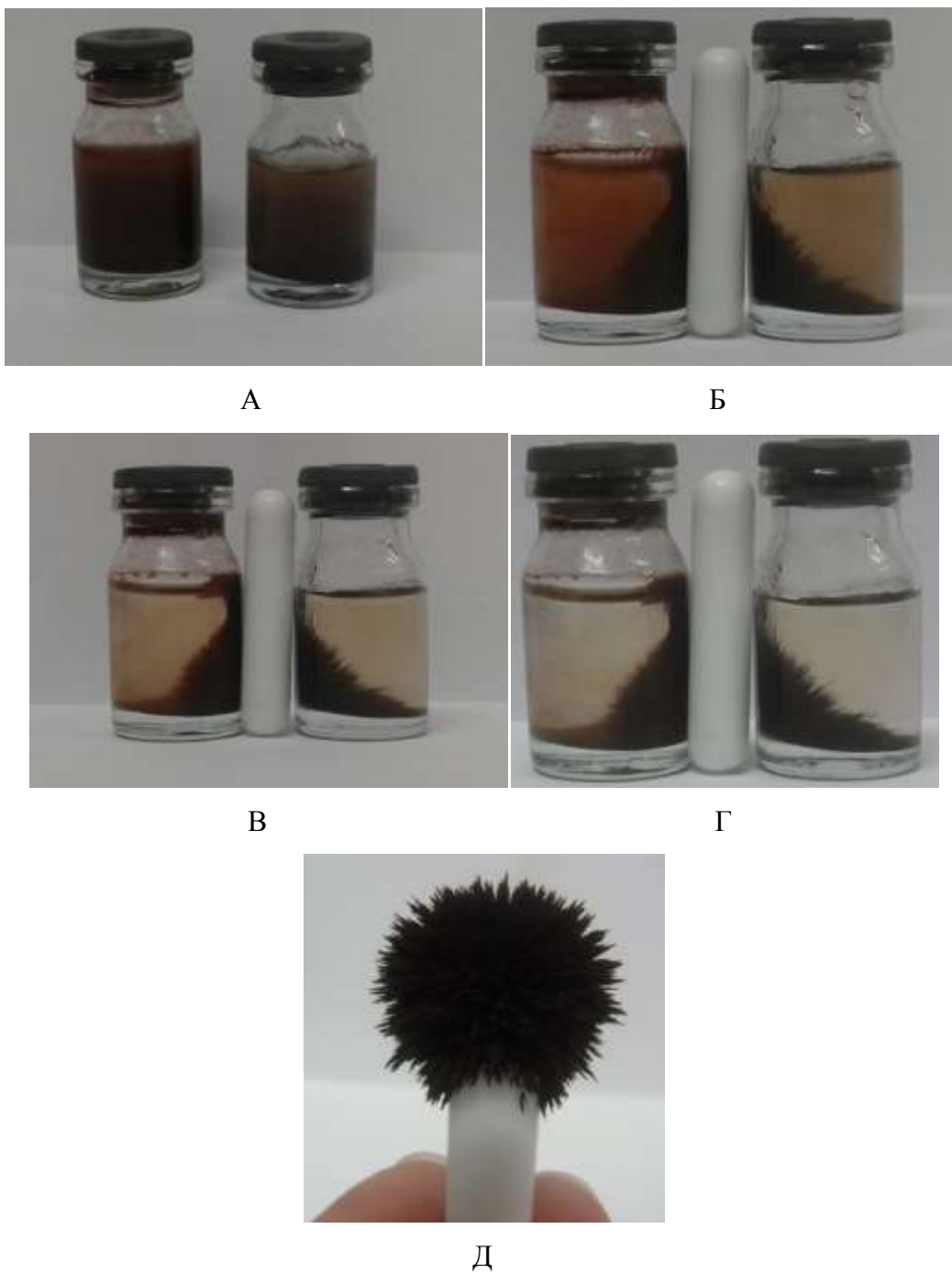
Б

4.5. FESEM микрографије MAG-PANI честица: микрочестице (А) и (Б) површина магнетних честица прекривена полианилином

Претпоставља се да овако формирана полианилинска превлака ствара „меку“ подлогу погодну за везивање ензима.

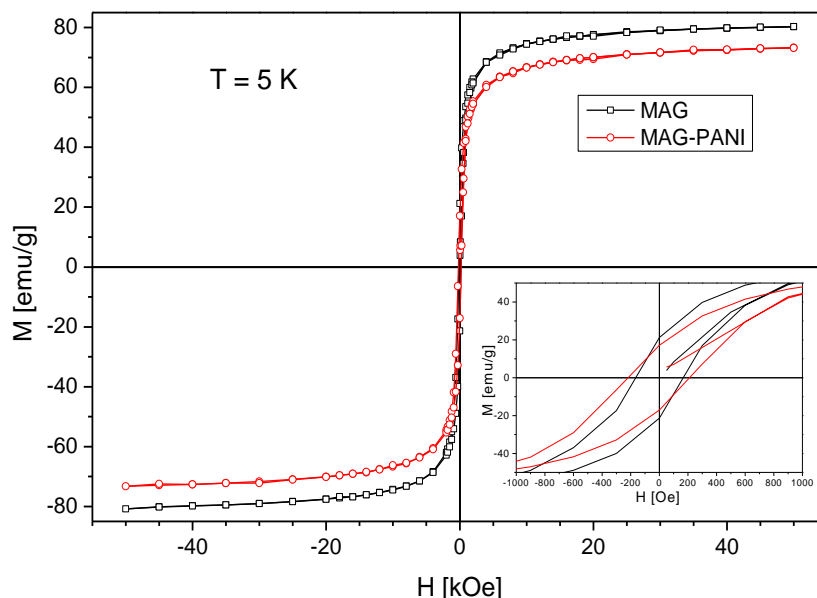
4.1.3. Магнетна својства MAG и MAG-PANI

Синтетисане честице MAG и MAG-PANI издвајају се из реакционе смеше под дејством спољашњег магнетног поља, што указује да имају магнетна својства (Слика 4.6).



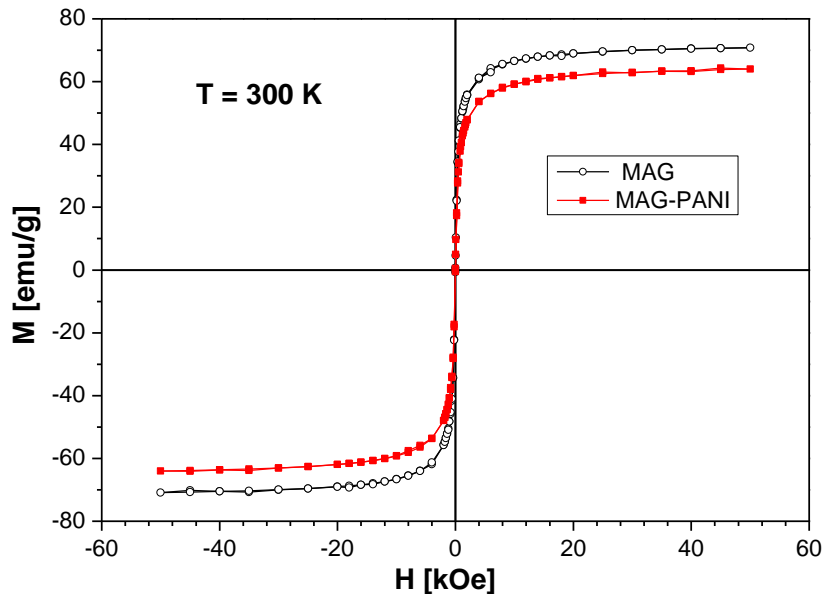
Слика 4.6. Деловање спољашњег магнетног поља на суспензију MAG (леви узорак) и MAG-PANI (десни узорак) у 40 mM фосфатном пуферу pH 6,9 : А.суспензије честица у одсуству магнетног поља, Б. након 2 min, Б. након 10 min и В. након 15 min, Д. издвојене MAG-PANI честице

Хистерезис крива за MAG и MAG-PANI снимљена је у опсегу магнетног поља од -5 до 5 Т (Слика 4.7). Постигнуто је zasiћење од 79 emu/g за MAG и 70 emu/g MAG-PANI. Смањење магнетног zasiћења за MAG-PANI у односу на MAG узроковано је увођењем немагнетног додатног PANI омотача. Такође, ниска коерцитивна вредност указује на суперпарамагнетизам. Sim и сар. [87] који су показали да је магнетна сатурација Fe3O4 64 emu/g, а Fe3O4@PANI 38 emu/g.



Слика 4.7. Хистерезисна крива MAG и MAG-PANI на 5 К

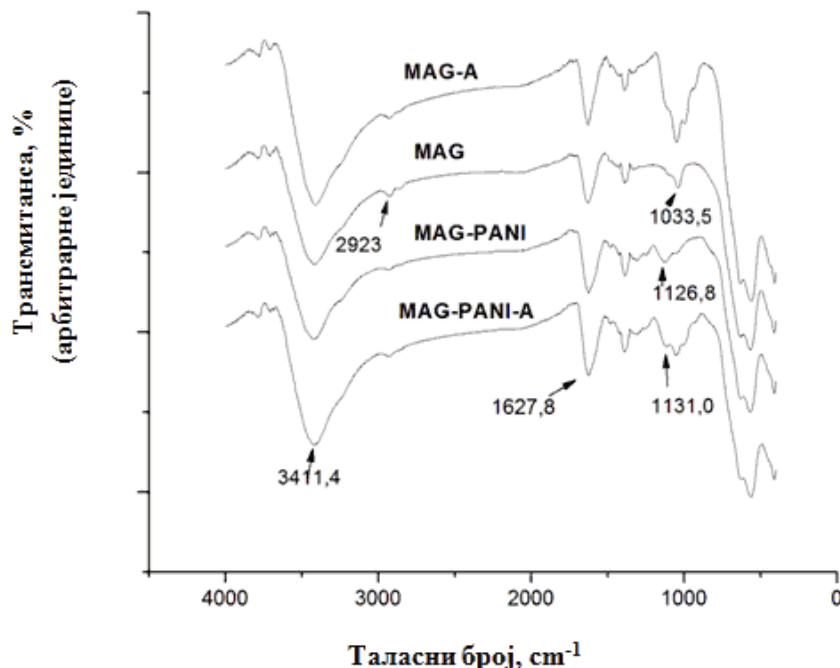
Хистерезисна петља добијена при константној температури од 300 К приказана је на Слици 4.8.



Слика 4.8. Хистерезисна крива MAG и MAG-PANI на 300 K

4.1.4. Анализа MAG и MAG-PANI инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовим трансформацијама

Интеракција полианилина са MAG честицама и α -амилазе са MAG и са MAG-PANI испитана је FTIR спектроскопијом у области од 400 до 4000 cm^{-1} (Слика 4.9.). Због лакше анализе сви FTIR спектри приказани су заједно, а на овом месту биће продискутовани пикови спектра носача MAG и MAG-PANI и имобилисане алфа-амилазе који су од интереса за разумевање разика између два носача.



Слика 4.9. FTIR спектри: имобилисане α -амилазе на магнетним честицама (MAG-A), магнетних честица (MAG), магнетних честица са полианилинском превлаком (MAG-PANI) и имобилисане α -амилазе на магнетним честицама са полианилинском превлаком (MAG-PANI-A)

Пик на 560 cm^{-1} код сва четири спектра је вероватно настао услед вибрације Fe–O везе [130]. Поређењем спектра MAG и MAG-PANI уочавају се пикови у области од ~ 930 до $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$, где се иначе јављају пикови карактеристични за полианилин. Код MAG је присутан пик на $1033,5\text{ cm}^{-1}$ који је померен код MAG-PANI на $1126,8\text{ cm}^{-1}$ и измењеног је облика. Пик на $1126,8\text{ cm}^{-1}$ може се приписати вибрацијама N=Q=N (где Q представља прстен хиноидног типа) [131]. Постојање наведеног пика може указати да је полианилин у форми емералдин соли која има високу проводљивост [132]. Пик на $1248,37\text{ cm}^{-1}$ приписује се C–N истежању бензеноидног прстена.

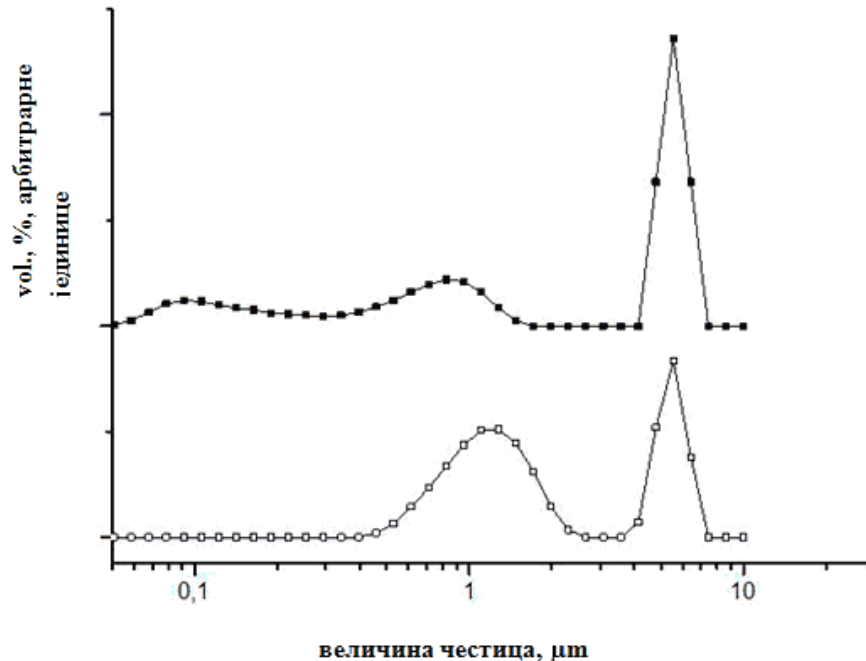
Овај пик присутан је и на спектру MAG-PANI-A и мало је померен ($1241,83\text{ cm}^{-1}$), а није присутан код MAG и MAG-A, па се може закључити да потиче само од полианилина. Пик који се јавља код MAG на 2923 cm^{-1} постаје мањег интензитета на спектру MAG-PANI. Наведене разлике спектра доказују структурне промене узроковане

полимеризацијом анилина на магнетним честицама. Пикови изражених интензитета на ~ 3414 и $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$ потичу од вибрација истезања и савијања О-Н везе заостале воде у узорцима [133]. Такође, може се уочити да је дошло до измене FTIR спектра након везивања α -амилазе нарочито у области од ~ 900 до $1300,0 \text{ cm}^{-1}$.

Поређењем спектра MAG-A (имобилисана алфа-амилаза на магнетним честицама) и MAG јасна је промена спектра у области од ~ 900 до $1300,0 \text{ cm}^{-1}$. Код имобилисаног ензима, MAG-A присутан је истакнут појас са неколико мањих пикова, који потиче од присуства α -амилазе. Приметна је сличност овог дела спектра MAG-A и MAG-PANI-A (имобилисана α -амилаза на магнетним честицама пресвученим полианилином) с тим што је појас од ~ 990 до $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ код MAG-PANI-A шири и деформисан у односу на спектар MAG-A. Пикови наведене области су мањег интензитета код MAG-PANI-A у односу на MAG-A, осим пика на $1131,0 \text{ cm}^{-1}$ који је израженији код MAG-PANI-A. На основу наведених промена спектра имобилизата у односу на носач, може се закључити да је дошло до интеракције α -амилазе са MAG, као и са MAG-PANI.

