

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Jovana J. Trbojević Ivić

**Novi aspekti upotrebe hidroksiapatita kao nosača za
imobilizaciju industrijski značajnih lipaza i
glikozidaza – dizajn, ispitivanje mehanizma vezivanja,
stabilnost, primena i značaj**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Jovana J. Trbojević Ivić

**Novel aspects of use of hydroxyapatite as an
immobilization carrier for industrially important
lipases and glycosidases – design, study of binding
mechanism, stability, application and relevance**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

KOMISIJA ZA ODBRANU

Mentor:

Dr Marija Gavrović Jankulović, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi Komisije:

Dr Zoran Vujčić, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Radivoje Prodanović, vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Ljubodrag Vujisić, docent

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Dejan Bezbradica, redovni profesor

Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom redovnog profesora dr Marije Gavrović Jankulović. Rezultati, predstavljeni u disertaciji, dobijeni su tokom istraživanja u okviru projekta: „*Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki važni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj*“, koji je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Dr Mariji Gavrović Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem na ukazanom poverenju i podršci tokom mog celokupnog rada u njenoj istraživačkoj grupi, koji su rezultirali izradom ove teze.

Dr Zoranu Vujčiću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem na veoma korisnim sugestijama i savetima tokom analize ove doktorske disertacije.

Dr Radivoju Prodanoviću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem na uloženom vremenu i savetima tokom analize ove doktorske disertacije.

Dr Ljubodragu Vujisiću, docentu Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i njegovim kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, zahvaljujem na trudu i vremenu uloženom u strukturnu karakterizaciju jedinjenja opisanih u ovoj doktorskoj disertaciji, kao i stručnoj pomoći tokom tumačenja dobijenih rezultata.

Dr Dejanu Bezbradici, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu i timu njegovih saradnika sa Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, zahvaljujem na nesebično podeljenom znanju, stručnosti i pomoći na koje sam uvek mogla da računam, a pogotovo tokom realizacije ove doktorske disertacije.

Dr Nenadu Milosaviću, dr Dušanu Veličkoviću i dr Aleksandri Dimitrijević zahvaljujem na neprocenjivoj posvećenosti, razumevanju, strpljenju i pomoći, počevši od planiranja i realizacije eksperimenata, tumačenja rezultata i uobličavanja finalne forme ove doktorske disertacije.

Mr Branku Drakuliću, stručnom saradniku Centra za hemiju na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, posthumno zahvaljujem na znanju i posvećenosti uložnim u molekulsko modelovanje koje je upotpunilo ovu doktorsku disertaciju.

Dr Vladimiru Pavloviću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i rukovodiocu Laboratorije za elektronsku mikroskopiju, zahvaljujem na SEM fotomikrografijama koje su obogatile ovu doktorsku disertaciju.

Svim kolegama i prijateljima sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem što su svojom spremnošću na saradnju, dobronamernošću i vedrinom znatno olakšali i ulepšali izradu ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem osoblju iz Biblioteke, Studentske službe i Magacina Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu – ljudima nevidljivim za nauku, ali bez čije bi topline i vedrine moje studiranje i bavljenje naukom bili neuporedivo teži.

Mojoj dragoj nastavnici srpskog jezika, Nataši Kosanović, zahvaljujem za lekturu ove doktorske disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem mojoj Porodici, Centru mog sveta, i njima posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

Beograd, jul 2019.

Jovana Trbojević Ivić

IZVOD

Novi aspekti upotrebe hidroksiapatita kao nosača za imobilizaciju industrijski značajnih lipaza i glikozidaza - dizajn, ispitivanje mehanizma vezivanja, stabilnost, primena i značaj

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitan potencijal HAP za imobilizaciju industrijski značajnih enzima na primeru 4 lipaze i 4 glikozidaze različitog porekla, strukture i supstratne specifičnosti. Od testiranih enzima za HAP se najefikasnije vezuju lipaza iz *Candida rugosa* (CRL) i β -galaktozidaza (laktaza) iz *Aspergillus oryzae* (AOL). Oba enzima se imobilizuju na HAP jednostavnom, brzom i efikasnom fizičkom adsorpcijom po mehanizmu metal-koordinatne veze. Kombinovanjem bioinformatičkog pristupa i molekuskog modelovanja za oba enzima su identifikovani i opisani površinski HAP-vezujući motivi.

Imobilizacija na HAP je uzrokovala promenu supstratne specifičnosti CRL ka supstratima sa kraćim alkil-nizom i drastično povećanje stabilnosti i aktivnosti enzima u metanolu. Ove karakteristike imobilizata CRL na HAP (CRL-HAP) su prvi put u literaturi primenjene za sintezu metil-acetata, estra sa mirisom jabuke, koga slobodna CRL sintetiše u zanemarljivom prinosu. Pažljivim odabirom rastvarača i supstrata je, takođe po prvi put pokazano kako ovaj popularni i jeftin enzim, u slobodnom ili imobilizovanom obliku, može da se primeni i za efikasnu sintezu kapsinoida direktnom esterifikacijom vanilil-alkohola (VA) i masnih kiselina (MK) i transesterifikacijom kokosovog ulja.

Efikasnost imobilizovanog preparata AOL (AOL-HAP) je ispitana u sintezi bioaktivnih supstanci, vanilil-galaktozida (VG) i galakto-oligosaharida (GOS). Po efikasnosti u sintezi ovih proizvoda preparat AOL-HAP se našao u rangu sa kovalentno imobilizovanim preparatima AOL. Jedna ista šarža AOL-HAP može se iskoristiti u 10 uzastopnih reakcionih ciklusa sinteze VG, odnosno GOS, sa poluživotom od 15 h.

Ključne reči: hidroksiapatit, imobilizacija, lipaza, laktaza, stabilizacija, nevodena enzimologija, kapsinoidi, mirisni estri, galaktozidi, galakto-oligosaharidi

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Enzimologija

UDK broj: 577.15.3

ABSTRACT

Novel aspects of use of hydroxyapatite as an immobilization carrier for industrially important lipases and glycosidases – design, study of binding mechanism, stability, application and relevance

Potential of hydroxyapatite (HAP) as immobilization carrier for industrially important enzymes was examined in a study, comprising of 4 lipases and 4 glycosidases of different origin, structure and substrate specificity. Lipase from *Candida rugosa* (CRL) and β -galactosidase (lactase) from *Aspergillus oryzae* (AOL) exhibited the most efficient binding to HAP. Both of the enzymes were immobilized on HAP by simple, fast and efficient physical adsorption through formation of metal-coordinative bond. Furthermore, by the combining of bioinformatic approach and molecular modeling, HAP-specific superficial motif on both selected enzymes was identified and described for the first time in the literature.

Immobilization on HAP has shifted substrate specificity of CRL towards shorter alkyl-chains, coupled with significant increase in stability and activity of CRL in methanol. These characteristics of immobilized *Candida rugosa* lipase preparation (CRL-HAP) were successfully implemented in synthesis of methyl-acetate, an apple flavour for the first time in the literature. Free CRL synthesized methyl-acetate in very low yield, because of methanol-induced inactivation. By a meticulous selection of organic solvent and substrates, it was shown also for the first time that this popular and cost-effective microbial lipase, free or immobilized on HAP, can be used for efficient synthesis of capsinoids in two distinctive reactions: direct esterification of vanillyl-alcohol (VA) with free fatty acids and transesterification of coconut oil.

Efficiency of AOL immobilized on HAP (AOL-HAP), was evaluated in synthesis of bioactive compounds: vanillyl-galactoside (VG) and galacto-oligosaccharide (GOS) probiotics. Efficiency of AOL-HAP in synthesis of these compounds was in a good correlation with the procedures in which covalently immobilized AOL was employed. Immobilized AOL preparation can be used in maximum 10 consecutive reaction cycles during VG and GOS synthesis, with the half-life of 15 hours.

Key words: hydroxyapatite, immobilization, lipase, lactase, stabilization, non-aqueous enzymology, capsinoids, aroma esters, galactosides, galacto-oligosaccharides

Scientific Field: Biochemistry

Scientific Subfield: Enzymology

UDC Number: 577.15.3

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1 Mehanizam dejstva katalizatora	2
2.2 Enzimi kao industrijski katalizatori nove generacije	3
2.2.1 Poređenje osobina enzima i klasičnih hemijskih katalizatora	4
2.2.2 Značaj hidrolitičkih enzima u industrijskim transformacijama	5
2.2.3 Industrijske transformacije katalizovane lipazama	6
2.2.3.1 Strukturna svojstva najznačajnijih industrijskih lipaza	6
2.2.3.1.1 Lipaze iz <i>Candida rugosa</i>	7
2.2.3.1.2 Lipaze iz <i>Candida antarctica</i>	9
2.2.3.1.3 Lipaza iz <i>Pseudomonas cepacia</i>	10
2.2.3.1.4 Lipaza iz pankreasa svinje	11
2.2.3.2 Katalitički mehanizam lipolitičkih reakcija	13
2.2.3.3 Primena lipaza u hidrolizi	14
2.2.3.4 Primena lipaza u sintezi	15
2.2.3.4.1 Značaj kapsinoida	15
2.2.3.4.2 Značaj mirisnih estara	17
2.2.4 Industrijske transformacije katalizovane glikozidazama	18
2.2.4.1 Strukturna svojstva najznačajnijih industrijskih glikozidaza	19
2.2.4.1.1 α -Glukozidaza iz <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Maltaza)	19
2.2.4.1.2 β -Glukozidaza iz badema (<i>Prunus dulcis</i>)	19
2.2.4.1.3 β -Galaktozidaza iz <i>Aspergillus oryzae</i> (Laktaza)	20
2.2.4.1.4 β -Fruktofuranozidaza iz <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Invertaza)	21
2.2.4.2 Katalitički mehanizam glikolitičkih reakcija	22
2.2.4.3 Primena glikozidaza u hidrolizi	23
2.2.4.4 Primena glikozidaza u sintezi	23
2.2.4.4.1 Značaj galaktozida vanilil-alkohola	24
2.2.4.4.2 Značaj galakto-oligosaharida	25
2.3 Enzimski kataliza u nevedenim reakcionim sistemima	26
2.3.1 Biokataliza u organskim rastvaračima	27
2.3.1.1 Uticaj organskih rastvarača na stabilnost i aktivnost enzima	27
2.3.2 Biokataliza u jonskim tečnostima, superkritičnim tečnostima i reverznim micelama	29
2.3.3 Upotreba najvažnijih industrijskih lipaza i glikozidaza za biološke transformacije u nevedenim reakcionim sistemima	30
2.4 Strategije za poboljšanje efikasnosti enzima u industrijskim transformacijama	31
2.4.1 Hemijske modifikacije	32
2.4.2 Proteinski inženjering	32
2.4.3 Imobilizacija enzima	33
2.4.3.1 Metode za imobilizaciju enzima	34

2.4.3.2	Osobine, vrsta i kriterijumi za odabir nosača za imobilizaciju	36
2.4.3.3	Primena imobilizovanih lipaza i glikozidaza	39
2.4.3.4	Prednosti i ograničenja imobilizovanih enzima	40
2.5	Hidroksiapatit kao nosač za imobilizaciju proteina	43
2.5.1	Struktura hidroksiapatita	43
2.5.2	Vrste interakcija između hidroksiapatita i proteina	45
2.5.2.1	Elektrostatičke interakcije u hidroksiapatit-protein kompleksu	46
2.5.2.2	Metal-koordinatna veza	47
2.5.3	Hidroksiapatit kao nosač za imobilizaciju enzima u industriji i biomedicini	48
2.6	Ciljevi naših radova	49
3.	NAŠI RADOVI	50
3.1	Imobilizacija lipaza i glikozidaza na hidroksiapatit	50
3.1.1	Odabir lipaze za imobilizaciju na hidroksiapatit	50
3.1.2	Optimizovanje imobilizacije lipaza iz <i>Candida rugosa</i> na hidroksiapatit	53
3.1.3	Odabir glikozidaze za imobilizaciju	57
3.1.4	Optimizovanje imobilizacije laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> na hidroksiapatit	58
3.2	Proučavanje mehanizma interakcija između imobilizovanih enzima i hidroksiapatita	60
3.2.1	Morfološka analiza enzima imobilizovanih na hidroksiapatitu skenirajućom elektronskom mikroskopijom	61
3.2.2	Ispitivanje uslova elucije lipaza iz <i>Candida rugosa</i> sa hidroksiapatita	62
3.2.3	Identifikacija funkcionalnih grupa uključenih u interakcije lipaza iz <i>Candida rugosa</i> i hidroksiapatita	64
3.2.4	Ispitivanje specifičnosti hidroksiapatita prema izoformama lipaza iz <i>Candida rugosa</i> tehnikom LC-MS/MS	65
3.2.5	Identifikacija hidroksiapatit-vezujuće sekvence na izoformi 1 lipaze iz <i>Candida rugosa</i> molekulskim modelovanjem	67
3.2.6	Ispitivanje uslova elucije laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> sa hidroksiapatita	71
3.2.7	Identifikacija hidroksiapatit-vezujuće sekvence na laktazi iz <i>Aspergillus oryzae</i>	72
3.3	Efekat imobilizacije na stabilnost enzima imobilizovanih na hidroksiapatitu	74
3.3.1	Ispitivanje temperaturne stabilnosti lipaza iz <i>Candida rugosa</i> imobilizovanih na hidroksiapatitu	74
3.3.2	Ispitivanje temperaturne stabilnosti laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizovane na hidroksiapatitu	76
3.3.3	Uticaj organskih rastvarača na stabilnost i aktivnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i> imobilizovanih na hidroksiapatitu	78
3.3.4	Stabilnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i> imobilizovanih na hidroksiapatitu tokom kontinuirane hidrolize <i>p</i> -nitrofenil-palmitata	80
3.3.5	Uticaj acetilovanja na stabilnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i> imobilizovanih na hidroksiapatitu	81
3.4	Primena enzima imobilizovanih na hidroksiapatitu u nevedenim reakcionim sistemima	86
3.4.1	Primena lipaza iz <i>Candida rugosa</i> u sintezi kapsinoida	86
3.4.1.1	Ispitivanje supstratne specifičnosti lipaza iz <i>Candida rugosa</i> prema masnim kiselinama	87