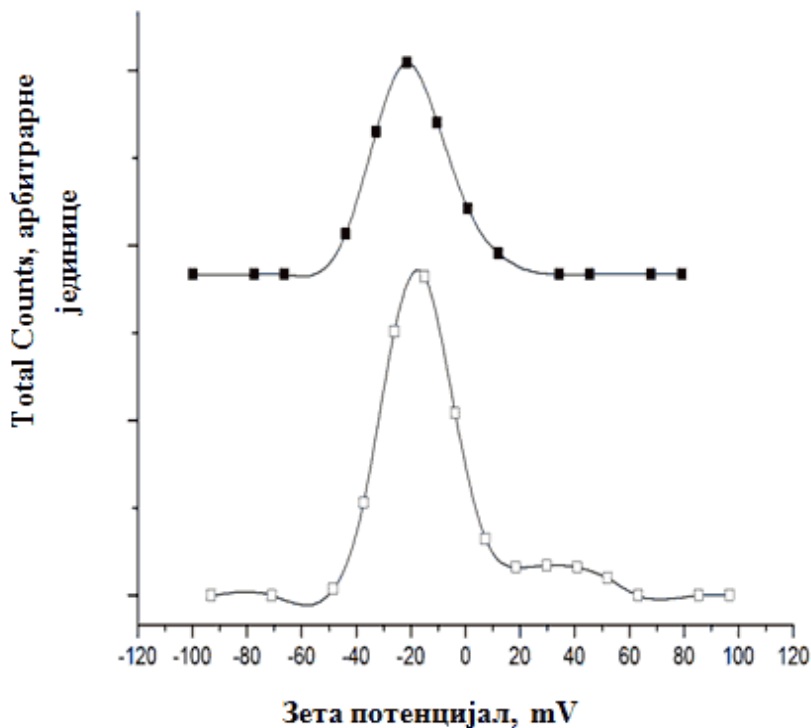
4.1.5. Расподела величине честица и зета потенцијал MAG и MAG-PANI

На основу расподеле димензија честица MAG и MAG-PANI по запремини (Слика 4.10.) може се закључити да су обе врсте честица микрочестице. Код MAG честица присутна је бимодална расподела са униформнијом расподелом крупнијих честица (око $6 \mu\text{m}$) и мањом униформношћу честица око $1 \mu\text{m}$. Честице MAG-PANI карактерише тримодална расподела димензија честица: најдоминантнији су агломерати од око $5 \mu\text{m}$, док честице од око $1 \mu\text{m}$ и $0,1 \mu\text{m}$ заузимају знатно мању запремину. Тримодална расподела и појава честица око $0,1 \mu\text{m}$ може бити узрокована честицама полианилина које су настале независно од магнетних честица. График потврђује FESEM микрографије на основу којих је закључено да су MAG и MAG-PANI микрочестице (агломерати наночестица). MAG микрочестице величине од $10\text{-}100 \mu\text{m}$ су добијене у поступцима синтезе уз NH_4OH [58]. Показано је да употреба NaOH уместо NH_4OH смањује агломерацију и води стварању честица знатно мањих димензија око 15 nm [62]



Слика 4.10. Расподела величине магнетних честица MAG (□) и магнетних честица пресвучених полианилином MAG-PANI(■)

Зета потенцијал је један од показатеља стабилности честица нано димензија. Међутим, код микрочестица првенствено нам пружа неопходне информације о површинском наелектрису честица. Највећи број MAG и MAG-PANI честица има негативне вредности зета потенцијала (Слика 4.11.). Померање максимума са $-14,9$ mV за MAG ка негативнијој вредности $-21,5$ mV за MAG-PANI указује да полианилинска превлака доприноси стабилизацији честица. Повећањем апсолутне вредности зета потенцијала одбојне интеракције међу честицама расту. Као резултат настају стабилније честице униформније расподеле. Мањи број честица MAG-PANI има позитиван зета потенцијал од $+20$ до $+60$ mV.



Слика 4.11. Расподела зета потенцијала магнетних честица MAG (□) и магнетних честица са полианилинском превлаком MAG-PANI (■), pH 7,0

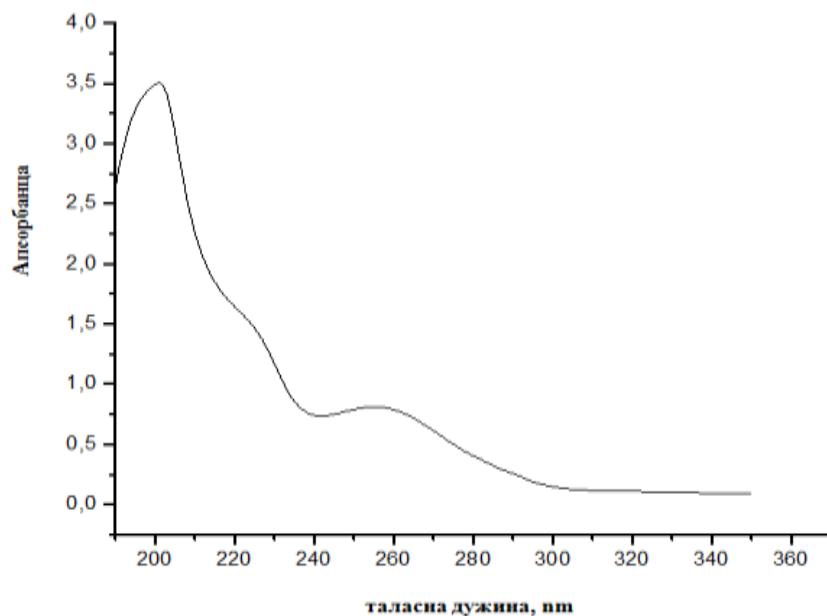
4.2. Карактеризација ензимског препарата α -амилазе Termamyl

Имобилизација α -амилазе из ензимског раствора са стабилизаторима додатно усложњава посматрани хетерогени систем носач-ензим, јер свака од компоненти може утицати на својства имобилисаног катализатора. Карактеризација α -амилазе из ензимског препарата вршена је снимањем UV спектра, IR спектра, расподеле величине честица и зета потенцијала.

4.2.1. UV спектар ензимског препарата α -амилазе Termamyl

Алфа-амилаза, као и многи други биолошки макромолекули у пречишћеном стању постаје нестабилна, губи структурни интегритет и активност. Увођење полихидроксилних алкохола и шећера у раствор α -амилазе доводи до њене стабилизације [134]. Заштитни ефекат зависи од концентрације стабилизатора по експоненцијалној

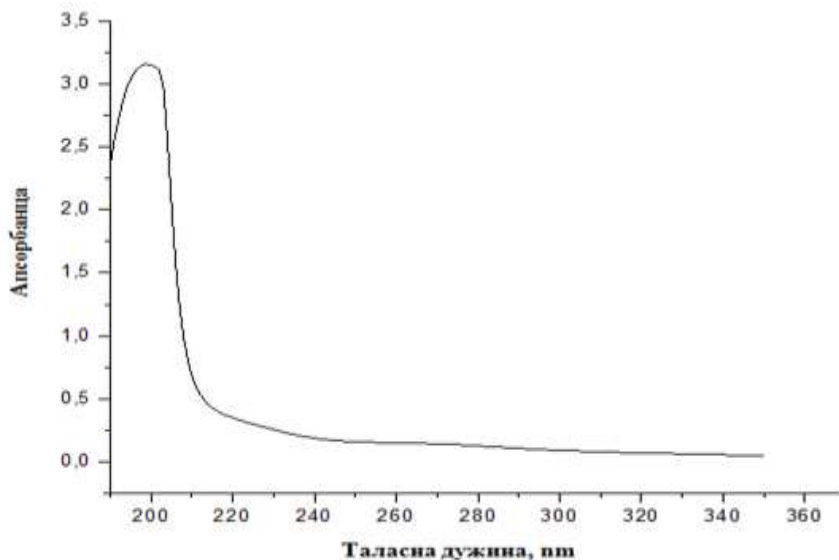
функцији [135]. Због тога се α -амилаза у комерцијалним препаратима налази у виду водених раствора са значајном концентрацијом неактивних компоненти. Термамул представља ензимски препарат 2%-ног воденог раствора α -амилазе. Поред α -амилазе као активне компоненте, присутне су и супстанце које стабилизују водени раствор ензима: сахароза (32%), NaCl (14%) и калијум-сорбат (0,2%). Познавање хемијског састава раствора ензима доприноси бољем разумевању спектра ензимског препарата. Вишекомпонентни Термамул интензивно је апсорбовао светлост на 255 nm у ближој и на 200 nm у даљој UV области (Слика 4.12.).



Слика 4.12. UV спектар ензимског преапарата α -амилазе Термамул, концентрације 1,4 mgcm^{-3} , pH 7,0 и на 25 °C

Водени раствор који садржи 32% сахарозе и 14% NaCl интензивно апсорбује у далекој UV области на 200 nm (Слика 4.13.). На истој таласној дужини јавља се и доминантан максимум протеина, последица $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза у пептидним везама. Иако су аутори показали да се садржај протеина може мерити и на 205 nm (200 nm је сувише блиско јаком апсорбовању кисеоника на 190 nm), у ензимском раствору Термамул апсорпција на овој таласној дужини не потиче само од α -амилазе. Поређењем спектра са Сликe 4.12. и са

Слике 4.13. може се закључити да пик на 255 nm потиче само од α -амилазе. Протеини апсорбују светлост у области од 230-300 nm као последица присутних ароматичних остатака триптофана, тирозина, фенилаланина и у мањој мери дисулфидних мостова.

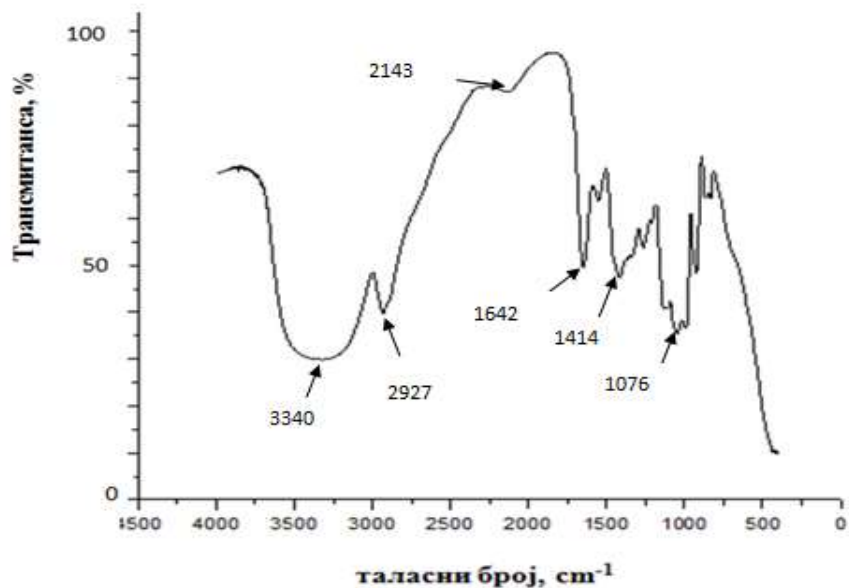


Слика 4.13. UV спектар воденог раствора који садржи 32% (w/v) сахарозе и 14% (w/v) NaCl

Максимум апсорпције добијеног спектра Termamyl-а на 255 nm коришћен је за квантитативна одређивања слободног и ензима заосталог у раствору након имобилизације (поступак описан под 3.2.6.2).

4.2.2. FTIR спектар ензимског препарата α -амилазе Termamyl

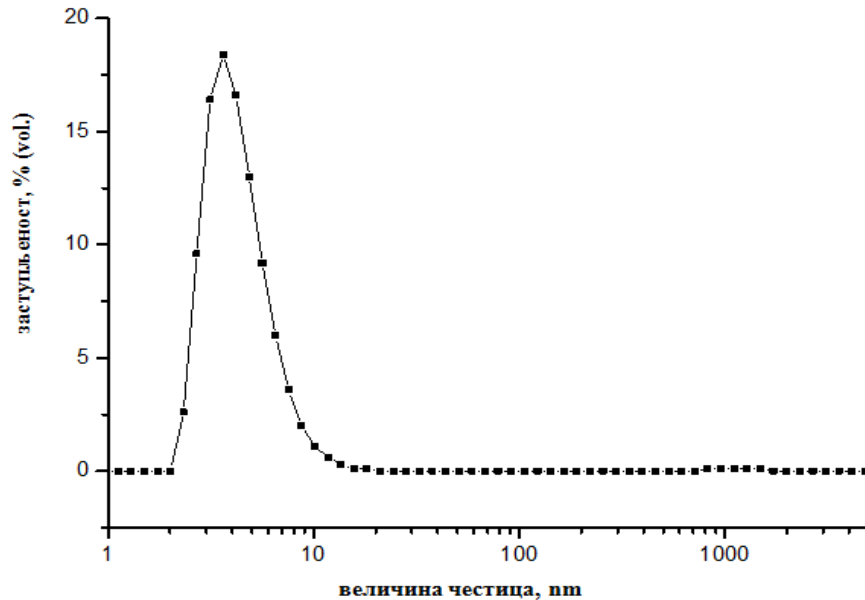
Због велике концентрације сахарозе и NaCl у ензимском препарату Termamyl добијени IR спектар не одговара у потпуности типичним спектрима за протеине (Слика 4.14.). Интензиван сигнал на 3340cm^{-1} и мањег пика на 2927cm^{-1} могуће да потиче и од атомских група и веза сахарозе и ензима. Област од 1500cm^{-1} ка мањим вредностима таласног броја је област карактеристичних пикова сахарозе што отежава уочавање пикова C-N истезања и N-H веза и амид IV-VI област спектра која карактерише протеине. У области до 1400cm^{-1} нема утицаја присуство NaCl у смеси.



Слика 4.14. FTIR спектар ензимског препарата Termatyl

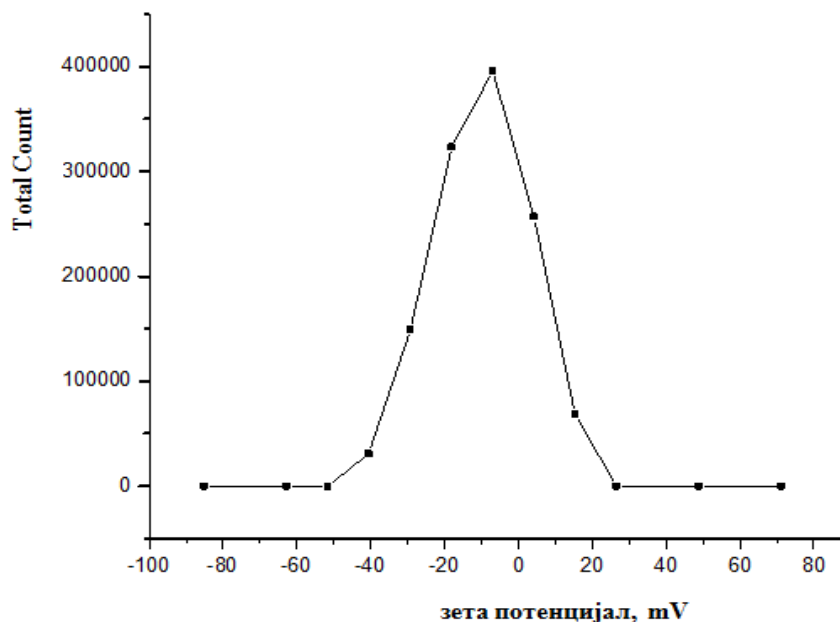
4.2.3. Расподела величине честица и зета потенцијал α -амилазе из ензимског препарата Termatyl

Расподела величине честица α -амилазе из Termatyl-a је очекивано униформна, 4 nm (Слика 4.15.). Минимални пречник протеина који имају молекулску масу око 50 kDa износи 2,4 nm, чија теорија претпоставља да се протеини налазе у виду сфере, као најједноставнијем облику [136]. Међутим, већина протеина је неправилног облика и због тога су им димензије веће од наведеног. Алфа-амилаза је мономер ензим са молекулском масом од 55,2 kDa.



Слика 4.15. Величина честица ензима α -амилазе из Termamyl

Зета потенцијал може бити дијагностички апарат у имобилизацији ензима, пошто нам омогућава да квантификујемо електростатичке интеракције између ензима и носача. Хемија површине биомолекула има велики утицај на процес адсорпције. За многе протеине селективна адсорпција приписана је електростатичким привлачењима између ензима и носача. Фактори као што су рН и концентрација електролита у раствору могу имати значајан утицај на јачину и врсту електростатичких наелектрисања на адсорбенту и захваљујући томе могу се под различитим условима десити различите интеракције између протеина и носача. Зета потенцијал α -амилазе из ензимског препарата Termamyl износи -15 mV (Слика 4.16.). Добијени резултат доприноси бољем разумевању успостављених интеракција између ензима и носача током имобилизације ензима. Поређењем зета потенцијала α -амилазе и честица носача указује да ће под наведеним условима (рН 7,0) бити отежане електростатичке интеракције међу молекулима, због истоветног наелектрисања. Електростатичке интеракције се наводе као доминантне у адсорпцији ензима на површини носача [137]. Показано је да се више ензима адсорбује на честицама различито наелектрисаним у односу на ензим [138].



Слика 4.16. Расподела зета потенцијала α -амилазе из Termamyl-a, мерено на рН 7

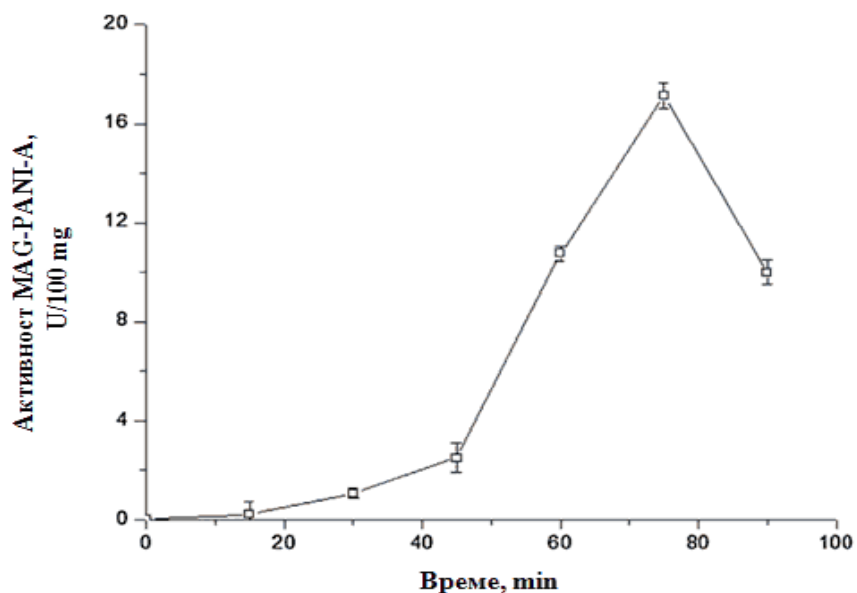
Међутим, група истраживача [139] је утврдила да се протеини адсорбују и на честице носача са истоврсним наелектрисањем. Понекад наелектрисане честице могу да се адсорбују на хидрофилне површине са истим наелектрисањем чак иако је реакција везивања ендотермна [51]. Покретачка сила у оваквим случајевима је пораст ентропије услед конформационих промена протеина који резултује губитком секундарне структуре.

4.3. Имобилизација α -амилазе

Имобилизација α -амилазе на честицама носача магнетних својстава као што су MAG и MAG-PANI један је од начина добијања биокатализаторског система који се лако издваја из реакционог медијума и може да се употребљава виšekратно у шаржној или дуготрајно у континуалној хидролизи скроба. Адсорпцијом ензима из вишекомпонентног раствора као што је Termamyl на магнетним честицама и магнетним честицама са полианилинском превлаком добија се веома комплексан биокатализаторски систем. Потребно је имати у виду да се током хидролизе у систему налази велики број компоненти (ензим, носач, супстрат, различити катјони и анјони Termamyl ензимског препарата, пуфера итд.). Промена само једне од компоненти може изазвати промене у систему као целини.

4.3.1. Утицај времена имобилизације на активност имобилисане α -амилазе

Активност имобилисаног ензима у почетку расте са временом имобилизације, а затим опада од 75-ог до 90-ог минута. Максимална релативна активност имобилизата постигнута је када су имобилизати добијени у 75-ом минути адсорпције (Слика 4.17.). Пад ензимске активности након имобилизације дуже од 75 мин може бити узрокован непродуктивним везивањем α -амилазе за честице носача, услед формирања више слојева или због ирверзибилних конформационих промена ензима у току времена.

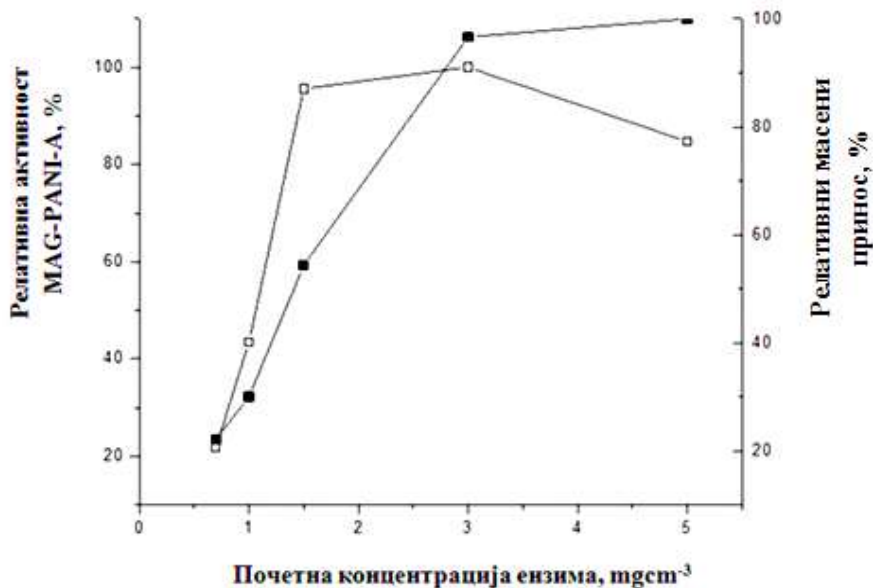


Слика 4.17. Временски ток адсорпције α -амилазе на магнетне честице пресвучене полианилином. Услови имобилизације: почетна концентрација ензима 3 mg cm^{-3} у 40 mM фосфатном пуферу, $\text{pH} 6,9$ на 25°C

Током адсорпције може доћи до формирања вишеслојева ензима на честицама носача услед чега су доњи слојеви недоступни супстрату што узрокује смањење активности ензима. Због тога се као оптимално време имобилизације узима време при коме је постигнута максимална активност имобилизата, а не максимална маса адсорбованог ензима.

4.3.2. Утицај почетне концентрације на масени принос α -амилазе и релативну активност имобилизата

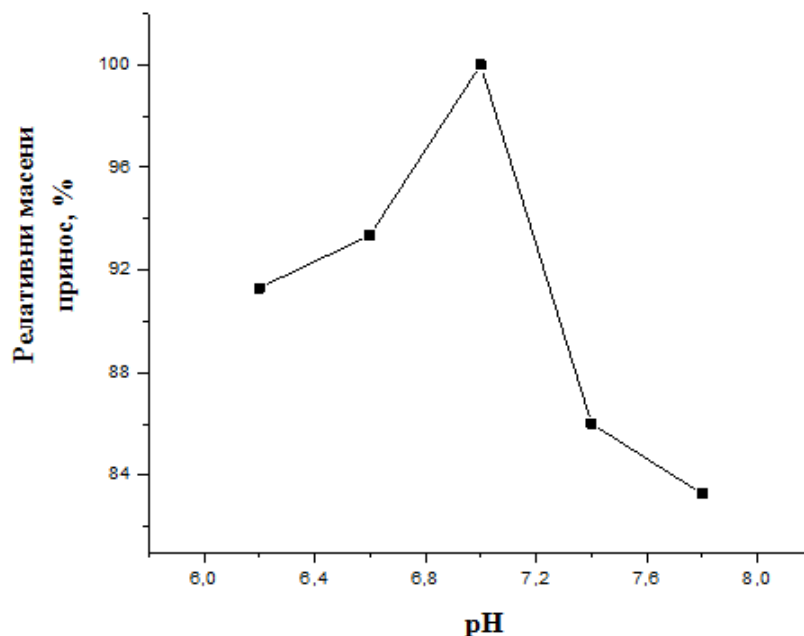
За утврђивање оптималне почетне концентрације ензима праћена је маса везаног ензима, али и активност добијеног имобилизата (Слика 4.18). Испитивањем утицаја почетне концентрације ензима на адсорпцију, установљено је да се при почетној концентрацији ензима од 5 mgcm^{-3} постиже максимална количина везаног ензима од $10 \text{ mg}/100 \text{ mg}$ носача. Међутим, имобилизат који је добијен имобилизацијом α -амилазе са почетном концентрацијом ензима од 3 mgcm^{-3} показује максималну активност. Даљим повећањем масе везаног ензима, активност се смањује највероватније услед формирања више слојева током процеса адсорпције на површини носача, при чему стерне сметње утичу на активност имобилизата.



Слика 4.18. Зависност релативне активности имобилизата (\square) и масеног приноса α -амилазе (\blacksquare) од почетне концентрације ензима

4.3.3. Утицај рН на масу адсорбованог ензима

Утицај рН на количину адсорбоване амилазе приказан је на Слици 4.19. Јасно је да адсорпција α -амилазе на магнетним честицама пресвученим полианилином веома зависи од рН, тиме указујући да јонске везе могу имати важну улогу током адсорпције. Познато је да јонска имобилизација веома зависи од рН и концентрације соли. Међутим, ови резултати нису у сагласности са резултатима зета потенцијала ензима и честица MAG-PANI, за које је утврђено да су истоврсног наелектрисања. Мањи број честица MAG-PANI има позитиван зета потенцијал од +20 до + 60 mV, тако да је у тим случајевима могуће јонско везивање. Максимална количина везаног ензима постиже се при рН 7,0, што је блиско изоелектричној тачки (pI) амилазе (6,8-7,2), док се адсорпциони капацитет брзо смањује изван ове рН вредности.

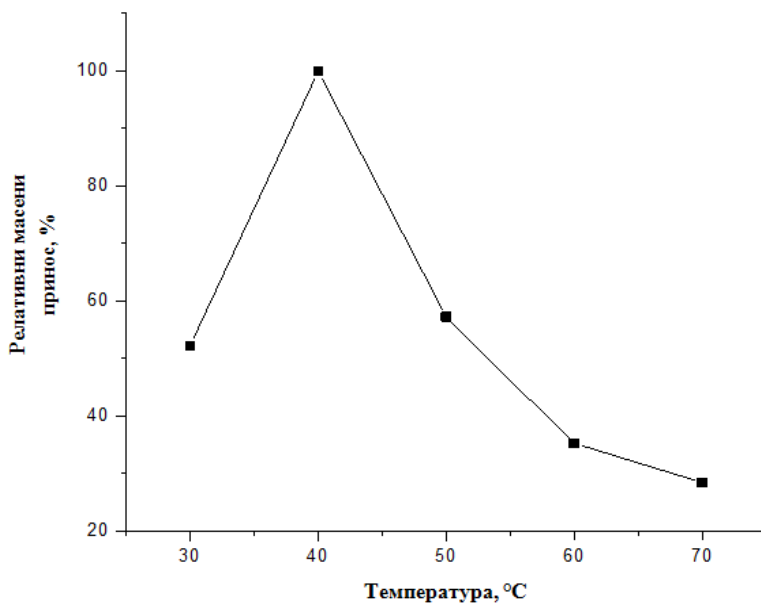


Слика 4.19. Утицај рН на релативни масени принос α -амилазе. Услови имобилизације: $\tau=1\text{h}$, почетна концентрација ензима 3 mg cm^{-3} , 100 mg магнетних честица пресвучених полианилином у 10 cm^3 фосфатног пуфера (40mM, 25°C).

На основу резултата, јасно је да је адсорпција α -амилазе на магнетним честицама пресвученим полианилином неспецифичан процес, подстакнут различитим интеракцијама између ензима и носача. Због тога, водоничне везе, Ван дер Валсове, хидрофобне, и друге силе могу имати велики удео у везивању ензима за магнетне микрочестице пресвучене полианилином.

4.3.4. Утицај температуре на масу имобилисане α -амилазе

Утицај температуре на адсорпцију α -амилазе испитиван је у осегу од 30 до 70°C (Слика 4.20.). Оптимална температура била је 40°C јер је при овој температури постигнут највећи релативни принос масе α -амилазе на MAG-PANI.



Слика 4.20. Утицај температуре на релативни масени принос α -амилазе.

Услови имобилизације: $\tau=1\text{h}$, почетна концентрација ензима 3 mg cm^{-3} , 100 mg магнетних честица пресвучених полианилином у 10 cm^3 фосфатног пуфера (40mM, pH 6,9)

4.3.5. Параметри Ленгмирове (Langmuir) и Фројндлихове (Freundlich) адсорпционе изотерме

Са циљем да се добијени експериментални резултати боље разумеју, на добијене експерименталне податаке примењена су два модела адсорпције базирана на различитим механизмима: Ленгмиров и Фројндлихов модел адсорпције.

Вредности параметара адсорпције (Q_{\max} , b , K , n) дате су у Табели 1. Ленгмиров коефицијент, капацитет адсорпције, Q_{\max} износи 55,56/100 mg носача, док је капацитет адсорпције по Фројндлиховом моделу $K= 8,88/100$ mg носача. Ово указује да се значајно већа маса ензима може везати у мономолекулском слоју на MAG-PANI честице и да је капацитет носача већи по Ленгмировом моделу. Вредност $1/n$ показатељ је површинске хетерогености носача и може се кретати од 0 до 1, с тим што је адсорпција више хетерогена што је вредност ближа 0.

Ленгмиров модел ($R^2=0,963$) показује боље слагање са експерименталним резултатима и боље описују ситем од Фројндлиховог модела ($R^2=0,899$).

Табела 1. Параметри Ленгмирове и Фројндлихове адсорпционе изотерме

Параметри Ленгмирове изотерме			Параметри Фројндлихове изотерме		
Q_{\max} (mg ензима/100 mg носача)	b (mL/mg)	R^2	K (mg ензима/100 mg носача)	N	R^2
55,56	0,234	0,963	8,88	1,37	0,899

Ленгмиров модел адсорпције претпоставља да су молекули ензима адсорбовани за фиксни број јасно дефинисаних места на површини носача, од којих свако веже само по један молекул и да нема интеракције међу адсорбованим молекулима амилазе у суседним регијама.

4.3.6. Утицај CaCl_2 на имобилизацију α -амилазе

Активности имобилизата MAG-A и MAG-PANI-A добијених имобилизацијом у присуству калцијум-хлорида веће су од активности истих имобилизата добијених имобилизацијом без калцијум-хлорида (Табела.2). Међутим, присуство калцијум-хлорида узроковао је мањи принос масе, посебно на честицама MAG, где је % приноса масе имобилисаног ензима износио скоро трећи део од % приноса масе ензима на истим честицама имобилисаног у одсуству калцијум-хлорида. На магнетним честицама са полианилинском превлаком везало се више ензима него на магнетним честицама. Активност MAG-PANI-A је добијеног у присуству Ca^{2+} јона је иста, а у одсуству истих јона и мања од активности MAG-A што може бити последица вишеслојне адсорпције α -амилазе и стерних сметњи прекривених слојева у катализи.