3.4.1.3	Strukturna analiza vanilil-laurata	93
3.4.2	Primena lipaza iz <i>Candida rugosa</i> u sintezi kratkolančanih metil-estara	98
3.4.2.1	Ispitivanje supstratne specifičnosti lipaze iz <i>Candida rugosa</i> prema karboksilnim kiselinama	98
3.4.3	Primena laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> u sintezi vanilil-galaktozida	100
3.4.3.1	Strukturna analiza vanilil-galaktozida	101
3.4.3.2	Ispitivanje mogućnosti kontinuirane upotrebe laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizovane na hidroksiapatitu u sintezi vanilil-galaktozida	103
3.4.4	Primena laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> u sintezi galakto-oligosaharida	104
3.4.4.1	Ispitivanje mogućnosti upotrebe imobilizovanog preparata laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> u kontinuiranoj sintezi galakto-oligosaharida	106
3.5	Zaključci	108
4.	EKSPERIMENTALNI DEO	110
4.1	Imobilizacija lipaza i glikozidaza na hidroksiapatit	112
4.1.1	Odabir lipaze za imobilizaciju na hidroksiapatit	112
4.1.1.1	Priprema hidroksiapatita	112
4.1.1.2	Određivanje koncentracije proteina metodom po Bredfordu	113
4.1.1.3	Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti lipaza iz <i>Candida rugosa</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> i pankreasa svinje sa <i>p</i> -nitrofenil-palmitatom	114
4.1.1.4	Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti lipaze B iz <i>Candida antarctica</i> sa <i>p</i> -nitrofenil-butiratom	116
4.1.1.5	Određivanje kapaciteta hidroksiapatita za vezivanje lipaza	116
4.1.2	Optimizovanje imobilizacije lipaza iz <i>Candida rugosa</i> na hidroksiapatit	118
4.1.2.1	Kinetika adsorpcije lipaza iz <i>Candida rugosa</i> na hidroksiapatit	118
4.1.2.2	Imobilizacija lipaza iz <i>Candida rugosa</i> na hidroksiapatit	118
4.1.3	Odabir glikozidaze za imobilizaciju na hidroksiapatit	118
4.1.3.1	Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti maltaze iz <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sa <i>p</i> -nitrofenil- α -D-glukopiranozidom	118
4.1.3.2	Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti β -glukozidaze iz badema sa <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glukopiranozidom	119
4.1.3.3	Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti invertaze iz <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sa saharozom i 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS)	120
4.1.3.4	Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> sa <i>o</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozidom (oNP β DG)	121
4.1.3.5	Određivanje kapaciteta hidroksiapatita za vezivanje glikozidaza	121
4.1.4	Imobilizacija laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> na hidroksiapatit	121
4.2	Proučavanje mehanizma interakcija između imobilizovanih enzima i hidroksiapatita	122
4.2.1	Morfološka analiza enzima imobilizovanih na hidroksiapatit skenirajućom elektronskom mikroskopijom	122
4.2.2	Ispitivanje uslova elucije lipaza iz <i>Candida rugosa</i> sa hidroksiapatita	122
4.2.3	Identifikacija funkcionalnih grupa uključenih u interakcije lipaza iz <i>Candida rugosa</i> i hidroksiapatita	123
4.2.3.1	Reduktivno metilovanje amino-grupa lipaze iz <i>Candida rugosa</i> sa NaBH ₄ i form-aldehidom	123

4.2.3.2	Hemijska modifikacija amino-grupa lipaza iz <i>Candida rugosa</i> sa anhidridom maleinske kiseline	123
4.2.3.3	Uticaj egzogenih karboksilnih grupa na interakcije lipaza iz <i>Candida rugosa</i> i hidroksiapatita	124
4.2.3.4	Hemijska modifikacija karboksilnih grupa lipaza iz <i>Candida rugosa</i> sa 1-etil-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimidom (EDAC)	124
4.2.4	Ispitivanje specifičnosti hidroksiapatita prema izoformama lipaza iz <i>Candida rugosa</i>	125
4.2.4.1	Denaturišuća natrijum dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	125
4.2.4.2	Elektroforeza na gradijentnom gelu	127
4.2.4.3	Poređenje profila izoformi lipaza u komercijalnom i imobilizovanom preparatu lipaza iz <i>Candida rugosa</i> tehnikom LC-MS/MS	129
4.2.5	Identifikacija hidroksiapatit-vezujuće sekvence na izoformi 1 lipaze iz <i>Candida rugosa</i> molekulskim modelovanjem	130
4.2.6	Ispitivanje uslova elucije laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> sa hidroksiapatita	130
4.2.7	Identifikacija hidroksiapatit-vezujuće sekvence na laktazi iz <i>Aspergillus oryzae</i>	131
4.3	Efekat imobilizacije na stabilnost enzima imobilizovanih na hidroksiapatit	131
4.3.1	Ispitivanje temperaturne stabilnosti lipaza iz <i>Candida rugosa</i> imobilizovanih na hidroksiapatitu	131
4.3.2	Ispitivanje temperaturne stabilnosti laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizovane na hidroksiapatitu	131
4.3.3	Uticaj organskih rastvarača na stabilnost i aktivnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i> imobilizovanih na hidroksiapatitu	132
4.3.3.1	Stabilnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i> u organskim rastvaračima	132
4.3.3.2	Aktivnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i> u organskim rastvaračima	132
4.3.4	Stabilnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i> imobilizovanih na hidroksiapatitu tokom kontinuirane hidrolize <i>p</i> -nitrofenil-palmitata	133
4.3.5	Uticaj acetilovanja na stabilnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i>	133
4.3.5.1	Acetilovanje lipaza iz <i>Candida rugosa</i> sa anhidridom sirćetne kiseline	133
4.3.5.2	Uticaj acetilovanja na temperaturnu stabilnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i>	133
4.3.5.3	Uticaj acetilovanja na stabilnost lipaza iz <i>Candida rugosa</i> imobilizovanih na hidroksiapatitu tokom kontinuirane hidrolize <i>p</i> -nitrofenil-palmitata	134
4.4	Primena enzima imobilizovanih na hidroksiapatitu u nevodnim reakcionim sistemima	134
4.4.1	Primena lipaza iz <i>Candida rugosa</i> u sintezi kapsinoida	134
4.4.1.1	Ispitivanje supstratne specifičnosti lipaza iz <i>Candida rugosa</i> prema masnim kiselinama tokom esterifikacije vanilil-alkohola	134
4.4.1.1.1	Praćenje toka esterifikacije vanilil-alkohola HPLC metodom	135
4.4.1.2	Optimizovanje reakcionih uslova za sintezu vanilil-laurata	135
4.4.1.3	Strukturna analiza vanilil-laurata	136
4.4.1.3.1	Prečišćavanje vanilil-laurata preparativnom HPLC	136
4.4.1.3.2	Strukturna karakterizacija vanilil-laurata NMR metodom	136
4.4.1.4	Obogaćivanje kokosovog ulja kapsinoidima	137
4.4.1.4.1	Praćenje toka reakcije HPLC metodom	137
4.4.2	Primena lipaza iz <i>Candida rugosa</i> u sintezi kratkolančanih metil-estara	138
4.4.2.1	Ispitivanje supstratne specifičnosti preparata lipaza iz <i>Candida rugosa</i> prema karboksilnim kiselinama	138
4.4.2.1.1	Praćenje toka reakcije i detekcija nastalih proizvoda metodom GC/MS	138

4.4.3	Primena laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> u sintezi vanilil-galaktozida	139
4.4.3.1	Strukturna analiza vanilil-galaktozida	139
4.4.3.1.1	Praćenje toka galaktozilacije HPLC metodom	139
4.4.3.1.2	Prečišćavanje proizvoda reakcije preparativnom HPLC metodom	139
4.4.3.1.3	Strukturna karakterizacija vanilil-alkohola NMR metodom	140
4.4.3.2	Ispitivanje mogućnosti kontinuirane upotreba laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizovane na hidroksiapatitu u sintezi vanilil-galaktozida	140
4.4.4	Primena laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> u sintezi galakto-oligosaharida	141
4.4.4.1	Praćenje toka reakcije i identifikacija nastalih proizvoda HPLC metodom	141
4.4.4.2	Ispitivanje mogućnosti kontinuirane upotrebe laktaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizovane na hidroksiapatitu u sintezi galakto-oligosaharida	141
5.	LITERATURA	143
6.	PRILOZI	150
6.1	Strukturna karakterizacija vanilil-laurata	150
6.2	Potvrda strukture metil-etanoata	151
6.3	Strukturna karakterizacija vanilil-galaktozida	152
	BIOGRAFIJA	157
	BIBLIOGRAFIJA	157
	IZJAVE	160

SPISAK SKRAĆENICA U TEKSTU

AA	akrilamid
AOL	laktaza iz <i>Aspergillus oryzae</i>
AOT	bis-(2-etilheksil) natrijum sulfosukcinat/izo-oktan
APS	amonijum-persulfat
BSA	<i>eng.</i> bovine serum albumine
CAL A	lipaza A iz <i>Candida antarctica</i>
CAL B	lipaza B iz <i>Candida antarctica</i>
CBB	<i>eng.</i> coomassie brilliant blue
CRL	lipaze iz <i>Candida rugosa</i>
CTAB	cetiltrimetil amonijum-bromid
DAG	diacil-glicerol
DNS	3,5-dinitro-salicilna kiselina
EDAC	1-etil-(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimid
EF	elektroforeza
EI	<i>eng.</i> electron ionization
ESI	<i>eng.</i> electrospray ionization
EtOH	etanol
FID	<i>eng.</i> flame ionization detector
FOS	frukto-oligosaharidi
GC	gasna hromatografija

GOS	galakto-oligosaharid
HAP	hidroksiapatit
HPLC	<i>eng.</i> high performance liquid chromatography
JT	jonska tečnost
kDa	kilodalton
LC	<i>eng.</i> liquid chromatography
MAG	monoacil-glicerol
MeOH	metanol
MK	masna kiselina
MS	masena spektrometrija
<i>o</i>	orto-položaj
<i>o</i> NPG	orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
OR	organski rastvarač
<i>p</i>	para-položaj
PCL	lipaza iz <i>Pseudomonas cepacia</i>
PDB	<i>eng.</i> Protein Data Bank
PEG	polietilen-glikol
PEI	polietilen-imin
<i>p</i> NPB	para-nitrofenil-butirat
<i>p</i> NPP	para-nitrofenil-palmitat
<i>p</i> NP α DG	para-nitrofenil- α -D-glukopiranozid
<i>p</i> NP β DG	para-nitrofenil- β -D-glukopiranozid

PPL	<i>eng.</i> porcine pancreatic lipase
PUZ	pufer za uzorke
PZE	pufer za elektroforezu
RI	<i>eng.</i> refractive index
RM	reverzna micela
SDS PAGE	<i>eng.</i> sodium-dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	skenirajući elektronski mikroskop
ST	superkrična tečnost
TAG	triacil-glicerol
TEMED	tetramilen-diamin
TMS	tetrametil-silan
TOF	<i>eng.</i> time of flight
Tris	tris (hidroksimetil)-aminoetan
UV	<i>eng.</i> ultraviolet
VA	vanilil-alkohol
VG	vanilil-galaktozid
VIS	vidljiva svetlost
VL	vanilil-laurat

1. UVOD

U proteklim decenijama enzimska tehnologija je učvrstila svoju poziciju među industrijskim procesima, zbog brojnih prednosti enzima u odnosu na klasične hemijske katalizatore. Enzimi su biomakromolekuli sa izraženom supstratnom specifičnošću i vrlo su efikasni katalizatori u blagim reakcionim uslovima. Savremena, ekološki orijentisana industrija je utemeljena na enzimskoj katalizi, a proizvodi dobijeni na ovaj način nose epitet prirodnih. Lipaze i glikozidaze se ubrajaju u najznačajnije industrijske enzime, ali njihovu rasprostranjeniju upotrebu ograničava niska stabilnost u reakcionim sistemima, kakve obično iziskuju industrijski proizvodni procesi.

Nevodena biokataliza je oblast koja se intenzivno razvijala u prethodnim dekadama, zbog toga što enzimi u ovakvoj sredini pokazuju sasvim drugačije katalitičke osobine nego u vodenom rastvoru. Kataliza u nevodenim reakcionim sistemima je posebno važna za hidrolitičke enzime, jer proširuje spektar njihove primene na različite sintetske reakcije. Međutim, da bi se maksimalno iskoristio veliki potencijal enzima u ovim, za njih neprirodnim uslovima, enzimi se moraju dodatno stabilizovati. Premda je dostupan širok dijapazon tehnika za stabilizaciju enzima, uključujući hemijske modifikacije i proteinski inženjering, imobilizacija enzima je najzastupljenija metoda stabilizacije zbog jednostavnosti i velikog broja mogućnosti koje nudi.

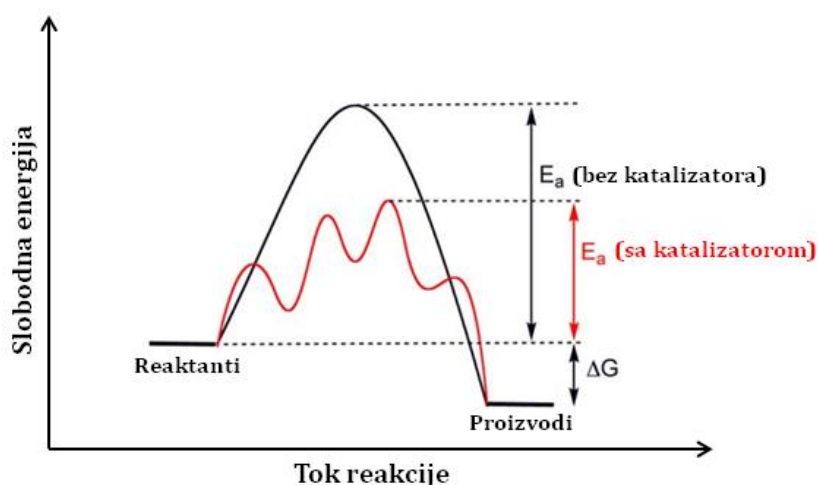
Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita potencijal biokompatibilnog, ekološki prihvatljivog i lako dostupnog nosača, HAP, u stabilizaciji industrijski značajnih lipaza i glikozidaza. Ispitan je i mehanizam interakcija enzim-HAP, kao osnova za dodatno poboljšanje karakteristika imobilizovanih enzimskih preparata. Na kraju je ispitana efikasnost enzima imobilizovanih na HAP u sintezi različitih alifatičnih i aromatičnih estara i glikozida.

2. OPŠTI DEO

Većina hemijskih transformacija unutar živih sistema ili industrijskih postrojenja ne bi bila moguća bez katalizatora. Kataliza je vrlo složen dinamički fenomen: katalizatori ubrzavaju hemijske reakcije, ali se ne ponašaju kao obični reaktanti, budući da se u toku reakcije njihova količina ne menja¹. Oni utiču i na selektivnost hemijskih reakcija, jer dejstvom različitih katalizatora na isti polazni materijal mogu nastati različiti krajnji proizvodi. Razvoj i modernizacija katalizatora su uvek prethodili razvoju industrije, pogotovo danas kada je zaštita životne sredine jedan od velikih izazova sa kojima se susreće savremeno društvo.

2.1 Mehanizam dejstva katalizatora

Da bi do hemijske reakcije došlo, međumolekulski sudari između reaktanata moraju biti efikasni, odnosno imati dovoljno energije da nastane prelazno stanje. Osnovna uloga katalizatora je da smanje energiju aktivacije (E_a). Kada se snizi E_a , učestalost efikasnih međumolekulskih sudara između reaktanata je veća i oni se brže transformišu u prelazno stanje. Efekat katalizatora se najbolje može sagledati kada se uporede reakcioni dijagrami nekatalizovane i katalizovane hemijske reakcije, što je ilustrovano na slici 2.1.



Slika 2.1: Reakcioni dijagrami nekatalizovane i katalizovane hemijske reakcije.

Tokom katalizovane reakcije reaktanti prolaze kroz niz prelaznih stanja, potpuno drugačijih u poređenju sa nekatalizovanom reakcijom. Interakcije između katalizatora i

reaktanata ne smeju da budu ni previše slabe, ni previše jake¹. Ukoliko su interakcije između ova dva entiteta suviše slabe, neće biti kontakta između reaktanata i katalizatora i neće doći do reakcije. Ako su ove interakcije previše jake, kompleks reaktanata i katalizatora se neće dalje razložiti do konačnog proizvoda reakcije.

Katalizatori ne utiču na konstantu ravnoteže hemijske reakcije, niti na termodinamičku barijeru (ΔG) i dostupnu energiju sistema, jer osim što ubrzavaju prevođenje reaktanata u proizvode, istovremeno olakšavaju i povratnu reakciju prevođenja proizvoda preko prelaznog stanja u reaktante¹.

2.2 Enzimi kao industrijski katalizatori nove generacije

Enzimi su proteini sa definisanim aktivnim mestom, u kome se reaktant hemijski transformiše u proizvod. Evolurali su tako da efikasno izvode reakcije pod blagim uslovima, esencijalnim za očuvanje celovitosti bioloških sistema čiji su deo. Ovi prirodni katalizatori vrlo efikasno ubrzavaju hemijske transformacije koje su suviše složene za klasične hemijske katalizatore. Enzimi i cele ćelije mikroorganizama (MO) su najznačajniji industrijski biokatalizatori. Izolovani enzimi imaju veću specifičnost, njihova koncentracija ne zavisi od brzine rasta organizma i može se lako pratiti. Pored toga, jednostavniji su za rukovanje i skladištenje i zato se znatno češće koriste u industrijskim biotransformacijama nego intaktne ćelije MO².

Rapidnom razvoju industrijske enzimske katalize su doprineli³:

- usavršavanje tehnika za izolovanje unutarćelijskih enzima na industrijskoj skali,
- usavršavanje tehnika za bržu pretragu novih biokatalizatora,
- imobilizacija enzima,
- biokataliza u nevodnim reakcionim sistemima i
- proteinski inženjering.

2.2.1 Poređenje osobina enzima i klasičnih hemijskih katalizatora

Enzimi se dobijaju u velikoj količini iz lako dostupnih i obnovljivih izvora, biodegradabilni su i nisu toksični. Enzimski kataliza se odvija u blagim reakcionim uslovima uz izvanrednu katalitičku efikasnost – enzimi mogu ubrzati hemijsku reakciju i do 10^{17} puta. Verovatnoća gubitka proizvoda kroz sporedne reakcije je značajno smanjena u enzimskoj katalizi zbog njihove izrazite supstratne specifičnosti. Enzimi koji funkcionišu na sličnim pH i temperaturama se mogu udružiti u više-enzimske sisteme za izvođenje nekoliko različitih hemijskih reakcija u istom reakcionom sistemu (*eng.* one-pot reaction systems)⁴. Njihova stabilnost, aktivnost i supstratna specifičnost se mogu modulirati proteinskim inženjeringom ili imobilizacijom i tako se dobijaju biokatalizatori „skrojeni po meri korisnika“. Imobilizovani enzimi su heterogeni katalizatori, koji su vrlo jednostavni za manipulaciju tokom biotransformacija u kojima učestvuju⁵.

Industrijski enzimi su pretežno mikrobnog porekla. Za rast mikrobne biomase potrebni su posebni reaktorski sistemi i strogo regulisani uslovi (pH, temperatura, vlažnost, prisustvo kiseonika, sastav hranljive podloge). Kada se ciljni enzim proizvede u dovoljnoj količini, mora se dodatno prečistiti i stabilizovati da bi se mogao primenjivati u reakcionim uslovima koji više pogoduju hemijskim katalizatorima⁶. Pored toga, za maksimalnu enzimsku aktivnost često je neophodno prisustvo različitih kofaktora, što nije slučaj sa hemijskim katalizatorima. U ovom trenutku industrijska primena enzima je ograničena na transformacije u jednom koraku, obično za sintezu ključnog reakcionog intermedijera, koga nije moguće dobiti desjtvom hemijskih katalizatora. Primeri potpune enzimске sinteze složenih proizvoda su veoma retki, jer to zahteva da svi enzimi, uključeni u sintezu, budu obezbeđeni u dovoljnim količinama i da budu stabilni u reakcionim uslovima⁷.

Odabir vrste katalizatora je uslovljen brojnim faktorima: cenom proizvodnog procesa, mogućnostima njihove modifikacije, zakonskom regulativom, specifičnim zahtevima tržišta za određenom vrstom proizvoda i stepenom čistoće krajnjeg proizvoda. Sa industrijske tačke gledišta, proces koji na brz i jednostavan način obezbeđuje visok prinos krajnjeg proizvoda će biti favorizovan bez obzira na vrstu katalizatora. Prema tome,

jasno je da su enzimski i hemijski kataliza podjednako bitne strategije u industrijskim proizvodnim procesima, koje se međusobno prepliću i dopunjuju.

2.2.2 Značaj hidrolitičkih enzima u industrijskim transformacijama

Hidrolitički enzimi čine gotovo 80 % svetskog tržišta industrijskih enzima³. Sirovi preparati hidrolaza su tehnički enzimi u industriji detergenata, papira, tekstila i kože. Tehnička primena hidrolaza se svodi isključivo na razlaganje nečistoća različitog porekla, ili odmašćivanje kože i vune tokom obrade. Na kraju prve dekade 21. veka upravo je tržište tehničkih enzima zabeležilo najveći rast, sa ukupnom zaradom od 1,200 000 000 \$⁸. Prečišćene, dodatno stabilizovane formulacije hidrolitičkih enzima su specijalizovani biokatalizatori u prehrambenoj industriji, u organskim sintezama finih hemikalija za farmaceutsku, poljoprivrednu i kozmetičku industriju ili u proizvodnji stočne hrane⁹.

Svetsko tržište lipaza je jedno od najbrže rastućih među hidrolitičkim enzimima. Procenjuje se da će do 2020. godine, tržište lipaza ostvariti godišnju stopu rasta gotovo 7%, sa ukupnom zaradom na kraju projektovanog perioda od skoro 600 000 000 \$¹⁰. Glavni sektori u kojima se koriste lipaze obuhvataju prehrambenu i farmaceutsku industriju (sa ukupno 42 % udela u primeni), tehničku primenu (15 % udela) i proizvodnju biogoriva (9 % udela)^{11,12,13}.

Glavne delatnosti glikolitičkih enzima su tehnička primena i prehrambena industrija. Glikozidaze su najzastupljeniji hidrolitički enzimi u pekarskoj industriji i očekuje se da će se njihov udeo u ovom sektoru do kraja 2019. godine gotovo udvostručiti. Industrijski koncerni, Central del Latte i Sumimoto, su implementirali laktazu u industrijsku hidrolizu mlečnog šećera sa prinosom od gotovo 80 %. Hidrolizom laktoze se oslobađaju glukoza i galaktoza, pa je mleko slađe i što je još značajnije, mogu ga konzumirati osobe netolerantne na mlečni šećer³. Galaktozidaze i amilaze, zajedno sa ksilanazama imaju važnu ulogu u proizvodnji hrane za životinje, jer povećavaju dostupnost hranljivih supstanci iz ugljohidratnih komponenti stočne hrane¹⁴. Pektinaza, invertaza i glukoamilaza su široko zastupljene u proizvodnji sokova i bezalkoholnih pića, jer potpomažu izbistravanje voćnih sokova i saharifikaciju⁹. Invertaza ima veliki značaj i za konditorsku industriju zbog proizvodnje invertnog sirupa¹⁵. Laktaza i invertaza imaju i važnu funkciju u sintezi GOS i

frukto-oligosaharida (FOS), koji se dodaju kao probiotici da obogate i povećaju zdravstvenu vrednost mlečnih proizvoda^{16,17}.

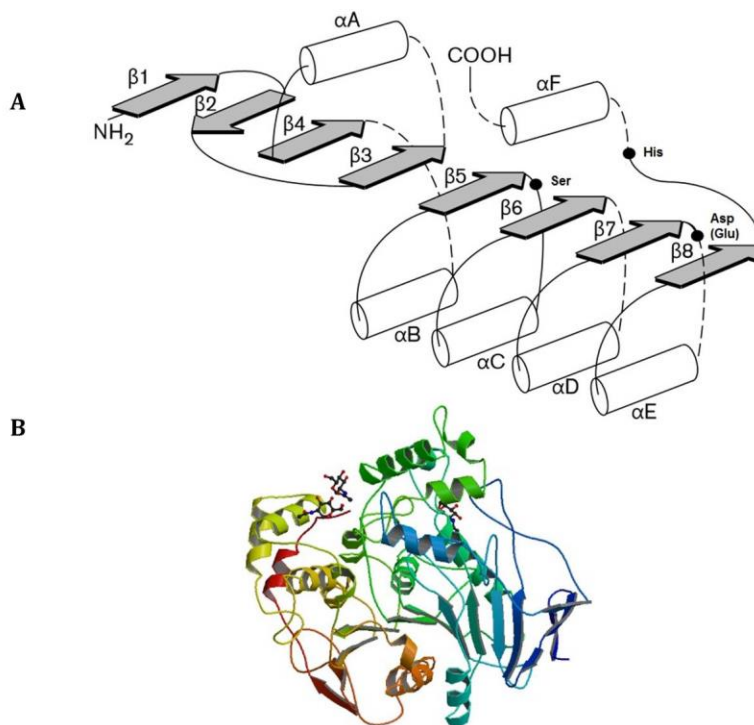
2.2.3 Industrijske transformacije katalizovane lipazama

Lipaze (hidrolaze triacil-glicerola, EC 3.1.1.3) su enzimi čija je primarna funkcija hidroliza triacil-glicerola (TAG) do slobodnih masnih kiselina (MK), mono- ili diacil-glicerola (MAG i DAG, redom) i glicerola. Međutim, lipaze imaju daleko veći industrijski značaj zbog mogućnosti da katalizuju formiranje novih veza, pri čemu kao proizvodi nastaju estri, tioestri, šećerni estri ili amidi¹¹.

Proizvodnja lipaza je inherentna svim živim organizmima, ali su mikrobne lipaze trenutno dominantne u industriji. Mikroorganizmi brzo rastu, nisu mnogo zahtevni u pogledu sastava hranljive podloge, jednostavni su za rad, a dostupan je veliki broj jednostavnih i brzih eseja za praćenje njihove aktivnosti. Lipaze mikrobnog porekla su uglavnom vanćelijske, što značajno olakšava njihovu proizvodnju na industrijskoj skali. Glavni mikrobni proizvođači industrijskih lipaza su bakterije iz rodova *Pseudomonas* i *Bacillus*, odnosno gljive *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, kao i kvasci *Candida*, *Yarrowia*, *Thermomyces*, *Geothricum*, *Pichia* i *Saccharomyces*. Mikrobni proizvođači lipaza se gaje na sintetičkim hranljivim medijumima (pepton, ekstrakt kvasca, sladni ekstrakt) ili agroindustrijskim sporednim proizvodima (melasa, uljana pogača) uz dodatak detergenata, maslinovog ulja ili oleinske kiseline¹⁸. Za proizvodnju mikrobne biomase koriste se bač-reaktori i repetitivni bač-reaktori^{19,20}.

2.2.3.1 Strukturna svojstva najznačajnijih industrijskih lipaza

Zajednička strukturna odlika svih lipaza, bez obzira na njihovo poreklo, je postojanje α/β -hidrolaznog motiva (slika 2.2). Ova struktura se sastoji iz 8 β -pločica koje čine jezgro, okruženo α -heliksima. Sve β -pločice u jezgru su paralelne orijentacije, izuzev druge, koja je anti-paralalena (slika 2.2 A). Centralno β -jezgro je u obliku levo uvijenog superheliksa, tako da su prva i poslednja β -pločica pod uglom od gotovo 90° (slika 2.2 B). Ugao uvijanja je različit kod različitih enzima, ali se najveće devijacije sreću oko β_5 i β_6 pločica. Struktura α C heliksa u centru jezgra je konzervirana, jer on ima vitalnu ulogu u pravilnom postavljanju nukleofilnog Ser iz aktivnog mesta tokom katalize²¹.