Табела 2. Утицај калцијум-хлорида на имобилизацију α -амилазе

	У присуству CaCl_2		Без CaCl_2	
	Активност, U/g носача	Принос масе, %	Активност U/g носача	Принос масе, %
MAG-A	1,17	1,4	1,12	4,7
MAG-PANI-A	1,17	6,7	0,97	8,4
Слободна α-амилаза	29,2 Ucm^{-3}		31,5 Ucm^{-3}	

Адсорбован ензим у присуству соли се десорбује, што може бити узрок мањег приноса масе у присуству калцијум-хлорида. Адсорпција је равнотежни процес у коме се успоставља равнотежа између адсорбованих и десорбованих молекула при чему на положај равнотеже свакако да утичу присутни јони. Међутим, јони калцијума имају још сложенији утицај јер је α -амилаза метало ензим у чији састав улазе јони Ca^{2+} . Супротно очекиваном, слободна α -амилаза показала је нижу активност у присуству Ca^{2+} јона. Јони Ca^{2+} повећавају активност имобилисане α -амилазе вероватно услед утицаја на конформациону стабилност домена А. Иако се мање ензима везало под утицајем

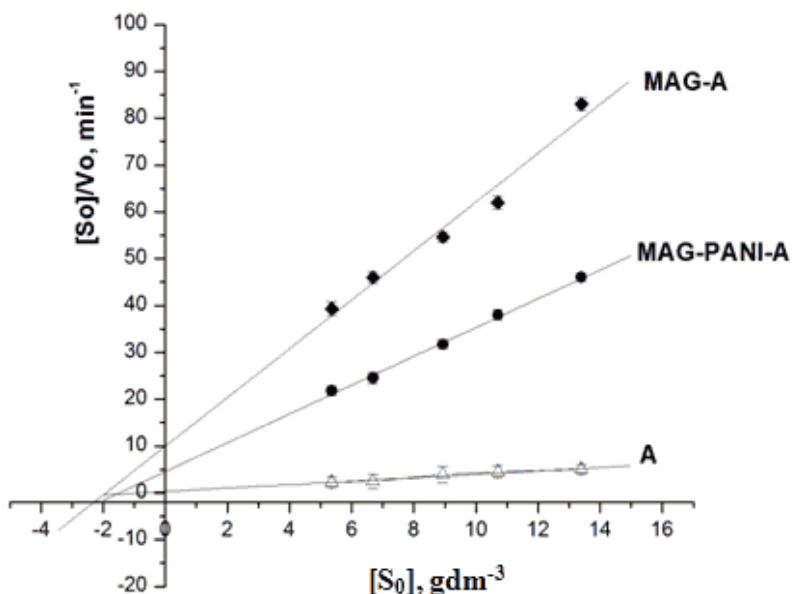
калцијум-хлорида, имобилизати су показали већу активност од имобилизата добијених имобилизацијом без присуства наведене соли. Јасно је да су Ca^{2+} јони допринели активности имобилисане α -амилазе и да су имали већи утицај на активност ензима од масе везаног ензима. Ово може да укаже да конформација ензима и приступачност супстрата активном центру, а не маса везаног ензима, имају доминантну улогу у коначној активности имобилизата.

4.3.7. Кинетички параметри слободне и имобилисане α -амилазе

Одређивање кинетичких константи, Михаелисове константе, K_m и максималне брзине, V_m има велики значај у ензимологији. K_m не зависи од концентрације ензима, а зависи од типа супстрата, температуре, рН и јонске јачине раствора. V_m зависи од концентрације ензима, тако да се не може користити као карактеризација ензима. Постоји неколико метода одређивања кинетичких константи. У овом раду одређене су на основу Хејнсовог дијаграма.

Кинетички резултати су добијени испитивањем почетне брзине реакције хидролизе скроба катализоване слободном и α -амилазом имобилисаном на MAG и MAG-PANI честицама у интервалу почетне концентрације раствора скроба од 5,6-13,7 gdm^{-3} . У сва три случаја добијена је линеарна зависност: $[S_0]V_0^{-1} = f([S_0])$, што указује да се ензимске реакције са слободном и имобилисаном α -амилазом одвијају по Михаелис-Ментен-овом механизму (Слика 4.21.) Резултати кинетичких параметара приказани су у Табели 3.

K_m имобилисаних ензима на MAG и на MAG-PANI веће су од исте константе слободног ензима. Ово повећање указује на смањење афинитета имобилисаног ензима према скробу, што је очекивано обзиром на макромолекулску природу скроба и повећане дифузионе лимитације у хетерогеном систему са имобилисаним честицама. Исто тако, могуће је да је дошло до конформационих промена ензима током имобилизације, што такође може бити узрок мање приступачности супстрата активном месту ензима. Мања вредност K_m имобилизата MAG-PANI-А од K_m имобилизата MAG-А указује да полимерна превлака полианилина преко магнетних честица обезбеђује повољну микрооколину за имобилизацију ензима.



Слика 4.21. Одређивање кинетичких параметара нативне α -амилазе (A), MAG-PANI-A и MAG-A по Хејнс-у

Могуће је да полимер спречава сувишно отварање ензима, штити га од конформационих промена и тиме позитивно утиче на ензимску активност [140]. Вредност V_m нативног ензима већа је 13,95 пута у односу на имобилизат MAG-A и 8,28 пута у односу на имобилизат MAG-PANI-A.

Табела 3. Кинетички параметри нативне и имобилисане α -амилазе

	α -амилаза (A)	MAG-A	MAG-PANI-A
K_m, gdm^{-3}	0,65	1,91	1,48
$V_m, \text{gdm}^{-3} \text{min}^{-1}$	2,65	0,19	0,32

Вредности Михаелисове константе и максималне брзине ензимске реакције слободног и имобилисаног ензима приказане су у Табели 3. Михаелисова константа имобилисаног ензима већа је око 2,3 пута од исте константе слободног ензима. Ово

повећање може бити узроковано најчешће дифузионим лимитацијама супстрата имобилизата или конформационим променама ензима насталих током адсорпције на носач. Промена афинитета ензима према супстрату узрокована је и структурним променама ензима насталих током имобилизације и мањом приступачношћу супстрата активном месту имобилисаног ензима. Супротно K_m , V_m је виша код слободног у односу на имобилисани ензим, што указује на смањење остатка активности имобилисаног ензима.

Својства имобилисане α -амилазе на MAG и MAG-PANI микрочестицама упоређена су са својствима других имобилисаних система са α -амилазом у литератури (Табела 4). Од великог броја радова упоредно су приказани кинетички параметри само оних код којих је на исти или сличан начин дефинисана јединица ензимске активности. Имобилисана α -амилаза на MAG-PANI честицама има једну од најнижих вредности Михаелисове константе, K_m . Ова вредност је приближна са K_m имобилисане α -амилазе на наночестицама цинк(II)оксида, а чак је вишеструко мања од K_m имобилисаних система различитих полимерних материјала. Уочава се да су масималне брзине ензимских реакција имобилизата полимерних микрочестица и хидрогелова неколико десетина пута мање од вредности имобилизата на наночестицама цинк(II)-оксида, MAG и MAG-PANI. Различити полимерни материјали, активирани различитим супстанцама, у облику имобилизата нису показали значајне разлике рН и температурног оптимума са изузетком полианилина на магнетним честицама. Интересантно је поређење нашег имобилисаног система са α -амилазом имобилисаном на наночестицама металних осида попут цинк(II)-оксида, који су веома интересантни као биокатализатори за примену у хидролизи скроба. Иако је у оба случаја ензим имобилисан адсорпцијом, већу термалну стабилност показује α -амилаза имобилисана на MAG-PANI. Оптимална температура α -амилазе имобилисане на MAG-PANI је виша чак за 20°C од оне имобилисане на наночестицама цинк(II)-оксида, што указује на повољнију оријентацију ензима током имобилизације што стабилизује конформацију ензима као и на повољније микроокружење ензима. Међутим, са имобилисаном α -амилазом на металним наночестицама постиже се више од девет пута већа масимална брзина реакције, вероватно због мањих димензија честица. Значајне разлике у вредностима кинетичких параметара имобилисане α -амилазе на носачима MAG, MAG-PANI и цинк(II)-оксида и истих параметара на различитим полимерним материјалима могу бити последица утицаја металних осидна на активност имобилизата.

Табела 4. Поређење кинетичких параметара, рН и температурних оптимума МАG-А и МАG-PANI-А са литературним подацима

Носач/начин имобилизације	К _т (mgcm ⁻²)	V _т (mgmin ⁻¹ cm ⁻³)	рН/температурни оптимум	Референца
Поли(метилметакрилат-акрилна киселина) активирањем:				
карбодимидом	31,37	1,66·10 ⁻³	6,5/55°C	
тионил хлоридом/ковалентна	30,02	1,61·10 ⁻³	6,0/55°C	[140]
Поли(метилметакрилат-2-хидроксиетилметакрилат) активирањем:				
епихлорхидрином/дијанурил-хлоридом/ковалентна	28,54 15,50	2,89·10 ⁻³ 1,89·10 ⁻³	6,5/55°C 6,5/55°C	[141]
Поли(N-винил пиролидон/итакоњска киселина) хидрогел/адсорпција	3,88-5,02*	1,62-2,27	6,0/55°C	[142]
Поли(акриламид/малеинска киселина) хидрогел/адсорпција	12,3-12,9**	1,63-1,96	6,0/50°C	[143]
Поли(димер киселина-ко-алкилолхамин) активирањем:				
карбодимидом	3,13	6,16·10 ⁻⁴	6,5/55°C	
етилендиамином	3,47	7,34·10 ⁻⁴	6,5/55°C	
хексаметилендиимином/ковалентна	3,17	3,30·10 ⁻⁴	8,0/55°C	[144]
Нано честице цинк (II)-оксида/адсорпција	2,08	2,92	6,5/30°C	[145]
Полианилин у праху у виду:				
-емералдин соли/адсорпција	2,15	2,71 mgcm ³	4,5/35°C	[113]
ковалентна	0,83	4,73 mgcm ³	5,5/40°C	
Емералдин базе/				
Адсорпција	4,58	2,23 mgcm ³	5,5/40°C	
ковалентна	1,99	3,80 mgcm ³	5,5/40°C	
МАG/адсорпција	1,91	0,19	7,0/40°C	Овај рад
МАG-PANI/адсорпција	1,48	0,32	6,8/50°C	Овај рад

*у зависности од количине итакоњске киселине у хидрогелу

**у зависности од количине малеинске киселине у хидрогелу

Посебно је значајно упоредити имобилизате α -амилазе на MAG-A и MAG-PANI-A са имобилисаном α -амилазом на наночестицама металних оксида као што је цинк (II)-оксид. Као начин везивања ензима у оба случаја примењена је адсорпција, а већа термална стабилност постигнута је са α -амилазом имобилисаном на MAG-PANI. Температурни оптимум α -амилазе имобилисане на MAG-PANI виши је чак за 20 °C од истог параметра имобилисане α -амилазе на наночестицама цинк (II)-оксида. Узрок може бити повољнија оријентација ензима током имобилизације на MAG-PANI која стабилизује конформацију ензима а утиче и на стварање повољнијег микроокружење. Међутим, имобилизат α -амилазе на наночестицама цинк (II)-оксида има више од девет пута већу максималну брзину реакције, што може бити узроковано мањим димензијама честица носача. Велике разлике у вредностима кинетичких параметара имобилисане α -амилазе на честицама MAG, MAG-PANI и цинк (II)-оксида с једне стране и на различитим полимерним материјалима с друге стране могу бити узроковане утицајем металних оксида на активност имобилизата.

За честице MAG веже се просечно $2,35 \pm 0,05$ mg ензима/50 mg носача мерено на основу карактеристичне апсорбанце на 255 nm или $5,4 \pm 0,9$ mg ензима/50 mg носача мерено методом по Лорију (Lowry). За честице MAG-PANI просечно се веже $1,64 \pm 0,05$ mg ензима/50 mg носача мерено по првој методи или $4,7 \pm 0,8$ mg ензима/50 mg носача мерено по другој методи. Иако се за честице MAG-PANI веже мање ензима него за честице MAG, имобилизат показује већу активност што указује на позитиван ефекат полианилинске превлаке, највероватније на конформациони положај ензима.

4.3.8. Природа интеракција α -амилаза-носач

Поређењем спектра MAG-A (имобилисана алфа-амилаза на магнетним честицама) и MAG јасна је промена спектра у области од ~ 900 до $1300,0 \text{ cm}^{-1}$ (Слика 4.3.). Код имобилисаног ензима. На основу промена спектра имобилизата у односу на носач, може се закључити да је дошло до интеракције α -амилазе са MAG, као и са MAG-PANI.

Расподела зета потенцијала α -амилазе и MAG је углавном слична (Слика 4.4. и 4.9.), због чега се може претпоставити да су међу честицама носача и ензима биле израженије одбојне силе, што је отежавало процес имобилизације. Уочава се да одређен број честица MAG-PANIма позитиван зета потенцијал + 20 до + 60 mV што је могло

допринети електростатским привлачењима. У прилог овој констатацији је и чињеница да се на честице MAG-PANI везивала већа количина ензима у односу на честице MAG имобилизацијом под идентичним условима.

Протеин се из раствора транспортује до површине носача дифузијом или конвекцијом. Чак и у системима са добрим мешањем уз површину носача постоји непокретни слој кроз који се транспорт врши дифузијом. Постоји неколико примера да овај ступањ одређује брзину адсорпције. Како се површина испуњава протеином, брзина адсорпције се смањује и постаје мања од брзине дифузије, због чега реакција постаје површински контролисана. Утицај површине носача израженији је код слабе прекривености површине јер су бочне интеракције између адсорбованих молекула занемарљиве [50]. Конформација протеина од елементарне је важности за његову функцију. Промене у конформацији протеина могу се десити одмах након адсорпције, али могу и током одређеног времена. Претпоставља се да су конформационе промене највеће при најмањој прекривености носача протеином, јер други молекули показују минимални утицај на способност протеина да заузме различите конформације. Адсорпција ензима и протеина је у неким случајевима неповратан или само делимично повратан процес, али чести су и примери повратне адсорпције. Промена рН или пораст јонске јачине могу изазвати десорпцију протеина. Ефекат рН и концентрације соли више су изражени код хидрофилних него хидрофобних површина носача [51]. Такође ензим који је иреверзибилно адсорбован може бити замењен присутним ензимима из раствора или мањим молекулима [52]. Протеин је везан за површину носача преко неколико слабих веза. Формирање и раскидање ових веза је динамички процес. Мала је вероватноћа да се све ове везе раскину у исто време, па стога неће доћи до десорпције протеина разблаживањем. Међутим, енергија потребна да се раскине једна од ових веза је веома мала и други молекули протеина се може везати на ово место. Ако се овај процес понавља више пута постојећи протеин на површини носача може бити замењен другим. Одвојена група може се алтернативно поново адсорбовати на неком другом месту, што доводи до површинске покретљивости одређеног молекула. Десорбован ензим може бити конформационо промењен у односу на нативни. Такође, ензим други пут може показати мању тежњу за адсорпцијом. У многим случајевима ензим је способан да врати нативну структуру [52].

4.3.8.1. Утицај NaCl и Triton X100 на десорпцију ензима

Инкубирањем имобилизата са раствором NaCl и Triton X 100 30 min измерено је више протеина у раствору Triton X 100, што указује на то да су више заступљене хирофобне интеракције (Табела 5).

Табела 5. Десорпција α -амилазе у присуству NaCl и Triton X100

Имобилизат	% десорбоване α -амилазе у	
	0,8 M NaCl	0,1%-ном Triton X100
MAG-A	24,80	29,81
MAG-PANI-A	25,61	43,54

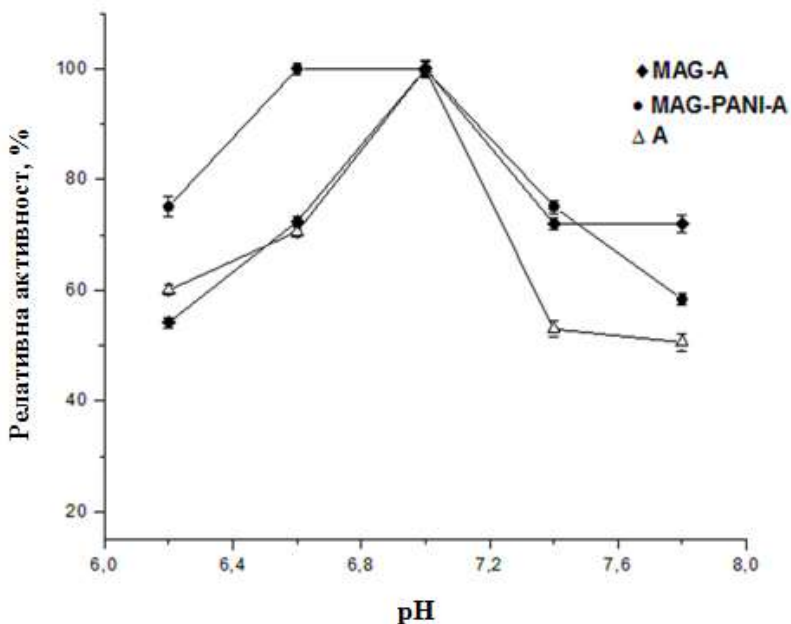
Испирањем MAG-A са растворима NaCl и Triton X 100 десорбујусе приближно једнаке количине протеина са носача. То указује да су у процесу адсорпције присутне како хидрофобне, тако и електростатичке интеракције. Већи проценат α -амилазе се десорбује са MAG-PANI-A дејством раствора Triton X100 него NaCl, што указује на већу заступљеност хидрофобних интеракција између ензима и носача.

4.4. Стабилност имобилисане α -амилазе

4.4.1. рН стабилност слободне и имобилисане α -амилазе

Нативна α -амилаза (А) и њен имобилизат на MAG честицама (MAG-A) показују највећу активност при рН блиским 7,0 (Слика 4.22.). Најужи рН профил показује слободан ензим. MAG-A показује већу стабилност при променама рН од нативног ензима, што указује да везивање ензима за носач има позитиван утицај на стабилност. Многи аутори су показали да имобилизацијом α -амилазе на магнетним честицама биокатализатор постаје отпорнији на промену рН средине. Шири рН профил имобилисане α -амилазе у односу на слободну јавља се услед разлике између концентрација H^+ и OH^- јона у микрооколини која настаје услед ефеката расподеле јона изазваних електростатичким интеракцијама са носачем.

pH профил имобилисане α -амилазе на MAG и MAG-PANI може се упоредити са pH профилом имобилисане α -амилазе на честицама Fe_3O_4 , као и Fe_3O_4 пресвучене силицијум-диоксидом и Fe_2O_3 пресвучене златом [91]. Уочава се слични ефекат имобилизације на pH профил. Оптималне pH слободне и имобилисане α -амилазе на MAG, MAG-PANI, Fe_3O_4 , пресвучене силицијум-диоксидом Fe_3O_4 и Fe_2O_3 пресвучене златом су исте, pH 7. Имовилисана α -амилаза на MAG-PANI исто као и на Fe_3O_4 пресвучене силицијум-диоксидом и Fe_2O_3 пресвучене златом има тенденцију задржавања активности у ширем pH опсегу од нативног и имобилисаног ензима на MAG, односно на Fe_3O_4 . На основу наведених поређења јасно је да превлака магнетних честица има позитиван ефекат на pH профил имобилисане α -амилазе. Имовилисана α -амилаза на MAG-PANI (MAG-PANI-A) има шири pH профил у односу на MAG-A, што указује на то да полианилинска превлака додатно стабилизује имобилисану α -амилазу.

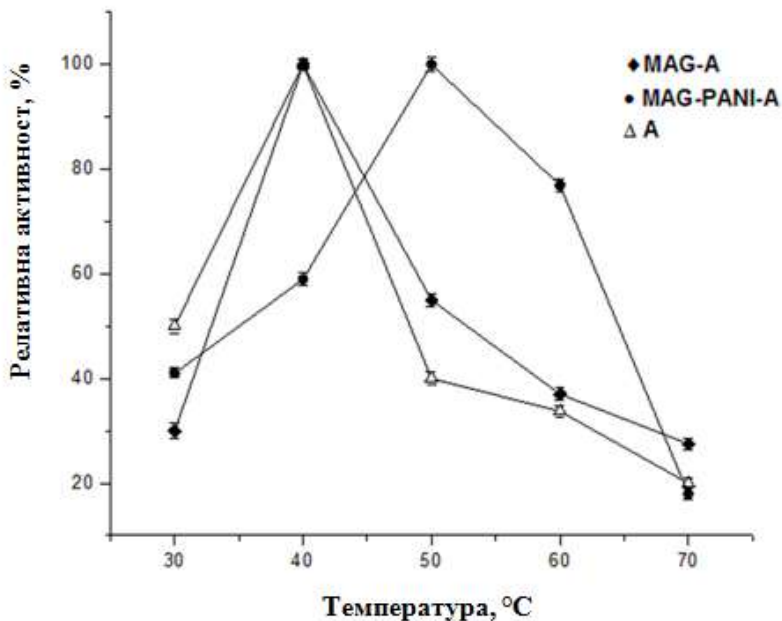


Слика 4.22. Утицај pH на активност нативне и имобилисане α -амилазе, на 25 °C

Имовилисана α -амилаза на композиту сребра и полианилина ковалентном везом показује такође шири pH оптимум од слободне α -амилазе [114].

4.4.2. Термичка стабилност слободне и имобилисане α -амилазе

Имобилизација α -амилазе на MAG честицама нема значајан утицај на термичку стабилност, с обзиром да имобилизат MAG-A има исти температурни оптимум на 40°C као и слободна α -амилаза (Слика 4.23.).

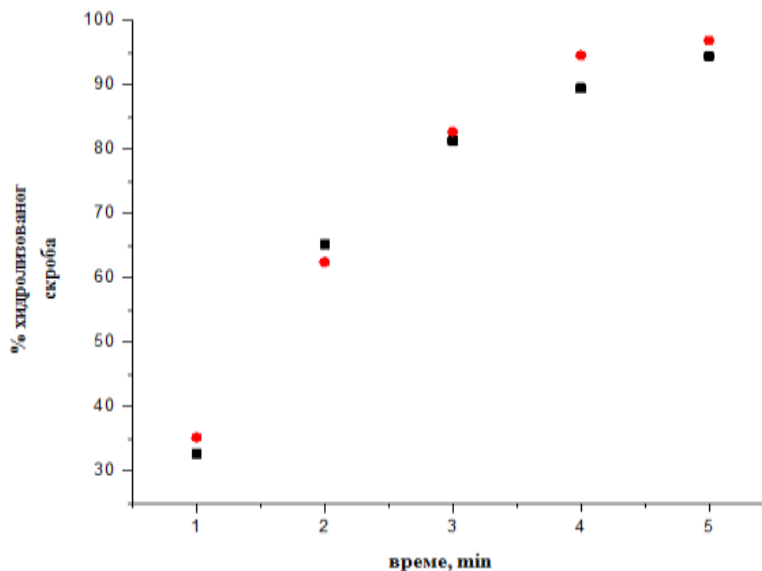


Слика 4.23. Утицај температуре на активност нативне и имобилисане α -амилазе, на pH 6,9

Температурни оптимум адсорбоване α -амилазе на наночестицама Fe_2O_3 померен је са 40°C-карактеристичан за слободну α -амилазу на 50°C [91]. Овакво померање температурног оптимума показао је MAG-PANI-A, чему је допринела полианилинска превлака, али не и саме магнетне честице као код других истраживача [100]. Полианилинска превлака може утицати на смањење конформационе флексибилности ензима и тиме побољшаати заштитни ефекат носача на молекуле ензима.

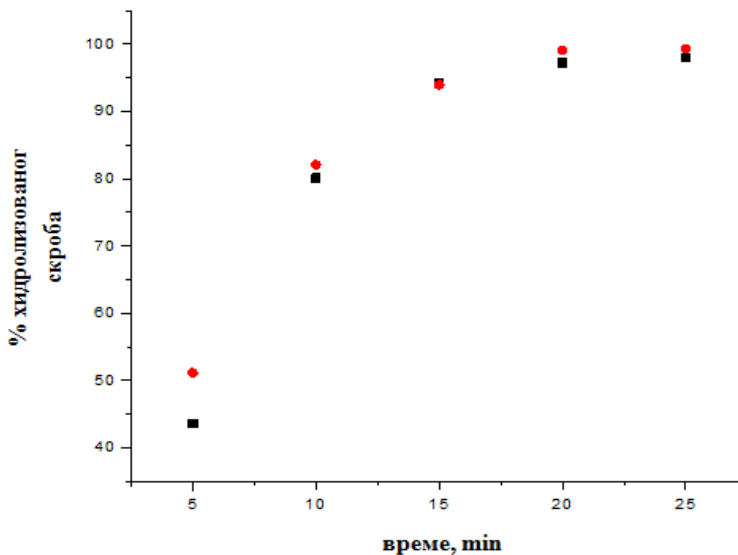
4.4.3. Утицај ултразвучних таласа на слободну и имобилисану α -амилазу

Ултразвучни таласи немају значајан утицај на активност слободне α -амилазе током 5 min деловања (Слика 4.24.). Након 5 min α -амилаза хидролизује 94,5% скроба, а у присуству ултразвука 96,9%. Утицај ултразвука на активност ензима још увек није довољно разјашњен. Одређен број литературних навода указује на негативан утицај ултразвучних таласа на активност ензима, што наравно зависи од структуре ензима. Неки штетни ефекти изазвани услед дејства ендогених ензима неких биљних врста, попут тамњења или промене укуса, управо се могу спречити процесирањем хране ултразвуком високог интензитета.



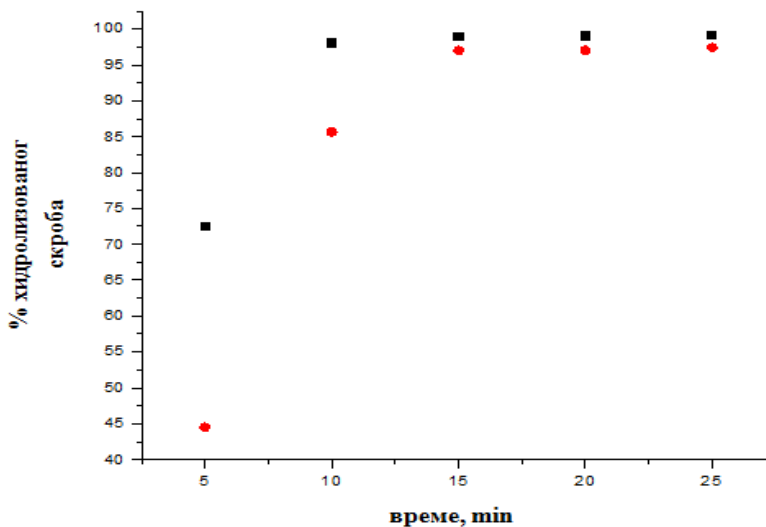
4.24. Хидролиза скроба помоћу слобоне α -амилазе ■-без и ●-под дејством ултразвучних таласа

Изложеност MAG-A ултразвучним таласима током 25 min, указује на нешто већу активност имобилизата након 5 min, док се у наредних 20 min није мењла значајно активност MAG-A (Слика 4.25.).



Слика 4.25. Хидролиза скроба помоћу MAG-A ■-без и ●-под дејством ултразвучних таласа

Међутим утицај ултразвучних таласа на MAG-PANI-A је посебно видљив током првих 10 min дејства где је смањена активност имобилизата услед дејства ултразвучних таласа (Слика 4.26.).



Слика 4.26. Хидролиза скроба помоћу MAG-PANI-A ■-без и ●-под дејством ултразвучних таласа

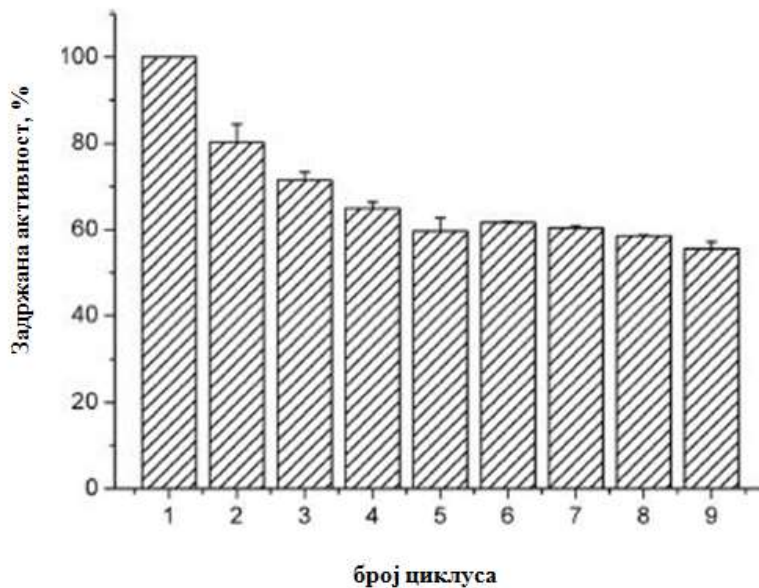
Различно понашање MAG-A и MAG-PANI-A вероватно је узроковано присуством полианилина на површини магнетних честица. Долази до разарања носача

MAG-PANI-A, што је могло допринети смањеној активности ензима првих 10 min. Дужим деловањем ултразвука имобилизат постиже приближно исту активност као и у одсуству ултазвучних таласа.

Ултразвук повећава активност слободне α -амилазе из *Bacillus licheniformis* (BLA) при фреквенцији од 40 kHz са максималном излазном снагом од 150 W током 10 минута уз паузе од по 5 s након 10 s изложености [127].

4.4.4. Могућност вишекратне употребе биокатализатора и стабилност током чувања

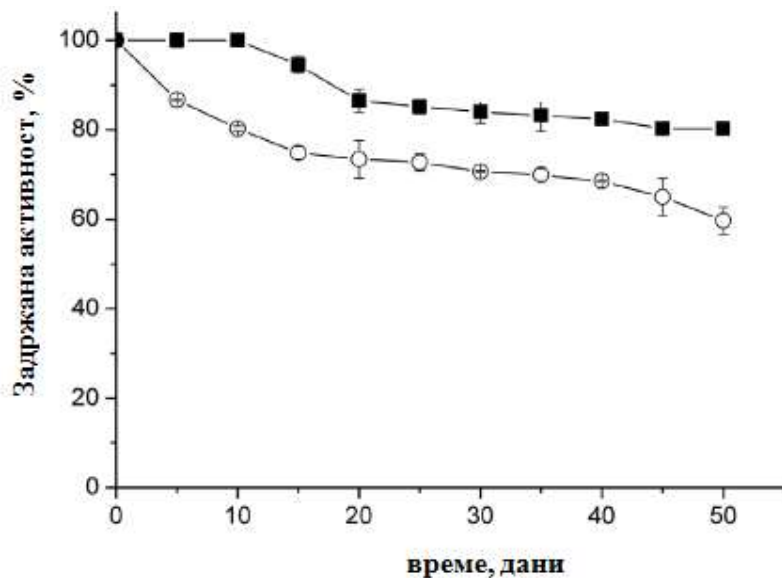
За практичну примену биокатализатора у индустрији важна је могућност вишекратне употребе. Добијени имобилизат α -амилазе на полианилинским магнетним честицама употребљен је у 9 реакционих циклуса за хидролизу скроба на 60°C током 30 минута. Активност имобилизата нагло се смањује у првих пет циклуса, након чега задржава скоро константну вредност у наредна четири циклуса (Слика 4.27.). Имобилисани ензим задржава $55,5 \pm 1,63$ % почетне активности након 9 сукцесивних коришћења што је знатно више у поређењу са физички адсорбованом α -амилазом на праху полианилина која је задржала свега 20% активности након 10 циклуса, а мање је у односу на активност α -амилазе ковалентно имобилисане на PANI где је задржана активност око 70% од почетне [113]. Смањено задржавање ензимске активности у MAG-PANI-A може бити узроковано денатурацијом или инхибицијом ензима продуктом. Такође, разлог може бити и спирање ензима са носача, што није случај код ковалентне имобилизације.