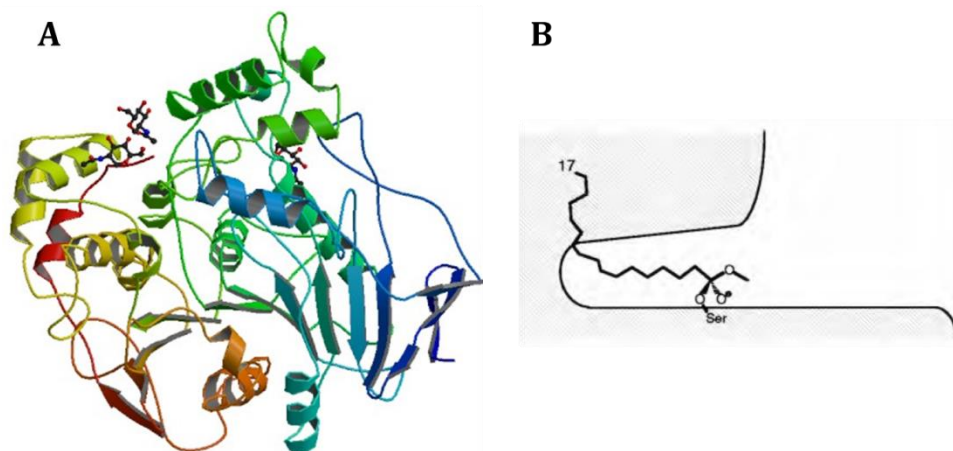
Slika 2.2: α/β Hidrolazni motiv. **A)** Shematski prikaz organizacije α -heliksa i β -pločica²¹; **B)** Trodimenzionalna organizacija α/β hidrolaznog motiva na primeru izoforme 1 lipaze iz *Candida rugosa* u otvorenoj konformaciji – PDB oznaka 1 CRL.

Katalitičku trijadu lipaza čine nukleofilni Ser, His i kiseli ostatak (Asp ili Glu). Nukleofilni ostatak je uvek smešten nakon pločice $\beta 5$, kiseli ostatak nakon pločice $\beta 7$, a konzervirani His nakon poslednje β -pločice (slika 2.2 A). Katalitički aktivan Ser je pozicioniran u oštro savijenom „nukleofilnom laktu“, u kome je lako dostupan supstratu. Strogo definisana geometrija nukleofilnog lakta je važna zbog formiranja šupljine za oksianjon, koju čine atomi azota iz bočnog niza aminokiselina neposredno nakon nukleofila i iz bočnog niza aminokiselina između pločice $\beta 3$ i heliksa αA ²¹.

2.2.3.1.1 Lipaze iz *Candida rugosa*

Candida rugosa (prema ranijoj nomenklaturi *Candida cylindracea*) je jednoćelijski, nesporogeni, pseudofilamentozni i nepatogeni kvasac²². Zavisno od uslova gajenja, ovaj MO može da proizvede do 7 izoformi vanćelijskih lipaza (CRL). Izoforme 1 i 3 se konstitutivno ekspimiraju i dominantne su u komercijalnim preparatima CRL. Na ekspresiju ostalih izoformi utiče sastav podloge za rast biomase: npr. Tween 20 stimuliše ekspresiju izoforme

4, dok oleinska kiselina stimuliše ekspresiju izoforme 5^{23,24}. Sve izoforme CRL su glikozilovani monomeri molekulske mase oko 60 kDa. Glikozidna veza je *N*-tipa, a ugljohidratna komponenta je *N*-acetil-glukozamin. U rastvoru CRL mogu postojati u dve konformacije: otvorenoj (aktivnoj; slika 2.3 A) i zatvorenoj (neaktivnoj), što je posledica specifičnog načina njihove međupovršinske aktivacije kada se nađu na granici faza voda/lipidi²⁵.



Slika 2.3: Strukturalna organizacija lipaze iz *Candida rugosa*. **A)** Trodimenzionalna struktura lipaze 1 u otvorenoj konformaciji - PDB oznaka 1 CRL; **B)** Oblik aktivnog mesta lipaze 1 iz *Candida rugosa* u otvorenoj konformaciji²⁶.

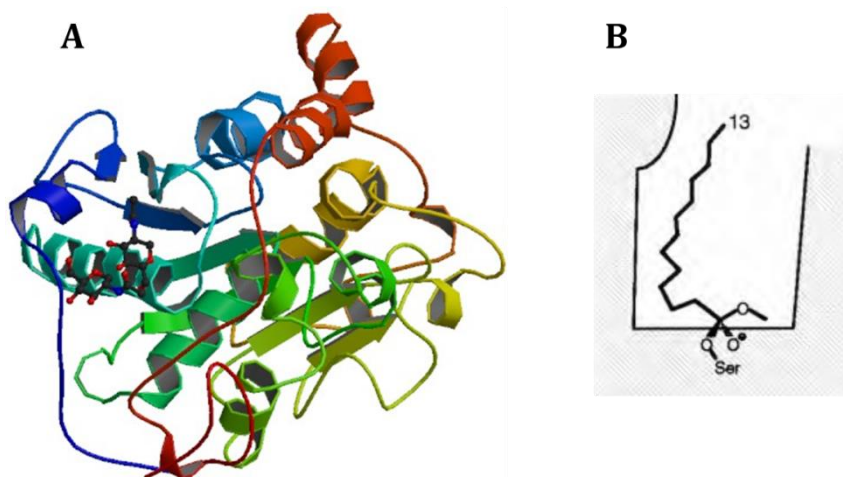
Alifatični lanci supstrata se pozicioniraju u uzani tunel u hidrofobnom džepu aktivnog mesta CRL, u kome se stabilizuje njihova struktura (slika 2.3 B)²⁶. Ulaz u ovaj tunel omeđen je aromatičnim aminokiselinama, a na njegovom dnu su alifatične aminokiseline. Alifatični region je identičan kod različitih izoformi CRL, dok se aromatični regioni hidrofobnog džepa razlikuju po sadržaju Phe. Upravo te razlike određuju različitu supstratnu specifičnost izoformi i finu regulaciju enzimske aktivnosti. Postoje indicije da CRL ima još jedno aktivno mesto van opisanog tunela, za koje se vezuju MK srednjeg i dužeg lanca, dok kraće MK mogu da se vezuju isključivo za aktivni centar čija je struktura rasvetljena²⁷.

Lipaza iz *Candida rugosa* preferencijalno hidrolizuje primarne estarske veze u TAG na pozicijama 1 i 3, ali može hidrolizovati i sekundarnu estarsku vezu na poziciji 2. Takođe, CRL može katalizovati hidrolizu i/ili sintezu estara alkohola i MK različite dužine i zasićenja

alkil-niza. Ovako široka supstratna specifičnost čini CRL jedinstvenom među sličnim katalizatorima, a ujedno objašnjava njenu popularnost u industrijskim biotransformacijama zbog veoma povoljnog odnosa cene i mogućnosti primene u različitim sintezama²².

2.2.3.1.2 Lipaze iz *Candida antarctica*

Candida antarctica (odnedavno reklasifikovana kao *Pseudozyma antarctica*) proizvodi 2 izoforme lipaza različite strukture, supstratne specifičnosti, katalitičke aktivnosti i ponašanja na granici faza voda/lipidi²⁸. Izoforma A (CAL A) je protein molekulske mase 45 kDa sa *pI* 7,5. Temperaturni optimum CAL A je 90°C, a ova izoforma se odlikuje i visokom temperaturnom stabilnošću (nakon 2 h inkubacije na 70°C zadržava 100 % aktivnosti). Specifična aktivnost CAL A je znatno niža nego kod izoforme B (CAL B), pa se CAL A retko koristi u biološkim transformacijama²⁹. Izoforma B (slika 2.4 A) je protein molekulske mase 33 kDa, sa *pI* 6²⁹.



Slika 2.4: Strukturna organizacija lipaze B iz *Candida antarctica*. **A)** Trodimenzionalna struktura lipaze B - PDB oznaka 1 TCA; **B)** Oblik aktivnog mesta lipaze B iz *Candida antarctica*²⁶.

Aktivno mesto CAL B ima oblik levka dimenzija 0,95 x 0,45 nm, čiji su zidovi različitih visina (slika 2.4 B). Dno aktivnog mesta CAL B je hidrofilno, a čine ga Ser iz katalitičke trijade i Asp 134. Ovaj hidrofilni deo, u kome se vezuje karboksilna grupa, okružen je manje hidrofilnim delom koji sadrži dva Thr (40 i 138), Gly 157, Ile 189 i Val 190. Deo aktivnog mesta oko C7-C13 regiona supstrata je hidrofoban i grade ga dva Val (49 i 154), Leu 144 i

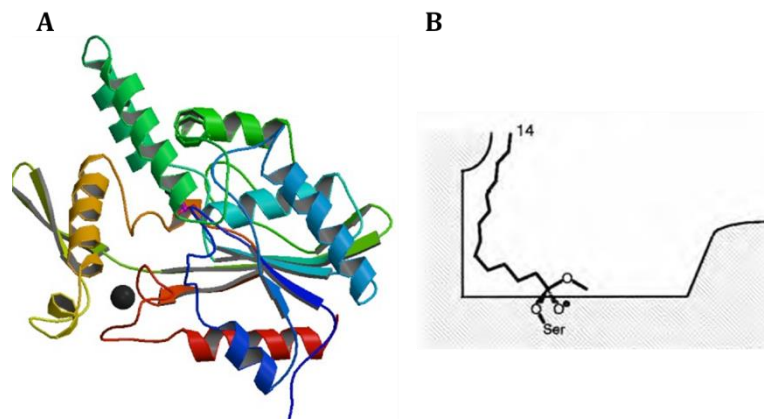
Ile 285. Otvor se sužava u ovom delu i najuži je na mestu gde se vezuje C13 atom acil-donora²⁶.

Donedavno se verovalo da CAL B ne podleže međupovršinskoj aktivaciji. Međutim, Zisis i saradnici su zaključili da se CAL B aktivira prilikom adsorpcije na hidrofobne nosače i da kao supstrate preferira one sa voluminoznim grupama. To su pripisali konformacionoj promeni heliksa $\alpha 5$ (slika 2.2 A), lociranog u blizini aktivnog mesta enzima. Autori su takođe primetili da CAL B pokazuje dvojaku aktivnost: prema supstratima sa kraćim alkilnim, kakav je *p*-nitrofenil-butirat koji se često koristi u enzimskim esejima za CAL B, ova lipaza se ponaša kao obična esteraza, dok se prema voluminoznim supstratima ponaša kao lipaza³⁰.

Lipaza B iz *Candida antarctica* se zbog visoke specifične aktivnosti vrlo često koristi u reakcijama esterifikacije. Zahvaljujući tome, na tržištu su već odavno dostupni komercijalni preparati ovog enzima: Novozyme 435 (proizvođača Novo Nordisk) i Chirazyme (proizvođača Roche Molecular Biochemicals). Ipak, i pored detaljne strukturne karakterizacije i visoke specifične aktivnosti, CAL B još uvek nije zauzela u industriji visoko mesto koje zaslužuje zbog veoma visoke cene pomenutih komercijalnih preparata²⁹.

2.2.3.1.3 Lipaza iz *Pseudomonas cepacia*

Lipaza iz *Pseudomonas cepacia* (prema novoj nomenklaturi *Burkholderia cepacia*) je bakterijska lipaza molekulske mase oko 30 kDa (slika 2.5 A). Aktivno mesto PCL je u obliku širokog levka, dužine 1,7 nm i širine pri dnu 0,45 nm. Dno aktivnog mesta je hidrofilno i omeđeno je katalitički aktivnim Ser 87 i Pro 113. Oko njega se formira šupljina za oksianjon, čiju levu stranu čine Val 266 i 267, a desnu stranu Leu 17 i 167. Supstrat se do C9 atoma veže za hidrofilni deo aktivnog mesta. Od C10-C14 supstrat interaguje sa hidrofobnom površinom aktivnog mesta, koju čine Phe119, Val123 i Leu164²⁶.



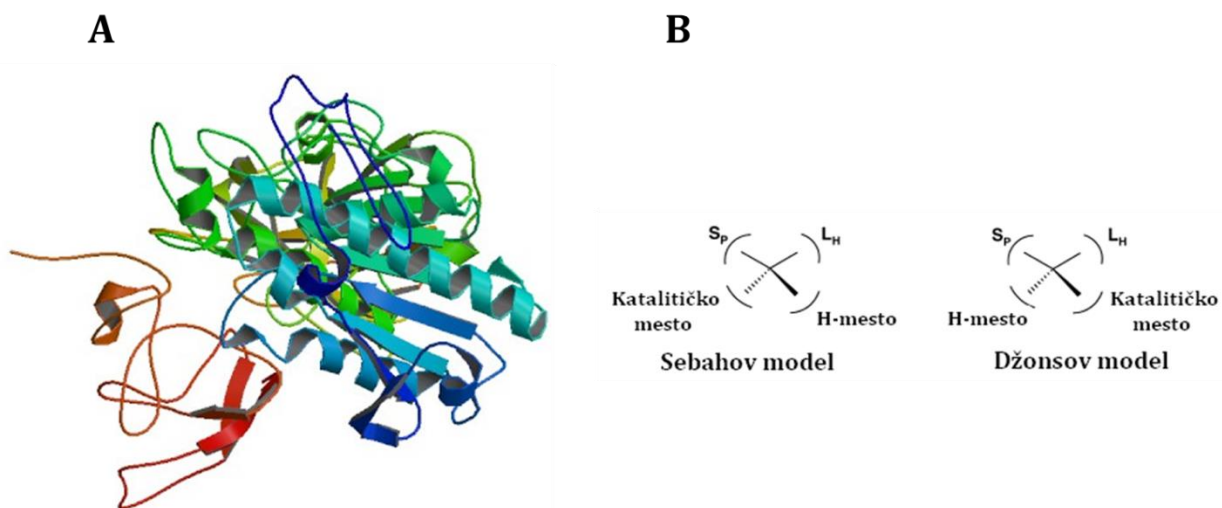
Slika 2.5: Strukturna organizacija lipaze iz *Pseudomonas cepacia*. **A)** Trodimenzionalna struktura lipaze u kompleksu sa inhibitorom RC-(RP, SP)-dibutylkarbamoilglicero-3-O-butylfosfonatom - PDB oznaka 4 LIP; **B)** Oblik aktivnog mesta lipaze iz *Pseudomonas cepacia*²⁶.