Слика 4.27. Стабилност MAG-PANI-A након 9 циклуса хидролизе 2%-ног скроба

Алфа-амилаза адсорбована на композиту бентонит/хитозан задржала је 87% почетне ензимске активности након 5 циклуса употребе [124]. Након 6 узастопних циклуса α -амилаза ковалентно имобилисана на модификованим честицама Fe_2O_3 пресвучених силицијум-диоксидом задржала је 85% почетне активности [104]. Ковалентно имобилисана α -амилаза на магнетним честицама са полимерном превлаком од силика-гела преко глутаралдехида издржава 68% почетне активности након 9 циклуса [107].

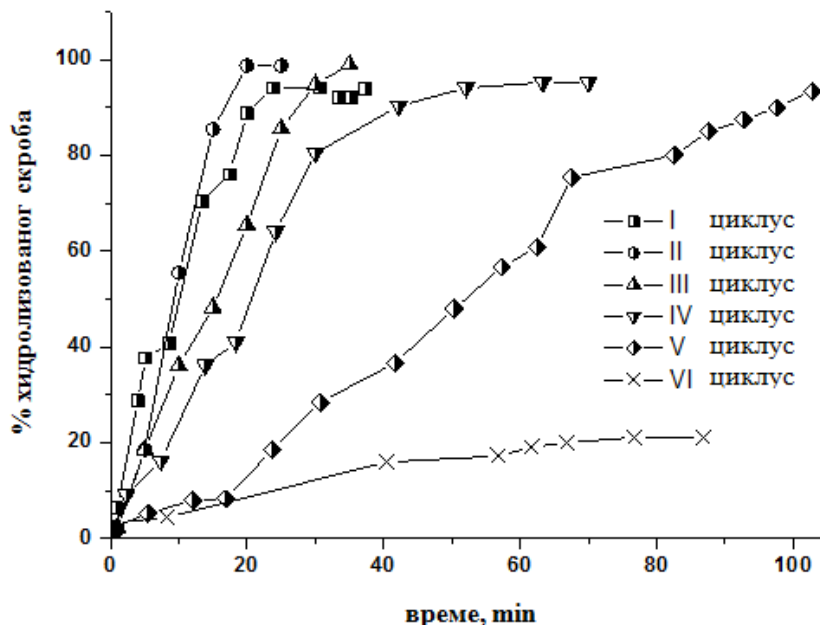
Имобилисана α -амилаза на магнетним честицама модификованим полианилином била је стабилна током чувања на 4°C у фосфатном пуферу 50 дана задржавајући око 80,3% почетне активности (Слика 4.28). Ковалентна имобилизација α -амилазе на модификованим магнетним наночестицама силицијум-диоксидом и амино групама омогућила је добијање биокатализатора који се лако издваја из система и задржава 86% ензимске активности након 30 дана чувања [90].



Слика 4.28. Стабилност имобилизата током 50 дана чувања у 40 mM фосфатном пуферу на 4°C за о-слободну и ■-имобилисану α -амилазу

4.4.5. Оперативна стабилност имобилисане α -амилазе

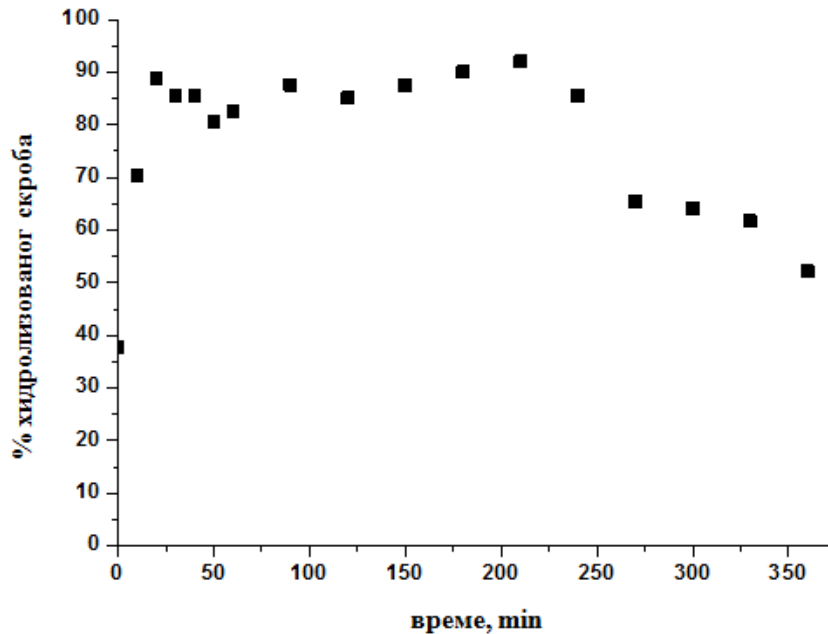
За практичну примену имобилисаног биокатализатора најрелевантније је испитивање оперативне стабилности у условима који се очекују при индустријској примени. Испитана је оперативна стабилност α -амилазе имобилисане на MAG и MAG-PANI честицама у проточном реактору са пакованим слојем са повратним током (Слика 4.29.) У биореактору са пакованим слојем MAG-PANI-A са повратним током у првом циклусу током 20 min реакције долази до хидролизе 98,8% скроба. Имобилисани ензим је показао велику активност и током другог и трећег циклуса, да би у четвртом циклусу активност опала тако да тек након 52 min хидролизе 94,15% скроба. До значајног пада активности долази у петом циклусу са скоро линеарним порастом % хидролизованог скроба током времена, када тек након 102,8 min хидролизује 93,5% скроба.



Слика 4.29. Оперативна стабилност α -амилазе имобилисане на MAG-PANI честицама у проточном реактору са пакованим слојем са повратним током

Оперативна стабилност имобилисане α -амилазе у реактору са пакованим слојем без повратног тока у континуалним условима приказна је на Слици 4.30). Уочава се да је систем стабилнији у овом случају, највероватније због мањег протока и мањег спирања ензима са носача. Степен хидролизе скроба није се значајније мењао у току 4 h рада реактора и износио је $88,8 \pm 1,6\%$. Време полу-живота биокатализатора при континуалним условима рада било је 6,2 h.

Имобилисан биокатализаторски систем MAG-A пакован у биореактору под истим условима као и MAG-PANI-A онемогућио је проток супстрата кроз реактор већ код увођења прве шарже супстрата у систем, услед стварања густо пакованог слоја. Полианилинска превлака на магнетним честицама чини MAG-PANI-A погоднијим имобилисаним биокатализаторским системом за употребу у реактору са пакованим слојем.

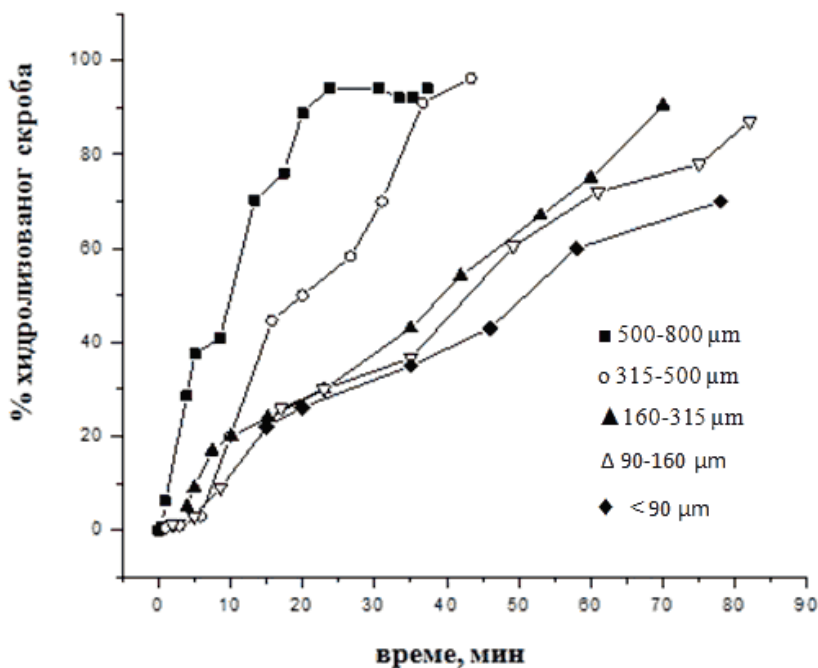


Слика 4.30. Оперативна стабилност α -амилазе имобилисане на MAG-PANI честицама у проточном реактору са пакованим слојем без повратног тока у континуалним условима

Поређењем стабилности MAG-PANI-A у шаржном реактору, биокатализатор задржава $55,5 \pm 1,63\%$ почетне ензимске активности након 9 циклуса употребе. Исти имобилизат задржава и $80,03 \pm 0,18\%$ почетне активности након 50 дана чувања у фосфатном пуферу на температури од 4°C . Узрок мање стабилности ензима у проточним условима у односу на шаржне може бити спирање ензима са носача имобилисаног адсорпцијом. За карактеризацију стабилности ензима важан услов је увођење у систем константне концентрације супстрата. Због тога је испитана и оперативна стабилност имобилисаног ензима у реактору са пакованим слојем који се уз одређене апроксимације може представити као идеални цевни реактор (Слика 4.31). Систем је стабилнији у овом случају највероватније због мањег протока и мањег спирања ензима са носача. Степен хидролизе скроба није се значајније мењао у току 4 h рада реактора и износио је $88,77 \pm 1,62\%$. Време полу-живота биокатализатора при континуалним условима рада било је 6,2 h.

4.4.5.1. Утицај величине честица на оперативну активност MAG-PANI-A

Величина честица пакованог слоја је важан параметар који одређује брзину биокатализе у проточним реакторима. У више експеримената вођених под идентичним условима, уз варирање само величине честица пакованог слоја MAG-PANI-A праћен је степен хидролизе скроба првог циклуса у реактору са повратним током (Слика 4.31).

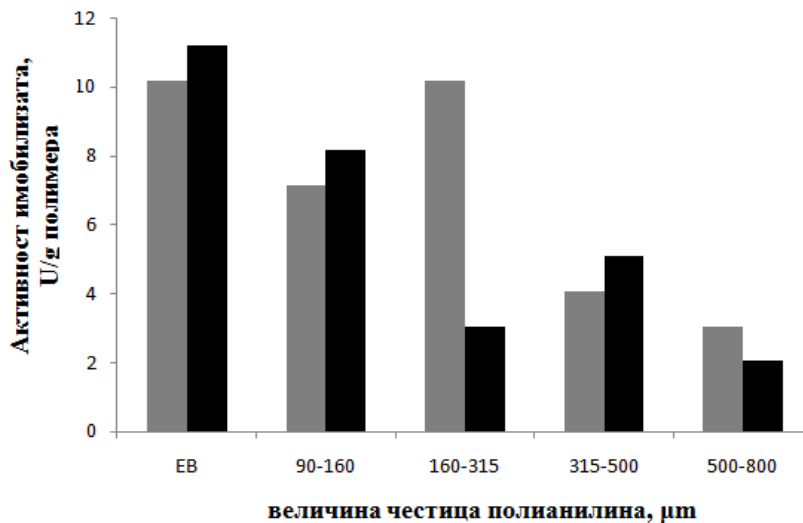


Слика 4.31. Хидролиза скроба у проточном реактору са повратним током у зависности од величине честица пакованог слоја

Уочено је да са повећањем величине честица расте и време потребно да хидролизује иста количина скроба. Хидролизом скроба помоћу имобилизата MAG-PANI-A величине честица 500-800 μm конвертовало је 70% скроба након 78 минута, са имобилизатом димензија 315-500 μm исти ниво конверзије остварен је након приближно 60 минута, а са имобилизатом димензија 160-315 μm после 55 минута. Честице имобилизата величине 90-160 μm катализовале су хидролизу скроба знатно брже, где је наведени степен конверзије постигнут за 31 минут, а имобилисана α-амилаза на честицама < 90 μm 70% скроба је хидролизовала за само 10 минута.

4.4.5.2. Утицај величине честица на активност PANI-A

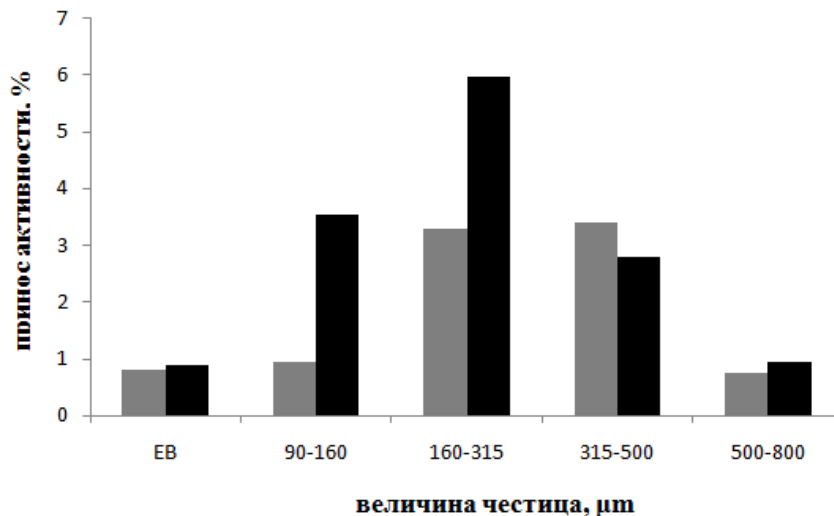
Испитивањем активности имобилизата на четири фракције PANI у шаржним условима утврђено је да постоји тренд смањења активности имобилисане α -амилазе повећањем величине честица са изузетком честица димензија 160-315 μm (Слика 4.32.).



Слика 4.32. Активност имобилисане α -амилазе на честицама полианилина (PANI) различитих димензија и полианилина нанодимензија (EB)

Мање честице имају већу специфичну површину због чега се на њима адсорбује и већа количина ензима. Међутим, испитивањем масе везаног ензима на полианилину показано је да маса адсорбованог ензима није увек имала утицај на активност имобилизата (Слика 4.33.). Ово указује на то да активни центри ензима нису подједнако доступни супстрату, или услед вишеслојне адсорпције ензима, или услед начина везивања ензима.

Јасно је уочен тренд смањења активности имобилизата са повећањем величине честица, што је и очекивано јер је познато да је унутрашњи пренос масе супстарта унапређен код честица мањих димензија.



Слика 4.33. Активност имобилисане α -амилазе на честицама полианилина (PANI) различитих димензија

Принос активности имобилисане α -амилазе (Слика 4.33), која представља однос специфичне активности имобилисане и слободне α -амилазе разликује се од профила активности имобилизата честица различитих величина. То је узроковано адсорпцијом различите масе ензима на носачу. Иако највећу просечну активност имобилизата показује α -амилаза адсорбована на честицама величине 90-160 μm , просечно највећи остварени принос активности 4,62% (практично значајнији параметар) утврђен је код честица величине 160-315 μm . То значи да су честице димензија 160-315 μm оптималне за имобилизацију ензима. Испитивањем ефикасности имобилизације α -амилазе на полианилину у форми емералдин соли утврдили су да се адсорпцијом постиже принос активности од 32,5 %, док је код полианилина у истој форми али активираним глутаралдехидом (код кога је дошло до ковалентног везивања α -амилазе на честице полимера) постигнут већи принос активности од 52,7%.

Јасно је да активност имобилизата не зависи само од масе везаног ензима. То је врло изражено код честица величине 90-160 μm код којих мали масени принос постигнут у другој проби показује већу ензимску активност од прве пробе, где се адсорбовало знатно више ензима. Ово се може објаснити неуједначеним распоредом молекула ензима на површини носача. У неким микрорегијама молекули ензима формирају више слојева, повећавајући дифузионе лимитације супстрата ка молекулима ензима у слојевима ближим

носачу, што узрокује мању активност веће масе ензима. Већа активност честица мањих у односу на честице већих димензија може указати на лакшу дифузију супстрата кроз суспензију честица мањих димензија, јер повећање димензија честица може узроковати губитак ензимске активности услед дифузионих лимитација због споре дифузије супстрата кроз суспендоване крупне честице. Показано је да се највећа количина ензима веже на микрочестицама, а имобилисан ензим на најситнијим честицама нано димензија показује највећу активност. На основу претходно изнете дискусије може се закључити да се смањењем честица носача може добити имобилизат веће активности, али са знатно ниским приносом активности. Низак принос активности може бити узрокован деловањем више фактора. Брзина мешања је један од њих.