Lipaza iz *Pseudomonas cepacia* je izrazito enantioselektivna zbog čega se primenjuje u farmaceutskoj industriji tokom razdvajanja racemskih smeša brojnih fiziološki aktivnih primarnih i sekundarnih alkohola i karboksilnih kiselina. Kombinacijom molekulskog modelovanja i simulirane pseudomolekulske dinamike tokom transesterifikacije etil-estra (*RS*)-2-bromfenil sirćetne kiseline i 1-oktanola u *n*-oktanu, utvrđeno je da ključnu ulogu u enantioselektivnosti PCL igraju Val 266 i Leu 17, koji čine usko grlo u koje se bolje pozicionira *R*-enantiomer³¹. Zbog značaja u proizvodnji lekova, na tržištu su dostupna dva komercijalna preparata PCL – lipaza PS (proizvođač Amano) i lipaza SL (proizvođač Meito-Sangyo).

2.2.3.1.4 Lipaza iz pankreasa svinje

Lipaza iz pankreasa svinje (*eng.* porcine pancreatic lipase, PPL) je industrijski najznačajnija lipaza životinjskog porekla. To je jednolančani globularni protein, molekulske mase oko 50 kDa. Mehanizam aktivacije PPL je znatno drugačiji nego kod prethodno opisanih mirobnih lipaza. Da bi se poklopac podigao i otvorio pristup supstrata aktivnom mestu PPL, esencijalno je prisustvo kolipaze (slika 2.6 A). Kolipaza je proteinski kofaktor od oko 10 kDa. Ona usidrava enzim preko žučnih kiselina za granicu faza voda/lipidi, a sa druge strane pokreće konformacione promene PPL, preko mreže vodoničnih veza koje gradi sa poklopcem³².

Dva modela objašnjavaju geometriju aktivnog mesta i enantioselektivnost PPL: Sebahov i Džonsov model. Oba modela podrazumevaju postojanje identičnih površina za vezivanje supstrata: veliki hidrofobni džep (L_H), mali polarni džep (S_P), H-mesto i katalitičko mesto (slika 2.6 B). Međutim, stereogena mesta u ovim modelima su enantiomeri, što znači da će proizvodi nastali hidrolizom po Sebahovom modelu biti heterohiralni u odnosu na one, dobijene hidrolizom po Džonsovom modelu³³.

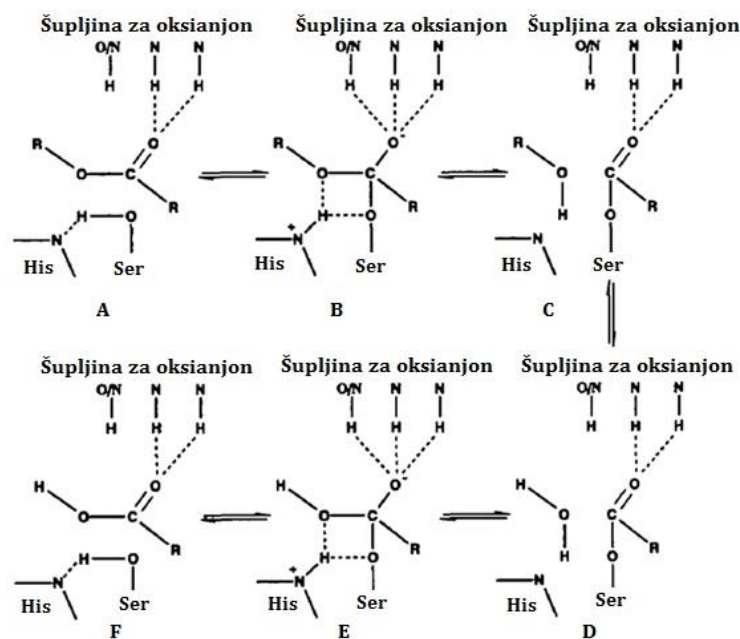


Slika 2.6: Strukturna organizacija lipaze iz pankreasa svinje. **A)** Trodimenzionalna struktura lipaze u kompleksu sa kolipazom – PDB oznaka 1 N8S; **B)** Modeli za opisivanje geometrije aktivnog mesta lipaze iz pankreasa svinje³³.

Lipaza iz pankreasa svinje se odlikuje visokom stabilnošću u organskim rastvaračima, u kojima zadržava aktivnost na 100 °C preko 12 h tokom transesterifikacije tributirina različitim primarnim i sekundarnim alkoholima³. Komercijalno su dostupni sirovi preparati, koji pored PPL sadrže i druge podklase hidrolitičkih enzima (proizvođač Sigma) ili delimično prečišćena PPL, čija je cena dosta visoka³². Međutim, glavni problem koji ograničava rasprostranjeniju upotrebu PPL je veći broj kofaktora, neophodnih za njenu aktivnost.

2.2.3.2 Katalitički mehanizam lipolitičkih reakcija

Katalitičku mašineriju lipaza čine katalitička trijada, šupljina za oksianjon i sistem stabilizujućih vodoničnih veza sa okolnim aminokiselinama. Reakcioni mehanizam lipolitičkih reakcija je shematski predstavljen na slici 2.7.



Slika 2.7: Reakcioni mehanizam lipolitičkih reakcija. **A)** Nekovalentni Mihaelisov kompleks; **B)** Prvi tetraedarski intermedijer; **C)** Formiranje acil-enzima i oslobađanje alkohola; **D)** Napad vode na acil-enzim; **E)** Drugi tetraedarski intermedijer; **F)** Oslobađanje masne kiseline.

Reakcija započinje S_N2 nukleofilnim napadom γ -kiseonika Ser iz katalitičke trijade na karbonylni ugljenik iz estarske veze supstrata, koji postaje sp^3 hibridizovan (slika 2.4 A). Potom His iz katalitičke trijade, kao opšti bazni katalizator deprotonuje γ -kiseonik Ser i nastaje prvi tetraedarski intermedijer (slika 2.4 B), koga stabilizuju okolne aminokiseline preko vodoničnih veza. Nakon toga, His kao opšti kiselinski katalizator protonuje kiseonik supstrata iz tetraedarskog intermedijera, oslobađa se prvi proizvod reakcije (alkohol) i nastaje acil-enzim (slika 2.4 C). Da bi karbonylni ugljenik ostatka supstrata postao ponovo sp^2 hibridizovan, Thr iz okoline aktivnog mesta uspostavlja vodoničnu vezu sa Asp iz katalitičke trijade (2.4 D – 2.4 F). Na kraju, iz acil-enzima se oslobađa i drugi proizvod reakcije (MK), a aktivno mesto se regeneriše za sledeću reakciju.

2.2.3.3 Primena lipaza u hidrolizi

Hidrolitička aktivnost lipaza je važna u industriji detergenata, papirnoj i tekstilnoj industriji (tehnička primena) i prehrambenoj industriji. Za tehničku primenu je bitno da supstratna specifičnost korišćene lipaze bude što užeg opsega, kako bi mogla da hidrolizuje što raznovrsniji spektar lipidnih supstrata. U industriji detergenata je poželjno da lipaze imaju što bazniji pH optimum i niži temperaturni optimum, dok je za papirnu i tekstilnu industriju važno da pH optimumi lipaza budu pomereni ka ekstremnijim pH vrednostima (i u kiselom i u baznom regionu)³⁴. Tri vodeće svetske kompanije su na tržište plasirale bioaktivne detergente koji sadrže lipaze³⁵:

- Lipolase (Novo Nordisk, Danska) – lipaza iz *Thermomyces lanuginosa*, rekombinantno proizvedena u *Aspergillus oryzae*,
- Lumafast (Genecor, SAD) – lipaza iz *Pseudomonas mendocina*, rekombinantno proizvedena u *Bacillus sp.*,
- Lipofast (Advanced Biochemicals, Indija) – sastav nije definisan.

U prehrambenoj industriji hidrolitička aktivnost lipaza doprinosi poboljšanju organoleptičkih svojstava namirnica i smanjenju njihove kalorijske vrednosti, prvenstveno kod mlečnih proizvoda i mesnih prerađevina. Supstratna specifičnost odabrane lipaze određuje finalni ukus namirnice. Lipaze sa većim afinitetom prema supstratima kraćeg lanca hidrolizom oslobađaju MK koje namirnicama daju pikantan ukus. Lipaze sa većim afinitetom prema supstratima srednje dužine lanca hidrolizom oslobađaju proizvode koji hrani daju sapunast ukus¹¹. U pekarskoj industriji, lipaze se koriste za proizvodnju *in situ* emulgatora, koji stabilizuju testo i doprinose njegovoj bujnosti, teksturi i boji. U industriji stočne hrane, lipaze se dodaju kao aditivi za poboljšanje varenja i energetskog metabolizma lipida kod mladih životinja¹⁴.

Lipaze se sve češće koriste i za *ex situ* ili *in situ* bioremedijaciju zemljišta ili vode u blizini pogona za preradu i proizvodnju ulja i životinjske masti. U tu svrhu se najčešće koristi CRL u kombinaciji sa proteazama, amilazama i celulazama. Japanska kompanija, Nihhsin Oil Mills, je razvila metod za konverziju otpadnog jestivog ulja u bezbojni tečni sapun, primenom CRL u prisustvu emulgatora²².

2.2.3.4 Primena lipaza u sintezi

Nevodena kataliza je posebno značajna oblast primene lipaza zbog reakcija esterifikacije, tioesterifikacije, interesterifikacije i transesterifikacije. Estri su fine hemikalije za farmaceutsku, prehrambenu, poljoprivrednu i kozmetičku industriju, ili su sastavne komponente biodizela. Najznačajnije grupe estara, dobijenih primenom lipaza u nevedenoj sredini predstavljene su u tabeli 2.1.

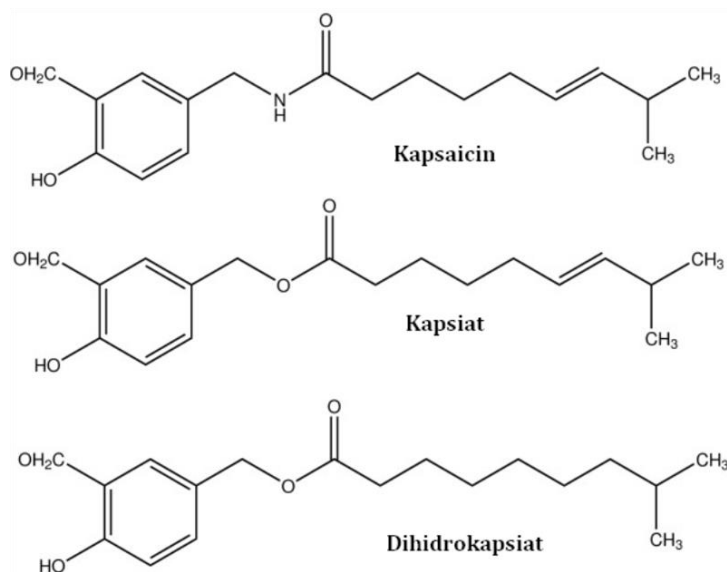
Tabela 2.1: Značajne grupe estara, dobijene primenom lipaza u nevedenoj reakcionoj sredini.

Vrsta proizvoda	Primeri
<i>Lekovi</i>	Estri pinolenske kiseline ³⁶ Estri steroidnih hormona ³⁷ Optički aktivna jedinjenja (ibuprofen, ketoprofen, diltiazem, β -blokatori) ¹¹ Karbovir ²² Solketal ²²
<i>Isparljivi mirisni estri</i>	Geranil-acetat ³⁸ Izoamil-acetat ³⁹
<i>Nutraceutici</i>	Estri polinezasićenih masnih kiselina ⁴⁰ Kapsinoidi ⁴¹ Estri buterne kiseline ⁴²
<i>Biogoriva</i>	Biodizel ⁴³
<i>Strukturirani triacil-gliceroli</i>	Zamena za kakao-maslac i humano mleko ⁴⁴ Margarin sa smanjenim sadržajem <i>trans</i> -masti ⁴⁵
<i>Pesticidi</i>	Fenopropionski herbicidi ¹¹ Feromon moljca ¹¹
<i>Aktivne supstance za kozmetičku industriju</i>	Liposolubilni estri vitamina A, C i E ⁴⁶⁻⁴⁸ Etil-cinamat ⁴⁹
<i>Pomoćne supstance za kozmetičku industriju</i>	Estri šećera ili šećernih alkohola ^{22,50}

2.2.3.4.1 Značaj kapsinoida

Kapsinoidi su grupa fiziološki aktivnih estara vanilil-alkohola (VA) i MK različite dužine, stepena grananja i nezasićenja alkil-niza, koji su strukturni analozi kapsaicina i prirodno su prisutni u slatkom varijetetu paprike (*Capsicum annuum* CH-19).

Najzastupljeniji kapsinoidi u prirodi su kapsiat i dihidrokapsiat⁵¹. Strukturna analogija kapsaicina, kapsiata i dihidrokapsiata je predstavljena na slici 2.8.



Slika 2.8: Strukturna analogija kapsaicina i najzastupljenijih prirodnih kapsinoida.

Kapsinoidi imaju identičnu fiziološku aktivnost kao kapsaicin, jedan od najpoznatijih nutraceutika, ali za razliku od njega ne nadražuju kožu i sluzokožu. Fiziološka aktivnost kapsinoida se ispoljava preko aromatičnog jezgra (poreklom iz VA), estarske grupe i hidrofobnog lanca (poreklom iz MK), a posredovana je aktivacijom TRPV-1 receptora (*eng.* transient receptor potential vanilloid subfamily member-1), široko rasprostranjenog u različitim tkivima. Kapsinoidi imaju važnu ulogu u prevenciji i lečenju gojaznosti, koriste se za smanjenje nivoa holesterola u krvi, štite sluzokožu gastrointestinalnog trakta od oštećenja izazvanih etanolom, imaju hemopreventivno, antioksidativno i antikancerogeno dejstvo^{52,53}.

Kapsinoidi se mogu izolovati iz prirodnih izvora ili sintetisati primenom hemijskih katalizatora i enzima. Izolovanje kapsinoida iz prirodnih izvora je najstarija tehnika proizvodnje, koja je danas ustupila mesto hemijskoj i enzimskoj sintezi. Premda se hemijskom sintezom kapsinoidi mogu dobiti u zadovoljavajućem prinosu, zbog slabe efikasnosti primenjenih katalizatora i problema njihovog odlaganja u životnoj sredini, enzimska sinteza se češće koristi za njihovo dobijanje⁵⁴. U literaturi je trenutno najveći broj

publikacija posvećen primeni CAL B, bilo slobodne, bilo imobilizovane. Istina je da je ovaj enzim izuzetno efikasan u sintezi kapsinoida, ali istovremeno njegova visoka cena predstavlja značajno ograničenje, pa se moraju razvijati protokoli koji uključuju primenu podjednako efikasnih, ali jeftinijih industrijskih lipaza, kao što je CRL^{55,56}.

2.2.3.4.2 Značaj mirisnih estara

Enzimaska sinteza estara dobija na popularnosti, jer po preporuci glavnih regulatornih tela u Evropskoj Uniji (EU) i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), proizvodi dobijeni primenom enzima mogu da nose epitet „prirodni“. Za njihovu proizvodnju se najčešće koriste CRL, PPL i CAL B, imobilizovane različitim metodama i na različite nosače. Jedan sintetički estar ili svega nekoliko njih u kombinaciji efikasno zamenjuje složenu prirodnu aromu, koja može sadržati i do 1000 komponenti. Izoamil-acetat je jedna od najznačajnijih sintetičkih aroma u prehrambenoj industriji, zbog mirisa koji podseća na bananu⁵⁷. Za sintezu ovog jedinjenja koriste se slobodne i imobilizovane lipaze ili cele ćelije MO u nepolarnim organskim rastvaračima, jonskim tečnostima, superkritičnom ugljen-dioksidu, *solvent-free* sistemima i dvofaznim sistemima jonskih tečnosti i nepolarnih organskih rastvarača⁵⁸⁻⁶⁰.

Metil-estri su druga važna grupa industrijskih proizvoda, zato što je metanol, kao sirovina, na svetskom tržištu jeftiniji od etanola. To je od posebnog značaja za proizvodnju biodizela u čijem sastavu su metil-estri dugolančanih masnih kiselina. Metil-estri masnih kiselina su takođe značajni i kao emulgatori za prehrambenu i kozmetičku industriju⁶¹. Metil-estri karboksilnih kiselina, kao što su etanska, propanska ili butanska su proizvodi od interesa za prehrambenu i kozmetičku industriju zbog svog voćnog mirisa⁶². Teorijski, ovi estri bi se lako mogli sintetisati primenom lipaza. Međutim, ova zamisao do sada nije bila sprovedena u praksi, jer je poznato da su dve najznačajnije industrijske lipaze, CRL i CAL B, inhibirane u prisustvu metanola. Efekat metanola na pomenute lipaze je vrlo složen i mora obuhvatiti termodinamičke, molekulske i kinetičke studije⁶¹. Imajući u vidu veliki praktični značaj implementacije lipaza u sintezu ovih proizvoda, otvara se mogućnost za ispitivanje njihove stabilizacije u prisustvu metanola, što je i bio jedan od zadataka tokom izrade ove doktorske disertacije.

2.2.4 Industrijske transformacije katalizovane glikozidazama

Glikozidaze (hidrolaze glikozida, EC 3.2.1.X), poput lipaza imaju dvojak industrijski značaj, jer zavisno od vrste reakcionog sistema mogu katalizovati hidrolizu ili sintezu novih glikozidnih veza u reakcijama reverzne hidrolize i transglikozilacije⁶³. One isto tako pokazuju široku supstratnu specifičnost prema različitim aglikonima: alkoholima, alkaloidima ergota, hidroksi-aminokiselinama, nukleozidima, kardiogeninima, oksimima, tiolima, ali i sintetičkim donorima – piranoidnim glikalima⁶⁴. Najvažniji izvori industrijski relevantnih glikozidaza su: emulzin badema (*Prunus dulcis*) kao izvor β -glukozidaze; bakterije iz rodova *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Halobacterium*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*; gljive iz rodova *Aspergillus* (laktaza), *Rhizopus*. (glukoamilaze), ili kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (maltaza, invertaza)⁶⁵. Tehnike za proizvodnju glikozidaza se ne razlikuju mnogo od onih opisanih za lipaze, a u literaturi se mogu naći detaljne studije za proizvodnju β -galaktozidaze (laktaze)⁶⁶, β -glukozidaze⁶⁷ ili rekombinantne α -amilaze⁶⁸.

Glikozidaze su vrlo raznovrsna i heterogena grupa enzima. Neke od glikozidaza, koje se najviše koriste u industriji sumirane su u tabeli 2.2.

Tabela 2.2: Najvažnije industrijske glikozidaze.

Enzim	Oznaka strukturne familije	Primena
<i>β-Glukozidaza iz badema</i>	1	Sinteza alkil-glikozida, proizvodnja bioetanol ⁶⁹
<i>Laktaza</i>	2	Hidroliza mlečnog šećera, sinteza GOS probiotika i galaktozida ¹⁴
<i>Celulaza</i>	5	Papirna i tekstilna industrija, proizvodnja hrane za životinje ³⁵
<i>Maltaza</i>	13	Pekarska industrija, sinteza različitih fiziološki aktivnih jedinjenja i lekova ⁷⁰⁻⁷⁶
<i>Amilaze</i>	13, 14	Pekarska industrija, proizvodnja hrane za životinje ¹⁴
<i>Pektinaza</i>	28	Izbistivanje voćnih sokova ¹⁴
<i>Invertaza</i>	32	Konditorska industrija, sinteza FOS probiotika ¹⁶

2.2.4.1 Strukturna svojstva najznačajnijih industrijskih glikozidaza

U fokusu ove doktorske disertacije bili su sledeći glikolitički enzimi: maltaza, β -glukozidaza, laktaza i invertaza. One pripadaju različitim strukturnim familijama i razlikuju se po vrsti, položaju i stereohemiji glikozidne veze koju hidrolizuju. Međutim, ovi enzimi imaju vrlo važnu poziciju u industrijskim transformacijama šećera, i u reakcijama hidrolize i u reakcijama sinteze. U trenutku pisanja ove doktorske disertacije samo su strukture laktaze i invertaze bile detaljno razrešene i dostupne preko PDB baze podataka. Za maltazu i β -glukozidazu badema predstavljeni su strukturni podaci, dostupni iz literaturnih navoda najnovijeg datuma.

2.2.4.1.1 α -Glukozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae* (Maltaza)

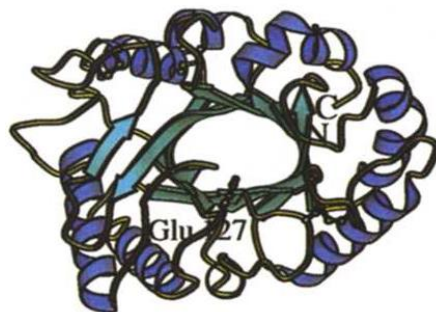
Maltaza (EC 3.2.1.20) pripada strukturnoj familiji 13, citosolni je protein i ujedno najzastupljeniji enzim u *Saccharomyces cerevisiae*. Proizvod je ekspresije *mal32* gena. To je monomerni protein od 584 AK sa molekulskom masom od 66 kDa, bez ugljohidratnih post-translacionih modifikacija. Javlja se u 2 izoforme različitih *pI* vrednosti: 5,6 i 5,9⁷⁷.

Maltaza je egzo-glikozidaza, koja zadržava konformaciju anomernog C-atoma, te je stoga pogodna za reakcije transglukozilacije. Poput α -glukozidaza biljnog i bakterijskog porekla hidrolizuje heterogene supstrate (saharozu i aril- α -glukozide), brže nego malto-oligosaharide i pokazuje slabu aktivnost prema α -glukanima⁷⁸. Trodimenzionalna struktura maltaze i dalje nije poznata, ali su Jamamoto i saradnici, kombinacijom tehnika rekombinantne DNK i mesto-usmerene mutageneze, utvrdili da Val 216 iz konsenzusne sekvence u konzerviranom regionu II diktira supstratnu specifičnost ovog enzima, tačnije razlikovanje između α (1 \rightarrow 4) i α (1 \rightarrow 6) glikozidnih veza⁷⁹.

2.2.4.1.2 β -Glukozidaza iz badema (*Prunus dulcis*)

β -Glukozidaza iz badema (EC 3.2.1.21) je glikozid-hidrolaza iz familije 1, koja je veoma čest model sistem u kinetičkim studijama. Reč je o glikozilovanom dimeru, molekulske mase od oko 135 kDa. Javlja se u 2 izoforme, sa *pI* vrednošću 7,3⁸⁰. Ovom enzimu još uvek nije određena kristalna struktura, ali budući da pripada familiji 1, zna se da u katalitičkom domenu sadrži supersekundarnu strukturu - (α/β)₈ bure, poznatije kao TIM bure (*eng.* triose-phosphate isomerase barrel). Strukturni prototip TIM-bureta je biljni

protein hevamin i ono se sastoji iz 8 paralelnih β -pločica u jezgri oko kojih je 8 α -heliksa (slika 2.9)⁸¹.

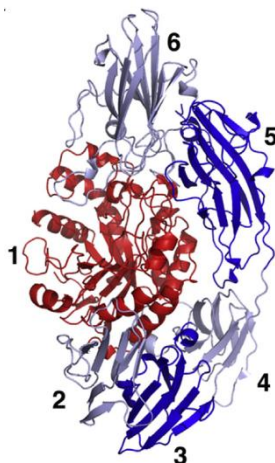


Slika 2.9: Strukturna organizacija TIM bureta na primeru biljnog proteina hevamina.

Unutar TIM bureta je aktivno mesto enzima, u okviru koga je identifikovana većina aminokiselina koje direktno ili indirektno učestvuju u vezivanju i konverziji supstrata. β -Glukozidaza ima isti katalitički mehanizam kao maltaza, što je iskorišćeno za sintezu različitih alkil-glikozida⁸².

2.2.4.1.3 β -Galaktozidaza iz *Aspergillus oryzae* (Laktaza)

Laktaza iz *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.23) pripada strukturnoj familiji 2 i ona takođe sadrži TIM bure u katalitičkom domenu. Kristalna struktura ovog enzima, rekombinantno proizvedenog u *Klyveromyces lactis*, ukazuje na to da se radi o velikom glikozilovanom monomeru koji se sastoji iz 985 aminokiselina i ima ukupno 6 domena (slika 2.10)⁸³.

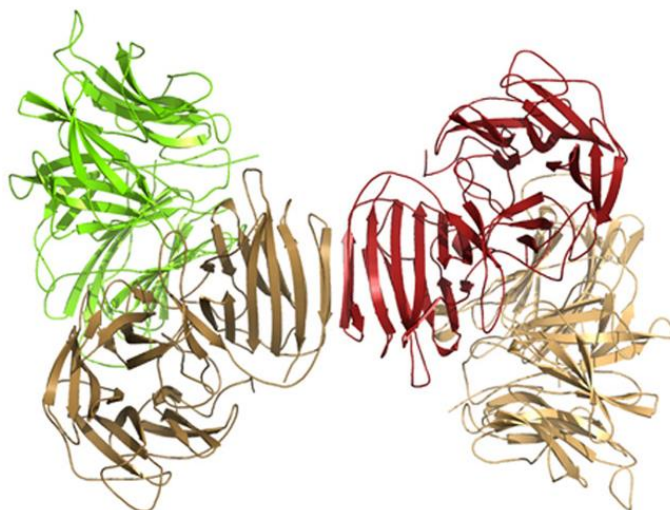


Slika 2.10: Trodimenzionalna organizacija laktaze iz *Aspergillus oryzae* – PDB oznaka 4 IUG.

Domen 1 (između Asp 40 i Thr 397) je katalitički, a domeni 2-6 ga, kao potkovica, okružuju. U aktivnom mestu je Glu 200 opšti kiselo-bazni katalizator, a Glu 298 nukleofil. Blizu aktivnog mesta je i Trp 806, koji tokom transgalaktozilacije učestvuje u formiranju dodatnog vezujućeg mesta. Od 11 glikozilovanih mesta, samo je jedno unutar proteina, dok su sva ostala na njegovoj površini. Na dodirnim površinama domena su glikozilovana mesta (Asn 373, Asn622 i Asn 914) koja sadrže veće oligosaharide manoznog tipa i različitog stepena grananja. Ovako postavljeni ugljohidratni lanci stabilizuju strukturu enzima i preko sistema vodoničnih veza štite laktazu od proteolize⁸³.

2.2.4.1.4 β -Fruktofuranozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae* (Invertaza)

Invertaza iz *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.26) katalizuje hidrolizu saharoze do ekvimolarne smeše glukoze i fruktoze, poznate pod nazivima invertni šećer ili invertni sirup. Ovaj enzim pripada familiji glikozid-hidrolaza sa oznakom 32. Kvasac proizvodi 2 izoforme invertaze: visoko glikozilovanu vanćelijsku invertazu i neglikozilovanu unutarćelijsku izoformu. Obe izoforme su kodirane od strane istog gena, čijom ekspresijom nastaju 2 iRNK različite dužine. Visoko glikozilovana vanćelijska izoforma se obično javlja u vidu homodimera molekulske mase 270 kDa, ali dimeri se mogu dalje udruživati u veće agregate: tetramere, heksamere ili oktamere (slika 2.11)⁸⁴.

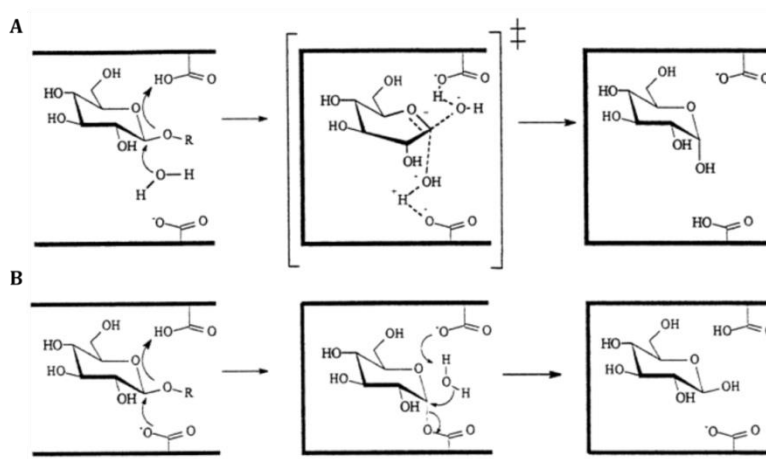


Slika 2.11: Trodimenzionalna struktura oktamera invertaze iz *Saccharomyces cerevisiae* – PDB oznaka 4 EQV.