Интересантно је даља истраживања усмерити на добијање биокатализатора наночестица магнетних својстава, које би омогућиле континуалну катализу у биореактору при флуидизованом начину рада које би обезбедило спољашње магнетно поље. Наведени начин биоакатализе би било значајно испитати, јер су неки аутори показали да је активност имобилисаног ензима под дејством спољашњег магнетног поља већа од активности слободног ензима.

Могућност заостајања мономера, димера и олигомера анилина након синтезе полианилина покрећу потребу даљих истраживања у смеру њиховог детектовања и изналажења услова синтезе при којима заостаје минимум нежељених продуката као и њихово потенцијално уклањање. Полимеризацијом анилина, одређени проценат мономера заостаје у раствору. Анилин и његови олигомери токсични су. Такође, анилин може инхибирати дејство ензима. У даљем раду битно је вршити контролу заосталог анилина након полимеризације и радити на изналажењу поступака његовог што потпунијег уклањања из система.

5. ЗАКЉУЧЦИ

Најзначајнији закључци произашли из ове тезе су:

- На основу FESEM микрографија може се закључити да микрочестице MAG и MAG-PANI представљају агрегате наночестица мањих од 100 nm;
- Полианилин прекрива нанорелјефну структуру површине MAG честица у виду влакана;
- Постигнуто је магнетно засићење од 79 emu/g за MAG и 70 emu/g MAG-PANI. Смањење магнетног засићења за MAG-PANI у односу на MAG узроковано је увођењем слоја немагнетног PANI преко магнетних честица;
- На основу FTIR спектра закључује се да је дошло до структурних промена узрокованих полимеризацијом анилина на магнетним честицама и везивања α -амилазе;
- MAG карактерише бимодална расподела величине честица од приближно 6 и 1 μm , док MAG-PANI карактерише тримодална расподела где се поред 6 и 1 μm јавља незнатан број честица са приближним димензијама 0,1 μm ;
- Полианилинска превлака стабилизује MAG честице повећавајући апсолутну вредност зета потенцијала;
- UV спектар ензимског препарата Termamyl показује максимум апсорпције на 255 nm што треба имати у виду приликом прецизнијих мерења садржаја протеина и бољег разумевања имобилизације;
- Одређени су оптимални услови имобилизације α -амилазе на честицама MAG-PANI: почетна концентрација α -амилазе 3 mgcm⁻³, време 75 min, pH 7 и температура 40°C;
- У присуство Ca²⁺ јона смањује се маса везане α -амилазе на MAG и на MAG-PANI, али добијени имобилизат показује већу активност
- Имобилисана α -амилаза на MAG-PANI показује већи афинитет према супстрату од имобилисане α -амилазе на MAG, а нижи афинитет од слободне α -амилазе. Полианилинска превлака утиче на побољшање кинетичких својстава имобилисане α -амилазе. Максимална брзина ензимске реакције MAG-PANI-A већа је 1,7 пута у односу на MAG-A док је Михаелисова константа MAG-PANI-A мања је око 1,3 пута од MAG-A;

- Адсорпција α -амилазе на честицама MAG-PANI описана је Ленгмировом адсорпционом изотермом;
- Ултразвучни таласи немају значајан утицај на активност слободне α -амилазе и MAG-A, док смањује активност MAG-PANI-A првих 10 min хидролизе;
- Имобилисана α -амилаза на MAG-PANI је рН и температурно стабилнија од имобилисане α -амилазе на MAG. Полианилинска превлака доприноси стабилности ензима;
- Имобилисана α -амилаза је рН и температурно стабилнија од слободне α -амилазе;
- Имобилисана α -амилаза на MAG-PANI задржава око 55,5% почетне активности након 9 циклуса коришћења на 60°C;
- Имобилисана α -амилаза на MAG-PANI задржава 80,3% почетне активности након 50 дана чувања у 40 mM фосфатном пуферу на 4°C;
- Величина честица носача је обрнуто пропорционална брзини хидролизе скроба у проточном биореактору са повратним током;
- У проточном биореактору са пакованим слојем MAG-PANI-A са повратним током у првом циклусу хидролизује 98,8% скроба након 20 минута;
- У континуалним условима рад током 4 h степен хидролизе скроба је био готово константан и износио је 88,7%;
- Време полуживота биокатализатора MAG-PANI-A у оперативним условима је 6,2 h.
- Највећа маса ензима веже се за PANI честице величине 90-160 μm , али се са ових честица ензим најлакше и десорбује;
- Са повећањем величине честица PANI опада активност имобилисаног ензима са изузетком честица димензија 160-315 μm ;
- Принос активности α -амилазе у PANI-A не зависи од приноса масе.

6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Windish WW, Mhatre NS. Microbial amylases. In: Wayne WU, editor. *Advances in applied microbiology*, vol. 7. New York: Academic Press; 1965. p. 273-304.
- [2] Knežević-Jugović Z. *Enzimsko inženjerstvo*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet; 2008. p. 359-369.
- [3] Kendereški S. *Osnovi enzimologije*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet; 1986. p. 284-289.
- [4] El-Fallal A, Dobrara MA, El-Sayed A, Omar N. Starch and microbial α -amylases: from concept to biotechnological applications. Chapter 21. INTECH. 2012. p. 459-488.
- [5] Kooi ER, Armbruster FC. In: Whistler RL, Paschall EF, eds. *Starch: Chemistry and Technology*. Vol. II. New York, NY: Academic Press; 1967:553–568.
- [6] Knežević-Jugović Z. *Enzimsko inženjerstvo*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet; 2008. p.1-6.
- [7] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 2003; 38 (11): 1599-1616.
- [8] Bošković Ž. *Osnovi tehnologije skroba*. Jugoslovenski institut prehrambenog inženjerstva Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu; 1979.
- [9] Jane J. Structural Features of Starch Granules II, In BeMiller JN, Whistler RL, editors. *Starch: Chemistry and Technology*, 3rd ed. Burlington: Academic Press, Elsevier; 2009. p. 193–236.
- [10] Xie F, Pollet E, Halley PJ, Avérous L. Starch-based nano-biocomposites. *Progress in Polymer Science*. 2013; 38: 1590–1628
- [11] Gallant DJ, Bouchet B, Buléon A, Pérez S. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1992; 46 Suppl 2:S3-16.
- [12] Parker R, Ring SG. Aspects of the Physical Chemistry of Starch. Mini Review. *Journal of Cereal Science*. 2001; 34: 1–17.
- [13] Buleon A, Colonna P, Planchot V, Ball S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal Of Biological Macromolecules*. 1998; 23: 85–112.
- [14] Hizukuri S. Relationship between the distribution of the chain-length of amylopectin and the crystalline-structure of starch granules. *Carbohydrate Research*. 1985; 141: 295–306.
- [15] Hizukuri S, Maehara Y. Fine-structure of wheat amylopectin—the mode of a-chain to b-chain binding. *Carbohydrate Research*. 1990; 206: 145–159.

- [16] Hanashiro I, Abe J, Hizukuri S. A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. *Carbohydrate Research*. 1996; 283: 151–159.
- [17] Eliasson A-C. Retrogradation of starch as measured by differential scanning calorimetry. In: Hill RD, Munck L, eds. *New Approaches to Research on Cereal Carbohydrates*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V.; 1985. p. 93 .
- [18] Wild DI , Blanshard JMV. The relationship of the crystal structure of amylose polymorphs to the structure of the starch granule. *Carbohydrate Polymers*. 1986; 6: 121-143.
- [19] Pérez S, Baldwin PM, Gallant DJ. Structural Features of Starch Granules I, In BeMiller JN, Whistler RL, editors. *Starch: Chemistry and Technology*, 3rd ed. Burlington: Academic Press, Elsevier; 2009. p. 149–192.
- [20] Yu S, Houtman C, Atalla RH. The complex of amylose and iodine *Carbohydrate Research*. 1996; 292: 129-141.
- [21] Szejtli J. Untersuchung der Jod-Amylose-Einschlussverbindung. *Periodica Polykulinica Chem. Eng*. 1963; 7: 259-288.
- [22] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. 1991; 280: 309–316.
- [23] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: D233–D238.
- [24] Janecek S, Svensson B, MacGregor EA. A-Amylase—an enzyme specificity found in various families of glycosidehydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014; 71: 1149–1170.
- [25] Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Journal Biotechnology*. 2002; 94: 137-155.
- [26] Nakajima R, Imanaka T, Aiba S. Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1986; 23 (5): 355-360.
- [27] Prakash O, Jaiswal N. α -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes, *Applied Biochemistry Biotechnology*. 2010; 160: 2401–2414.
- [28] Janeček Š, Svensson B, Henrissat B. Domain Evolution in the α -Amylase Family. *Journal of Molecular Evolution*. 1997; 45: 322–331.

- [29] MacGregor EA. α -Amylase structure and activity. *Journal of Protein Chemistry*. 1988; 7: 399–415.
- [30] Lee S, Mouri Y, Minoda M, Oneda H, Inouye K. Comparison of the wild-type α -amylase and its variant enzymes in *Bacillus amyloliquefaciens* in activity and thermal stability, and insights into engineering the thermal stability of *Bacillus* α -amylase. *Journal of Biochemistry*. 2006; 139: 1007–1015.
- [31] Wolfenden R, Lu X, Young G. Spontaneous hydrolysis of glycosides. *Journal of the American Chemical Society*. 1998; 120 (27): 6814–6815.
- [32] Yoon S-H, Fulton B, Robyt JF. Formation of covalent β -linked carbohydrate–enzyme intermediates during the reactions catalyzed by α -amylases. *Carbohydrate Research*. 2007; 342: 55–64.
- [33] Robyt JF. Enzymes and their action on starch, In BeMiller JN, Whistler RL, editors. *Starch: Chemistry and Technology*, 3rd ed. Burlington: Academic Press, Elsevier; 2009. pp. 237–292.
- [34] Liu Y, Fan S, Liu X, Zhang Z, Wang J, Wang Z, Lu F. A Highly Active Alpha Amylase from *Bacillus licheniformis*: Directed Evolution, Enzyme Characterization and Structural Analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014; 24(7): 898–904.
- [35] Machius M, Declerck N, Huber R, Wiegand G. Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder \rightarrow order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure*. 1998; 6: 281-292.
- [36] Vaidya S, Srivastava PK, Pragya R, Pandey AK. Amylases: A prospective enzyme in the field of biotechnology. *Journal of Applied Biosciences*. 2015; 41(1): 1-18.
- [37] Kumar S. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement. *Advances in Applied Science Research*. 2015; 6:114–24.
- [38] Ito S, Kobayashi T, Hatada Y, Horikoshi K. Enzymes in modern detergents. *Methods in Bio-technology*. 2005; 17: 151-161.
- [39] Haq I, Ali S, Javed MM, Hameed U, Saleem A, Adnan F, Qadeer MA. Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as desizer in textile industry. *Pakistan Journal of Botany*. 2010; 42: 473-484.
- [40] Bruinenberg PM, Hulst AC, Faber A, Voogd RH. (2004). A process for surface sizing or coating of paper. In: European Patent Application No. EP0690170, April 2012. Available from :< <http://www.freepatentsonline.com/EP0690170.html>>.
- [41] Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Socool VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2000; 31: 135-152.

- [42] Oishi HJ, Hattori TJ, Watanabe MJ, Kato AJ. Method of curing and preventing obesity by alpha-amylase inhibitor. European Patent Application EP0451436 E.P.
- [43] Bosch JA, Veerman ECI, Eco J, de Geus EJ, Proctor GB. A-Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet!. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36: 449-453.
- [44] Kingspohn K, Bader J, Kruse PV, Schugerl K. Utilization of potato pulp from potato starch processing. *Process Biochemistry*. 1993; 28: 91-98.
- [45] Li C, Du M, Cheng B, Wang L, Liu X, Ma C, Yang C., Xu P. Close relationship of a novel *Flavobacteriaceae* a-amylase with archaeal a-amylases and good potentials for industrial applications. *Biotechnology for Biofuels*. 2014; 7: 18.
- [46] Houba R, Heederik DJJ, Doekes G, van Run PEM. Exposure-sensitization relationship for alpha-amylase allergens in the baking industry. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996; 154: 130-136.
- [47] Dwevedi A. 100 Years of Enzyme Immobilization. In: *Enzyme Immobilization*. Springer, Cham; 2016. p. 1-20.
- [48] Hartmeier, W. *Immobilized biocatalysts: An introduction*. Springer Science & Business Media. 2012
- [49] Jia F, Narasimhan B, Mallapragada S. Materials-Based Strategies for Multi-Enzyme Immobilization and Co-Localization: A Review. *Biotechnology and Bioengineering*. 2014; 111: 209–222.
- [50] Wahlgren M, Arnebrant T. Protein adsorption to solid surfaces. *Trends in biotechnology*. 1991; 9: 201-208.
- [51] Norde W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1986; 25: 267-340.
- [52] Norde W, MacRitchie F, Nowicka G, Lyklema J. Protein adsorption at solid-liquid interfaces: Reversibility and conformation aspects. *Journal of Colloid and Interface Science* 1986; 112: 447-456.
- [53] Cao L. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*. 2005; 9: 217–226.

- [54] Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*. 2008; 108(6): 2064-2110.
- [55] Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim W-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2015; 16: 023501 (43pp).
- [56] Răuciu M. Synthesis protocol influence on aqueous magnetic fluid properties. *Current Applied Physics*. 2009; 9: 1062–1066.
- [57] Jolivet JP, Chanec C, Tronc E. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chemical Communications*. 2004; 5: 481-487.
- [58] Cornell RM, Schwertmann U. *The Iron Oxides Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. VCH Publishers: Weinheim, Germany. 1996.
- [59] Boistelle R, Astier JP. Crystallization mechanisms in solution. *Journal of Crystal Growth*. 1988; 90: 14—30.
- [60] Sugimoto T. Formation of Monodispersed Nano- and Micro-Particles Controlled in Size, Shape, and Internal Structure. 2003; 26: 313–321.
- [61] Schwarzer H-C, Peukert W. Tailoring particle size through nanoparticle precipitation. *Chemical Engineering Communications*. 2004; 191: 580-606.
- [62] Cornell RM, Schwertmann U. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*; VCH Publishers: Weinheim, Germany. 1991.
- [63] Mehta RV, Upadhyay RV, Charles SW, Ramchand CN. Direct binding of protein to magnetic particles. *Biotechnology Techniques*. 1997; 11(7): 493-496.
- [64] Yang J, Choi J, Bang D, Kim E, Lim E-K, Park H, S J-S, Lee K, Yoo K-H, Kim E-K, uh Y-M, Haam S. Convertible Organic Nanoparticles for Near-Infrared Photothermal Ablation of Cancer Cells. *Angewandte Chemie (International Edition)*. 2011. 50: 441–4.
- [65] Barbero CA, Acevedo DF, Yslas E, Broglia M, Peralta DO, Frontera E, Rivera R, Rivarola R, Bertuzzi M, Rivarola V, Miras MC. Synthesis, Properties and Applications of Conducting Polymer Nano-Objects. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2010; 521: 214–28.
- [66] Yin J, Xia X, Xiang L, Zhao X. Temperature effect of electrorheological fluids based on polyaniline derived carbonaceous nanotubes. *Smart Materials Structures*. 2011, 20: 015002. 10.1088/0964-1726/20/1/015002.