Novija istraživanja su pokazala da preparati vanćelijske invertaze, prečišćeni prema uobičajenim protokolima, zapravo predstavljaju smešu bar 4 izoforme, različitih pI vrednosti, vrste i stepena post-translacionih modifikacija i temperaturne stabilnosti na 60°C ⁸⁵.

2.2.4.2 Katalitički mehanizam glikolitičkih reakcija

Enzimaska hidroliza glikozidne veze odvija se prema mehanizmu opšte kisele katalize. Tokom hidrolize konformacija anomernog ugljenika može ostati ista kao u supstratu ili se promeniti (slika 2.12). Pozicije kiselog bočnog ostatka aminokiseline su iste kod obe grupe glikozidaza, a razdaljina između njih i kiseonika iz glikozidne veze odgovara dužini vodonične veze. Pozicije nukleofilnih aminokiselinskih bočnih ostataka se drastično razlikuju kod ove dve grupe glikozidaza⁸⁶.



Slika 2.12: Katalitički mehanizam glikolitičkih reakcija⁸⁶. **A)** Inverzija konformacije na anomernom centru; **B)** Zadržavanje konformacije na anomernom centru.

Hidroliza glikozidne veze po mehanizmu inverzije se odvija u jednom koraku (*eng.* single displacement, slika 2.12 A). Glikolitički mehanizam u kome se zadržava konformacija na anomernom centru se odvija u dva koraka (dvostruka inverzija, slika 2.12 B). Prvo, usled kiselo-bazne hidrolize, nastaje kovalentni intermedijer, glikozil-enzim, kod koga je konformacija na anomernom ugljeniku suprotna u odnosu na supstrat. U drugom koraku se glikozil-enzim hidrolizuje nukleofilnim napadom molekula vode, uz još jednu promenu konformacije na anomernom C, tako da je u finalnom proizvodu ona ista kao i u supstratu.

Izuzetak od ovog opšteg mehanizma su *N*-acetil- β -heksozaminidaze, kod kojih je nukleofil tokom deglikozilacije acetamido-grupa samog supstrata⁸⁷ i mirozinaze, kod kojih je bazni katalizator u koraku deglikozilacije enzimski kofaktor *L*-askorbat⁸⁸.

2.2.4.3 Primena glikozidaza u hidrolizi

U sektoru tehničkih enzima najvažniju ulogu imaju celulaze. Kao aktivna komponenta detergenata celulaze efikasno uklanjaju fleke, a pri tome ne oštećuju tkaninu i čuvaju njenu boju. Tokom prerade papira koriste se kao aditivi za beljenje, u kombinaciji sa ksilanazama se koriste za uklanjanje fleka od mastila sa papirnog otpada i za proizvodnju biorazgradivog kartona, papirnih ubrusa i toalet-papira⁸⁹.

U prehrambenoj industriji najvažnije su reakcije hidrolize skroba, mlečnog šećera, celuloze, pektina i saharoze. Amilaze su glavni enzimi za hidrolizu skroba. α -Amilaza iz hipertermofilne arhee, *Pyrococcus furiosus*, se koristi za dekstrinizaciju skroba tokom proizvodnje maltodekstrina i glukoznog sirupa⁹⁰. Amilaze i celulaze se koriste za proizvodnju stočne hrane i tako povećavaju njenu nutritivnu vrednost, a ujedno ovu delimično hidrolizovanu hranu životinje lakše vare⁹¹. Laktaza iz *Aspergillus oryzae* je posebno značajna za proizvodnju mleka i mlečnih proizvoda, pogodnog za osobe netolerantne na laktozu¹⁴. Hidroliza celuloze ima višestruku namenu u prehrambenoj industriji jer poboljšava teksturu i kvalitet testa tokom proizvodnje peciva, zajedno sa pektinazom se koristi za izbistrivanje sokova i regulaciju viskoznosti voćnih pirea⁸⁹. Hidrolizom saharoze nastaje ekvimolarna smeša glukoze i fruktoze - invertni šećer ili invertni sirup. Ovu reakciju katalizuje invertaza i nastali proizvod je od velikog značaja za pekarsku i poslastičarsku industriju, a dodaje se i kao aditiv cigaretama radi poboljšanja ukusa⁸⁵.

2.2.4.4 Primena glikozidaza u sintezi

Glikozidi su asimetrični mešoviti acetali, koji nastaju u reakciji anomernog ugljenika iz aldoketoza ili aldoheksoza i hidroksilne grupe alkohola⁶⁵. Enzimska sinteza glikozida je moguća u reakcijama reverzne hidrolize i transglikozilacije. Tokom reverzne hidrolize monosaharid i alkohol (ili drugi monosaharid) reaguju uz odlazak vode i ovu reakciju katalizuju i glikozidaze sa retencijom i sa inverzijom konfiguracije na anomernom centru.

Reverzna hidroliza je termodinamički kontrolisana, tj. odvija se prema ravnotežnom stanju. Nastala voda kao kompetitivni nukleofil hidrolizuje proizvode, zbog čega je prinos proizvoda nizak⁹².

Transglikozilacija je karakteristična samo za glikozidaze sa retencijom konfiguracije. U ovom slučaju, odlazeća grupa je (mono)saharid. Ova reakcija je kinetički kontrolisana ako je reaktant značajno reaktivniji nego proizvod, pa je prinos reakcije viši nego kod reverzne hidrolize. Sa potrošnjom reaktanata, koncentracija proizvoda dostiže maksimum kada brzina sinteze i dealkilacije postanu jednake. Tada se reakcija ne može više kinetički kontrolisati i treba je prekinuti, pre nego što sistem uđe u termodinamičku ravnotežu i proizvod podlegne sekundarnoj hidrolizi⁶³.

Glikozidi imaju različitu strukturu i značaj. Alkil-glikozidi su surfaktanti i biodetergenti u kozmetičkoj industriji⁹³. Glikozidi benzil-, vanilil- i salicil-alkohola imaju bakteriostatsko, antioksidativno i antikonvulzivno dejstvo, ili se koriste kao agensi za izbeljivanje kože^{71,73,75,94}. Galaktozidi VA su antioksidansi, ali i gradivni blokovi fenilpropanoidnih glikokonjugata sa antihipertenzivnim, antibiotskim i imunomodulatornim svojstvima⁹⁵. Glukozidi steviola su prirodni zaslađivači, dok su flavonoidni glikozidi važni za zaštitu od UV A i UV B zračenja^{65,96}. Glukozidi arbutina inhibiraju tirozinazu i služe za beljenje kože, a glukozid hidrohinona je moćan antioksidans^{72,74}. Glikozidi terpena su antimikrobni agensi, glikozidi peptida imaju antitumorsko dejstvo, a glikozidi steroida su aktivne komponente lekova za srce⁹⁷. Transgalaktozilacijom mlečnog šećera u prisustvu laktaze nastaju GOS probiotici, a transglikozilacijom saharoze u prisustvu invertaze dobijaju se FOS probiotici^{16,17}. Glikozidi različitih aromatičnih jedinjenja su popularni aditivi u proizvodima za pranje veša. Šećerna komponenta štiti aromatično jedinjenje i u prisustvu specifičnih enzima se glikozidna veza hidrolizuje, čime se postiže produženo oslobađanje mirisne komponente⁹⁷.

2.2.4.4.1 Značaj galaktozida vanilil-alkohola

Vanilil-alkohol je aromatični diol i jedna od osnovnih gradivnih jedinica lignina. Na industrijskoj skali se dobija redukcijom vanilina i zajedno sa njim se, zbog prijatnog mirisa vanile, koristi kao aditiv u prehrambenoj industriji. Lekovita svojstva medicinskih biljaka

kao što je *Gastrodia elata* se, između ostalog, pripisuju i ovom jedinjenju⁹⁸. Vanilil-alkohol pripada grupi antioksidanasa, jedne od najvažnijih klasa nutraceutika. Antioksidansi štite biomakromolekule (lipide, nukleinske kiseline i proteine) od oštećenja izazvanih reaktivnim kiseoničnim vrstama, koja su u osnovi dijabetesa tipa II, ateroskleroze, neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti i različitih vrsta tumora. Slaba rastvorljivost VA u vodi ograničava njegovu biotehnološku primenu, što se može rešiti glikozilacijom. Dodatna šećerna komponenta moduliše i antioksidativna svojstva VA, kao i njegove farmakokinetičke osobine⁹⁵.

Lopez-Munguja i saradnici su sintetisali galaktozide VA i homovanilil-alkohola (VG i HVG, redom) i utvrdili da se njihov antioksidativni efekat odvija prema sekvencijalnom mehanizmu koji uključuje gubitak protona i prenos elektrona (*eng.* sequential proton-loss electron transfer, SPLET). Po tome je njihovo antioksidativno dejstvo kurkuminu, rezveratrolu, galnoj kiselini, izoflavonoidima, hidroksibenzoevoj i dihidroksibenzoevoj kiselini⁹⁵. Vanilil-galaktozid je značajan i kao prekursor za sintezu složenijih bioaktivnih jedinjenja: fenil-propanoidnih glikozida, galakto-konjugata ili multivalentnih glikoklastera^{95,99,100}.

2.2.4.4.2 Značaj galakto-oligosaharida

Galakto-oligosaharidi čine složenu grupu ugljenih hidrata, izgrađenih od glukoze i galaktoze međusobno vezanih β -glikozidnim vezama. Veoma su stabilni u kiseloj sredini, pa nepromenjeni stižu do debelog creva u kome ostvaruju svoju prebiotičku funkciju. Oni stimulišu selektivnu proliferaciju bifidobakterija i laktobacila, koji štite organizam domaćina od kolonizacije patogenih vrsta. Tokom fermentacije GOS, u crevnom traktu domaćina se sintetišu kratkolančane MK koje doprinose prevenciji raka, povećanju resorpcije minerala, poboljšanju rada creva, kontroli nivoa masti i holesterola u serumu, suzbijanju infekcija i zapaljenskih bolesti creva¹⁰¹.

U strukturnom smislu, GOS su vrlo raznovrsna grupa molekula. Najčešći su GOS koji sadrže 1 molekul glukoze i do 5 molekula galaktoze. Međutim, postoje i GOS, koji se sastoje samo iz galaktoze, kao i oni sa razgranatom strukturom (nekoliko galaktoznih ostataka je vezano za glukozu na redukujućem kraju oligosaharida)¹⁰². Stepen polimerizacije i vrsta

veza između monosaharidnih jedinica direktno utiču na funkciju GOS. Najizraženiji bifidogeni efekat imaju β (1→3) GOS, dok je ovaj efekat nešto slabiji kod β (1→4) i β (1→6) GOS. Najveći broj komercijalnih preparata sadrže β (1→4) i β (1→6) GOS, pa se danas velika pažnja poklanja razvijanju protokola za dobijanje β (1→3) GOS¹⁰³.

Najvažniji industrijski supstrat za proizvodnju GOS je laktoza u vidu rastvora čistog jedinjenja ili složenijih supstrata (jogurt, kiselo mleko, surutka i dr.). Surutka je vrlo popularna, jer nastaje u velikim količinama kao nusproizvod mlečne industrije. Međutim, treba imati na umu da je procenat laktoze u surutki i do 4 puta niži u poređenju sa rastvorima čiste laktoze koji se najčešće koriste tokom transgalaktozilacije (20-40 %), što bitno utiče na prinos GOS¹⁰⁴.

Glikozil-transferaze i β -galaktozidaze se najčešće koriste kao enzimski katalizatori za proizvodnju GOS. Glikozil-transferaze su stereospecifične i regiospecifične, ali su skupe, nisu lako dostupne i potrebni su im specifični supstrati (šećerni nukleotidi). Zato se danas β -galaktozidaze, iako slabije specifične, najčešće koriste za proizvodnju GOS iz laktoze. Nedavno je opisan brz i efikasan metod za sintezu smeše β (1→3) i β (1→6) GOS primenom AOL¹⁰³.

2.3 Enzimaska kataliza u nevodenim reakcionim sistemima

Enzimaska kataliza je odavno prevazišla primenu enzima isključivo u vodenim rastvorima. Štaviše, biokataliza u nevodenim reakcionim sistemima je predmet velikog interesovanja naučne javnosti, o čemu svedoči činjenica da se na ovu temu u proseku objavi barem 1 rad dnevno³. Najznačajnija prednost nevodene biokatalize je što je termodinamička ravnoteža pomerenjena u smeru sinteze, a može se promeniti i supstratna specifičnost enzima u odnosu na vodeni rastvor, što još više proširuje mogućnosti njegove primene. Nevodeni sistemi su poželjni reakcionim medijumima i zbog bolje rastvorljivosti hidrofobnih supstrata i/ili proizvoda, kao i povećane temperaturne stabilnosti enzima u odnosu na vodeni rastvor. Inhibicija enzima supstratom ili proizvodom, gubitak proizvoda u neželjenim sporednim reakcijama i mikroba kontaminacija su značajno smanjene u ovim reakcionim medijumima, što je takođe vrlo poželjno u industrijskim biotransformacijama¹⁰⁵.

Najčešći reakcioni medijumi za nevodenu biokatalizu su: organski rastvarači (OR) različite polarnosti, jonske tečnosti (JT), superkritične tečnosti (ST) i reverzne micele (RM). Reakcije mogu da se odvijaju i u *solvent-free* sistemima, u kojima je OR ujedno i supstrat za enzimsku reakciju. Takođe, navedeni rastvarači se mogu međusobno kombinovati u monofazne sisteme (npr. voda/polarni OR, više OR koji se međusobno mešaju) ili dvofazne sisteme (npr. voda/nepolarni OR)³. U slučaju dvofaznih sistema, enzimaska reakcija se obično odigrava na granici dveju faza.

2.3.1 Biokataliza u organskim rastvaračima

Iz istorijske perspektive, radovi Klibanova i saradnika iz 1980-ih godina se smatraju početkom istraživanja ponašanja i primene enzima u OR. Rastvorljivost, stabilnost i katalitička aktivnost enzima u OR zavise od prirode odabranog rastvarača, karakteristika enzima i fizičko-hemijskih osobina dodirne površine enzim-OR³.