- [67] Virji S, Huang J, Kaner R B and Weiller B H. Polyaniline Nanofiber Gas Sensors: Examination of Response Mechanisms. *Nano Letter*. 2004; 4: 491–6.
- [68] Ambrosi A, Morrin A, Smyth M R and Killard A J. The application of conducting polymer nanoparticle electrodes to the sensing of ascorbic acid. *Analytica Chimica Acta*. 2008; 609: 37–43.
- [69] Fernandes KF, Lima CS, Pinho H, Collins CH. Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. *Process Biochemistry*. 2003; 38: 1379-1384.
- [70] Bezbradica D, Jugović B, Gvozdrenović M, Jakovetić S, Knezević-Jugović. Electrochemically synthesized polyaniline support for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. 2011; 70: 55–60.
- [71] MacDiarmid AG. Nobel Lecture: “Synthetic metals”: A novel role for organic polymers. *Reviews of Modern Physics*. 2001; 73(3): 701-712.
- [72] Diaz AF, Bargon J. Electrochemical synthesis of conducting polymers. In: Skotheim TA, editor. *Handbook of conducting polymers, vol. I*. New York: Marcel Dekker. 1986. p.81–115.
- [73] Shirakawa H, Louis EJ, MacDiarmid AG, Chiang CK, Heeger AJ. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications*. 1977; 16: 578-580.
- [74] Guimard NK, Gomez N, Schmidt CE. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*. 2007; 32: 876-921.
- [75] Pron A, Genoud F, Menardo C, Nechtschein M, The effect of oxidation conditions on the chemical polymerization of polyaniline. *Synthetic Metals*. 1988; 24: 193-201.
- [76] Huang J, Kaner RB. A general chemical route to polyaniline nanofibers. *Journal of the American Chemical Society*. 2004; 126(3): 851-855.
- [77] Chandrasekhar P. *Conducting Polymers, Fundamentals and Applications: A Practical Approach*; Kluwer Academic Publishers: Boston. 1999.
- [78] Stejskal J, Gilbert RG. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*. 2002; 74(5): 857–867. doi:10.1351/pac200274050857
- [79] Gvozdrenović M, Jugović B, Stevanović J, Trišović T, Grgur B, Electrochemical polymerization of aniline, *Electropolymerization*, EwaSchab-Balcerzak (Ed.), chapter 4. InTech; 2011. p.77-96.
- [80] Wessling, B. Passivation of metals by coating with polyaniline: corrosion potential shift and morphological changes. *Advanced Materials*. 1994; 6(3): 226-228.

- [81] Stejskal J, Sapurina I, Prokeš J, Zemek J. In-situ polymerized polyaniline films. *Synthetic Metals*. 1999; 105(3): 195-202.
- [82] Stejskal J, Sapurina I, Trchová M. Polyaniline nanostructures and the role of aniline oligomers in their formation. *Progress in Polymer Science*. 2010; 35: 1420–1481.
- [83] Laslau C, Zujovic ZD, Travas-Sejdic J. Polyaniline “nanotube”self-assembly: the stage of granular agglomeration on nanorodtemplates. *Macromolecular Rapid Communications*. 2009; 30: 1663–8.
- [84] Stejskal J, Trchová M, Fedorova S, Sapurina I, Zemek J. Surface polymerization of aniline on silica gel. *Langmuir*. 2003; 19: 3013–8.
- [85] Mazur M, Predeep P. Surface selective chemical deposition of polyanilines. *Polymer* 2005; 46: 1724–30.
- [86] Neri DFM, Balcão VM, Dourado FOQ, Oliveira JMB, Carvalho JB Jr, Teixeira JA. Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. 2011; 70: 74–80.
- [87] Sim B, Chae HS, Choi HJ. Fabrication of polyaniline coated iron oxide hybrid particles and their dual stimuli-response under electric and magnetic fields. *Express Polymer Letters*. 2015; 9 (8): 736–743.
- [88] Talekar S, Ghodake V, Ghotage T, Rathod P, Deshmukh P, Nadar S, Mulla M, Ladole M. Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase. *Bioresource Technology*. 2012; 123: 542–547
- [89] Takkinen, K., Pettersson, R.F., Kalkkinen, N., Palva, I., Soderlund, H., Kaariainen, L., 1983. Amino acid sequence of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene. *J. Biol. Chem.* 1982; 258: 1007–1013.
- [90] Guo H, Tang Y, Yu Y, Xue L, Qian J. Covalent immobilization of α -amylase on magnetic particles as catalyst for hydrolysis of high-amylose starch. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016; 87: 537-544.
- [91] Singh V, Rakshit K, Rathee S, Angmo S, Kaushal S, Garg P, Chung JH, Sandhir R, Sangwan RS, Singhal N. Metallic/bimetallic magnetic nanoparticle functionalization for immobilization of α -amylase for enhanced reusability in bio-catalytic processes. *Bioresource Technology*. 2016; 214: 528-533.

- [92] Mizuki T, Watanabe N, Nagaoka Y, Fukushima T, Morimoto H, Usami R, Maekawa T. Activity of an enzyme immobilized on superparamagnetic particles in a rotational magnetic field. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010; 393(4), 779-782.
- [93] Husain Q. Nanomaterials as novel supports for the immobilization of amylolytic enzymes and their applications: A review. *Biocatalysis*. 2017; 3: 37–53.
- [94] Prakasham RS, Devi GS, Laxmi KR, Rao CS. Novel synthesis of ferric impregnated silica nanoparticles and their evaluation as a matrix for enzyme immobilization. *J Phys Chem C*. 2007; 111:3842-3847.
- [95] Namdeo M, Bajpai SK. Immobilization of α -amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study. *J Mol Catal B: Enzym*. 2009; 59(1-3):134-139.
- [96] Mukherjee AK, Kumar TS, Rai SK, Roy JK. Statistical optimization of *Bacillus alcalophilus* α -amylase immobilization on iron-oxide magnetic nanoparticles. *Biotechnol Biopr Eng*. 2010; 15:984-992.
- [97] Khan MJ, Husain Q, Azam A. Immobilization of Porcine Pancreatic α -amylase on Magnetic Fe₂O₃ Nanoparticles: Applications to the Hydrolysis of Starch. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012; 17: 377-384.
- [98] Jalal A, Milani ZM, Goharshadi EK. Immobilization of α -amylase onto magnetic nanoparticles by shaking method. *Ist National Iran New Chem Cong, Shiraz Iran 5-6th May, 2013*.
- [99] Kim H, Lee JH. Development of (α -amylase coated magnetic nanofiber for the hydrolysis of starch. *J Life Sci*. 2007; 17(9):1260-1265.
- [100] Uygun DA, Öztürk N, Agköl S, Denizli A. Novel Magnetic Nanoparticles for the Hydrolysis of Starch with *Bacillus licheniformis* α -Amylase. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012; 123, 2574-2581.
- [101] Chen YH, Chi MC, Wang TF, Chen JC, Lin LL. Preparation of magnetic nanoparticles and their use for immobilization of C-terminally lysine-tagged *Bacillus* sp. TS-23 α -amylase. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012; 166(7):1711-22.
- [102] Lee MH, Thomas JL, Chen YC, Wang HY, Lin HY. Hydrolysis of magnetic amylase-imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) composite nanoparticles. *ACS Appl Mater Interf*. 2012; 4(2):916-21.

- [103] Zhang Q, Han X, Tang B. Preparation of a magnetically recoverable biocatalyst support on monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles. *RSC Adv.* 2013; 3:9924-9931.
- [104] Sohrabi N, Rasouli N, Torkzadeh M. Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Chem Eng J.* 2014; 240:426-433.
- [105] Swarnalatha V, Esther RA, Dhamodharan R. Immobilization of α -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles, an easily recoverable and reusable support. *J Mol Catal B: Enzym.* 2013; 96:6-13.
- [106] Baskar G, Banu NF, Leuca GH, Gayathri V, Jeyashree N. Magnetic immobilization and characterization of α -amylase as nanobiocatalyst for hydrolysis of sweet potato starch. *Biochem Eng J.* 2015; 102:18-23.
- [107] Akhond M, Pashangeh K, Karbalaeei-Heidari HR, Absalan G. Efficient immobilization of porcine pancreatic α -amylase on amino-functionalized magnetite nanoparticles: Characterization and stability evaluation of the immobilized enzyme. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016; 180(5):954-968.
- [108] Eslamipour F, Hejazi P. Evaluating effective factors on the activity and loading of immobilized α -amylase onto magnetic nanoparticles using a response surface-desirability approach. *RSC Adv.* 2016; 6: 20187-20197.
- [109] Li Y, Chen Y, Xiao C, Chen D, Xiao Y, Mei Z. Rapid screening and identification of α -amylase inhibitors from *Garcinia xanthochymus* using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014; 960:166-73.
- [110] Maciel JC, Mercês AAD, Cabrera M, Shigeyosi WT, Souza SD, Olzon-Dionysio M, Fabris JD, Cardoso CA, Neri DFM, Silva MPC, Carvalho LB Jr. Magnetic nanoparticles coated with polyaniline to stabilize immobilized trypsin. *Hyperfine interact.* 2016; 237 (3): 3
- [111] Gvozdenović M, Jugović B, Bezbradica D, Antov M, Knežević-Jugović Z, Grgur B. Electrochemical determination of glucose using polyaniline electrode modified by glucose oxidase. *Food Chem.* 2011; 124: 396–400.
- [112] Bezbradica D, Jugović B, Gvozdenović M, Jakovetić S, Knežević-Jugović Z. Electrochemically synthesized polyaniline as support for lipase immobilization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2011; 70: 55–60.

- [113] Ashly PC, Joseph MJ, Mohanan PV. Activity of diastase α -amylase immobilized on polyanilines (PANIs). *Food Chemistry*. 2011; 127: 1808–1813.
- [114] Khan JA, Husain Q, Ansari SA. Polyaniline-assisted silver nanoparticles: A novel support for the immobilization of α -amylase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97:1513-1522; 2013.
- [115] Pascoal AM, Mitidieri S, Fernandes KF. Immobilisation of α -amylase from *Aspergillus niger* onto polyaniline. *Food and Bioproducts Processing*. 2011; 89: 300-306
- [116] Delgado-Povedano MM, Luque de Castro MD. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 889: 1-21.
- [117] Islam MN, Zhang M, Adhikari B. The inactivation of enzymes by ultrasound-a review of potential mechanisms. *Food Reviews International*. 2014; 30: 1-21.
- [118] Mawson R, Gamage M, Shiferaw N, Knoerzer K. Ultrasound in enzyme activation and inactivation. In H. Feng, G. Barbosa-Canovas, & J. Weiss (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 369-404). New York: Springer-Verlag. 2011. p.369-404
- [119] Bashari M, Eibaid A, Wanga J, Tian Y, Xu X, Jin Z. Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013; 20: 155–161.
- [120] Alves J, Garcia-Galan C, Schein M, Silva A, Barbosa O, Ayub MA, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Combined effects of ultrasound and immobilization protocol on butyl acetate synthesis catalyzed by CALB. *Molecules*. 2014; 19: 9562.
- [121] Martins AB, Schein MF, Friedrich JLR, Fernandez-Lafuente R, Ayub MAZ, Rodrigues RC. Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: Enhanced activity and operational stability. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013; 20: 1155-1160.
- [122] Fallavena LP, Antunes FHF, Alves JS, Paludo N, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues R. Ultrasound technology and molecular sieves improve the thermodynamically controlled esterification of butyric acid mediated by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *RSC Advances*. 2014; 4: 8675-8681.
- [123] Wang J, Cao Y, Sun B, Wang C, Mo Y. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2011; 18: 534–540.
- [124] Mason TJ. Some neglected or rejected paths in sonochemistry – a very personal view. *Ultrason. Sonochem.* 2015; 25: 89–93.

- [125] Barton S, Bullock C, Weir D. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996; 18: 190-194.
- [126] Leaes EX, Lima D, Miklasevicius L, Ramon AP, Pra' VD, Bassaco MM, Terra LM, Mazutti MA. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2013; 2: 21–25
- [127] Oliveira HM, Correia VS, Segundo MA, Fonseca AJM, Cabrita ARJ. Does ultrasound improve the activity of alpha amylase? A comparative study towards a tailor-made enzymatic hydrolysis of starch. *LWT - Food Science and Technology*. 2017; 84: 674-685.
- [128] Yoo YJ, Hong J, Hatch RT. Comparison of α -amylase activities from different assay methods. *Biotechnology and Bioengineering*. 1987; 30: 147–151.
- [129] Lowry H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265–275.
- [130] Raita M, Arnthong J, Champreda V, Laosiripojana N. Modification of magnetic nanoparticle lipase designs for biodiesel production from palm oil. *Fuel Processing Technology*. 2015; 134: 189–197.
- [131] Jiang J, Li L, Zhu M. Polyaniline/magnetic ferrite nanocomposites obtained by in situ polymerization. *Reactive and Functional Polymers*. 2008; 68: 57–62.
- [132] Rana S, Jadhav NV, Barick KC, Pandey BN, Hassan PA. Polyaniline shell cross-linked Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for heat activated killing of cancer cells. *Dalton Trans*. 2014; 43: 12263-12271.
- [133] Wang J, Meng G, Tao K, Feng M, Zhao X. Immobilization of Lipases on Alkyl Silane Modified Magnetic Nanoparticles: Effect of Alkyl Chain Length on Enzyme Activity. *PLoS ONE*. 2012; 7(8): e43478. doi:10.1371/journal.pone.0043478
- [134] Lee JC, Timasheff SN. The stabilization of proteins by sucrose. *Journal of Biological Chemistry*. 1981; 256(14): 7193-7201.
- [135] Lin TY, Timasheff SN. On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Science*. 1996; 5(2): 372-381.
- [136] Erickson HP. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological procedures online*. 2009; 11(1): 32-51.

- [137] Zhang X, Bai R, Tong YW. Selective adsorption behaviors of proteins on polypyrrole-based adsorbents. *Separation and Purification Technology*. 2006; 52(1): 161–9.
- [138] Secundo F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42: 6250-6261.
- [139] Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*. 2007; 28(31): 4600-4607.
- [140] Aksoy S, Tümtürk H, Hasirci N. Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *Journal of Biotechnology*. 1998; 60: 37-46.
- [141] Tümtürk H, Aksoy S, Hasirci N. Covalent Immobilization of α -Amylase onto Poly(methyl methacrylate-2-hydroxyethyl methacrylate) Microspheres and the Effect of Ca^{2+} Ions on the Enzyme Activity. *Starch/Stärke*. 1999; 51: 211-217.
- [142] Tümtürk H, Çaykara T, Kantoğlu O, Güven O. Adsorption of α -amylase onto poly(N-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. 1999; 151: 238-241.
- [143] Tümtürk H, Çaykara T, Şen M, Güven O. Adsorption of α -amylase onto poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry*. 1999; 55: 713-716.
- [144] Hasirci N, Aksoy S, Tümtürk H. Activation of poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of α -amylase. *Reactive and Functional Polymers*. 2006; 66: 1546–1551.
- [145] Antony N, Balachandran S, Mohanan PV. Immobilization of diastase α -amylase on nano zinc oxide. *Food Chemistry*. 2016; 211: 624–630.

Биографија аутора

Мирјана Н. Радовановић рођена је 14. јула 1984. године у Ивањици где је завршила основну школу и гимназију 2003. године. Агрономски факултет у Чачку Универзитета у Крагујевцу уписала је 2003. године, а дипломирала 2008. године на смеру Технологија пољопривредних и прехранбених производа са просечном оценом 9,15. Дипломски рад на тему „Производња јабуковог сирћета уз помоћ квасца *Saccharomyces cerevisiae*“ одбранила је са оценом 10 (десет). Докторске студије уписала је 28.10.2008. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Положила је све предвиђене испите и Завршни рад са просечном оценом 9,73.

Од 21.10.2008. године запослена је на Агрономском факултету у Чачку Универзитета у Крагујевцу као сарадник у настави. У звање асистента изабрана је 08.03.2011. године на истом факултету за ужу научну област Технологија биљних сировина. Тренутно је запослена на Агрономском факултету у Чачку Универзитета у Крагујевцу у звању асистента.

Током досадашњег истраживачког рада ангажована је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, број ИИИ 46010 под називом: „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (2011-2018).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Мирјана Радовановић

Број индекса 4031/2008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама

модификованим полианилином“

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

Потпис аутора

У Београду, 25.06.2018.

M. Radovanovic

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирјана Радовановић

Број индекса 4031/2008

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада „Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“

Ментор проф.др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 25.06.2018.



Изјава о коришћењу

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

„Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама

модификованим полианилином“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 25.06.2018.