Za rastvorljivost enzima u OR posebno su značajne vodonične veze i elektrostatičke interakcije. Prema afinitetu za stvaranje vodoničnih veza, OR se mogu svrstati u 3 velike grupe¹⁰⁶:

- glicerol, etilen glikol, formamid, amino-etanol,
- supstituisani formamidi i njima slični rastvarači,
- metanol, etanol, toluen i njima slični rastvarači.

Najveći kapacitet za stvaranje vodoničnih veza i rastvaranje enzima imaju rastvarači iz prve grupe, koji su najbliži vodi. Ovi rastvarači imaju bar 2 centra preko kojih mogu formirati vodonične veze. Kapacitet za stvaranje vodoničnih veza opada kod sledeće 2 grupe rastvarača i najmanji je za rastvarače iz treće grupe.

2.3.1.1 Uticaj organskih rastvarača na stabilnost i aktivnost enzima

Nativnu strukturu, a samim tim i katalitičku aktivnost enzima, održava složena mreža vodoničnih veza, hidrofobnih, jonskih i van der Valsovih interakcija. Esencijalnu ulogu u očuvanju integriteta ove mreže ima sloj vode koji se zove hidrataciona ljuska. Njena veličina varira, zavisno od enzima: od nekoliko desetina molekula vode (α -himotripsin, subtilizin) do čak nekoliko desetina miliona molekula vode (polifenol-oksidaza)³.

Hidrataciona ljuska putem pH memorije omogućuje pravilno naelektrisanje aminokiselina u aktivnom mestu enzima i njihovu fleksibilnost tokom katalitičkog ciklusa. Glicerol, formamid ili etilen-glikol, čiji je kapacitet za formiranje vodoničnih veza sličan vodi, se mogu dodavati kao stabilizatori enzima u nevedenim reakcionim sistemima¹⁰⁶.

Jedno od najvažnijih pitanja u nevedenoj katalizi je kako kontakt sa OR utiče na strukturu enzima. Parametar, koji se često koristi za procenu uticaja OR na stabilnost enzima, je log P, odnosno logaritamska vrednost koeficijenta raspodele nejonizovanog oblika neke supstance između *n*-oktanola i vode. Određuje se prema formuli:

$$\log P = \log \left(\frac{[A]_o}{[A]_w} \right)$$

gde su: $[A]_o$ – koncentracija nejonizovane supstance A u *n*-oktanolu; $[A]_w$ – koncentracija nejonizovane supstance A u vodi.

Log P je, suštinski, mera hidrofobnosti OR: OR sa negativnim vrednostima log P su hidrofilni, oni sa log P = 0 se jednako distribuiraju u obe faze, dok su OR sa pozitivnim vrednostima log P hidrofobni. Na velikom broju enzima je potvrđena korelacija između vrednosti log P i enzimske aktivnosti. Polarni OR (logP≤2) snažno inaktiviraju enzime, jer narušavaju integritet njihove hidratacione ljuske. Sa porastom hidrofobnosti rastvarača (vrednosti logP 2 – 4) raste i enzimska aktivnost, koja potom sa daljim porastom logP>4 stagnira, najverovatnije zbog smanjene rastvorljivosti enzima u izrazito hidrofobnim rastvaračima. Log P takođe utiče i na fleksibilnost enzima: fleksibilnost CAL B i subtilizina iz *Bacillus licheniformis* raste sa porastom vrednosti log P¹⁰⁷.

Na aktivnost enzima značajno utiče i struktura OR. Nekoliko studija na različitim enzimima (lipaza iz *Rhizomucor meihei*, *r*-himotripsin, subtilizin, peroksidaza iz rena, kutinaza) su pokazale da alkani, pre svega heksan i oktan, povećavaju rigidnost i stabilnost enzima. Stabilizujući efekat alkana je bio u pozitivnoj korelaciji sa dužinom alkil-niza, odnosno sa njihovom hidrofobnošću. Sa druge strane, OR sa polarnim grupama (-OH, -C=O, -S=O ili -C≡N) uglavnom inaktiviraju enzime, jer mogu prodreti do aktivnog mesta i interferirati sa hidratacionom ljuskom molekula. Među pomenutim hidrofilnim OR veći

inhibitorni efekat na enzimsku aktivnost imaju oni sa funkcionalnom grupom na terminalnom ugljenikovom atomu¹⁰⁷.

2.3.2 Biokataliza u jonskim tečnostima, superkritičnim tečnostima i reverznim micelama

Jonske tečnosti, superkritični fluidi i reverzne micide se često navode kao ekološki prihvatljivija alternativa organskim rastvaračima. Zbog toga je velika pažnja naučne javnosti i industrije usmerena upravo na njih.

Jonske tečnosti su soli voluminoznih asimetričnih organskih katjona i slabo kompleksiranih anjona, koje su na sobnoj temperaturi u tečnom stanju. Najčešći katjoni su 1-etil-3-metil-imidazolijum, 1-butil-2,3-dimetil-imidazolijum, 1-etil-piridinjum i 2-metoksietil-(tri *n*-butil)-fosfonijum. Najčešće anjonske komponente su acetat, trifluoroacetat, heksafluorofosfat, tetrafluoroborat i oktil-sulfat. Prema teorijskoj proceni, postoji čak 10^8 kombinacija sastava JT, što znači da se promenom vrste katjona i anjona one mogu dizajnirati po želji korisnika. U njima se dobro rastvaraju polarni supstrati, temperaturno su stabilne i nisu isparljive¹⁰⁸. Međutim, biotransformacije u ovim reakcionim medijumima za sada nisu zaživele u industriji. Najznačajniji razlozi za to su: visoka cena, energetski zahtevna sinteza, prisustvo nečistoća (voda, neizreagovali halidi) i visoka viskoznost¹⁰⁹. Dodatno, JT koje sadrže imidazolijum i pirolidinjum katjone imaju izraženu antimikrobnu aktivnost, što je neprihvatljivo ukoliko se kao biokatalizatori koriste cele žive mikrobne ćelije¹¹⁰. Jonske tečnosti koje sadrže heksafluorofosfat i tetrafluoroborat kao anjone su podložne razgradnji u prisustvu vode, pri čemu kao proizvod nastaje izrazito korozivna fluorovodonična kiselina¹⁰⁸.

Superkritične tečnosti su supstance koje istovremeno imaju svojstva tečnog, čvrstog i gasovitog agregatnog stanja. Najbolje opisani predstavnik ove grupe, koji se ujedno najčešće koristi u industriji, je superkritični ugljen-dioksid ($scCO_2$). Njegova superkritična temperatura je $31^\circ C$, a pritisak 7,4 MPa; hemijski je inertan i nije toksičan. Za razliku od JT, ST se primenjuju u biotransformacijama na industrijskoj skali: Macuda i saradnici su opisali uspešno razdvajanje racemske smeše različitih alkohola, koristeći Novozyme 435 u $scCO_2$. Željeni enantiomeri su izdvojeni u enantiomernom višku od 99 %, a biokatalizator je u

ovom sistemu zadržao aktivnost 3 dana¹¹¹. Superkritične tečnosti su odlični rastvarači za hidrofobne supstrate, nisu zapaljive, rastvorene supstance u njima brže difunduju, a promenama pritiska i temperature njihovo agregatno stanje se može menjati¹⁰⁸. To olakšava kasnije odvajanje iz reakcione smeše, ali utiče i na selektivnost biokatalizatora. I pored toga, razvoj biotehnologije sa ST je još uvek u fazi razvoja, zbog ekoloških aspekata i visoke cene specijalne opreme neophodne u radu sa njima. Pored toga, utvrđeno je da $scCO_2$ može destabilizovati enzime usled smanjenja pH u mikrookruženju enzima, kovalentnih modifikacija amino-grupa na površini enzima ili tokom ciklusa promene radnog pritiska¹⁰⁸.

Reverzne micelle su dinamični sferni agregati površinski aktivnih supstanci unutar kojih su zarobljene kapi vode sa rastvorenim enzimima i/ili drugim (biomakro)molekulima. Kako se RM nalaze u OR, njihovi nepolarni, hidrofobni repovi su usmereni ka rastvaraču, dok su polarne glave orijentisane ka vodenoj sredini u unutrašnjosti micelle. Reverzne micelle mogu razmenjivati surfaktante, vodu i u njoj rastvoren sadržaj, ili se udruživati u veće agregate. Strukturu ovih sistema održavaju nekovalentne interakcije. Za njihovu pripremu se najčešće koristi sintetički surfaktant, bis-(2-etilheksil) natrijum sulfosukcinat/izo-oktan (AOT), jer gradi stabilne micelle bez dodatka pomoćnih supstanci. Reverzne micelle su pogodni reakcioni medijumi za lipaze zbog velike dodirne površine (10 – 100 m^2/mL). Reakcije se odvijaju u malim zapreminama uz moguću solubilizaciju supstrata različite hidrofilnosti. Rastvori micela su optički providni, pa se za praćenje reakcije i kinetičkih parametara enzima mogu koristiti jednostavne spektroskopske tehnike. Potencijalni denaturišući efekat surfaktanata i slaba mogućnost višestruke upotrebe enzima u ovim sistemima su glavni ograničavajući faktori za širu industrijsku primenu enzimske katalize u RM.¹¹²

2.3.3 Upotreba najvažnijih industrijskih lipaza i glikozidaza za biološke transformacije u nevodenim reakcionim sistemima

Primenom CRL u 2,2,4-trimetil-pentanu sintetisana je serija od 19 mirisnih estara alkohola i kiselina različite dužine alkil-niza, stepena grananja i zasićenosti¹¹³. Novozyme 435 se pokazao kao najbolji katalizator za sintezu etil-cinamata i askorbil-oleata u *t*-

butanolu, dok su PPL i PCL uspešno primenjene za sintezu etil-oleata u *n*-heksanu i prečišćavanje ketoprofena u *n*-heptanu, redom^{49,114}. Novozyme 435 u scCO₂ se takođe uspešno primenjuje na industrijskoj skali za prečišćavanje enantiomera hiralnih alkohola iz racemske smeše¹¹¹. Upotrebom CAL B u jonskoj tečnosti [CPMA][MS] sintetizovan je butilpropanoat, dok je CRL u sistemu [Bmim][PF₆] korišćena za transesterifikaciju metilmetakrilata¹⁰⁸. Jonske tečnosti [Bmim][Tf₂N] i [OmPy][BF₄] su se pokazale i kao dobar reakcioni medijum za proizvodnju biodizela, primenom PCL i Amano I PS-C lipaze¹⁰⁷. Reverzne micele su se takođe pokazale kao odlični reakcioni medijumi za lipaze: CRL su korišćene u sistemima AOT reverznih micela u *n*-heptanu za esterifikaciju palmitinske kiseline, a AOT reverzne micele u *i*-oktanu su primenjene za enantioselektivnu esterifikaciju ibuprofena i esterifikaciju laurinske kiseline sa PCL¹¹².

β -Glukozidaza iz badema, zarobljena u različitim polimernim materijalima i adsorbovana na celitu i sferoidnom HAP je iskorišćena za sintezu heksil- β -D-glukopiranozida u *n*-heksanolu¹¹⁵. Isti enzim, enkapsuliran u Ca-alginatnom gelu, je iskorišćen i za sintezu biaktivnih glikozida dopamina i holekalciferola u diizopropiletru^{116,117}. Laktaza iz *Aspergillus oryzae*, kovalentno modifikovana sa PEG, je upotrebljena za sintezu GOS u smeši trihloro-etana, dimetil-sulfoksida i *n*-heksanola u zapreminskom odnosu 13:1:6¹¹⁸. Superkritični CO₂ se pokazao kao dobar reakcioni medijum za izolovanje likopena iz matriksa paradajza primenom smeše komercijalnih glikozidaza Celluclast/Novozyme+Viscozyme, sintezu bioaktivnog α -mangostin-D-glukozida sa amiloglukozidazom iz *Aspergillus niger*, kao i glikozida vanilina, bakuciola i retinola¹¹⁹⁻¹²¹. Čelije ekstremofilne bakterije, *Lysinibacillus fusiformis*, tolerantne na OR, su korišćene za sintezu antioksidansa puerarin-7-*o*-fruktozida u 10 % etanolu¹²². Jonske tečnosti se često koriste za sintezu tioglukozida i oligomanana, a RM za sintezu surfaktanata na bazi alkilglukozida¹²³⁻¹²⁵.

2.4 Strategije za poboljšanje efikasnosti enzima u industrijskim transformacijama

Industrijske transformacije se uglavnom odvijaju na povišenim temperaturama, u nevedenim reakcionim sistemima ili pri pH vrednostima koje nisu optimalne za određeni enzim, kako bi se povećala produktivnost proizvodnog procesa, sprečila mikroba

kontaminacija ili pomerila ravnoteža u smeru nastanka željenog proizvoda. Svi pomenuti uslovi mogu izazvati denaturaciju enzima. Zbog toga se velika pažnja posvećuje stabilizaciji enzima. Glavne strategije za stabilizaciju enzima su:

- hemijske modifikacije,
- proteinski inženjering i
- imobilizacija enzima.

2.4.1 Hemijske modifikacije

Hemijskim modifikacijama može se uticati na ukupno naelektrisanje ili hidrofobnost proteina. Glavna mesta hemijskih modifikacija su N- i C-terminusi proteina i bočni ostaci His, Arg, Cys, Met, Tyr i Trp. Za njihovu modifikaciju se koriste jednostavni i lako dostupni reagensi: anhidridi i hloridi kiselina, karbodiimidi, α -halokarboksilne kiseline, fenilglioksal, jod-acetamid, *N*-acetil-imidazol i *N*-brom-sukcinimid, redom. Međutim, ovi reagensi nisu selektivni i mogu uzrokovati inaktivaciju enzima¹²⁶.

Biokonjugacija je kovalentna modifikacija Lys, aminokiselina na N-terminusu proteina i Cys na površini proteina polimerima (polietilen-glikolom (PEG), polisaharidi) ili lipidima sa ciljem promene hidrofilitnosti enzima¹²⁷. Oblaganjem lipaza lipidima njihova sintetska aktivnost u nevodnim sistemima uvećana je 20 – 100 puta¹²⁸. Poluzivot invertaze na 65 °C nakon biokonjugacije sa pektinom je povećan sa 5 minuta na čak 2 dana uz istovremeni porast temperaturnog optimuma sa 58°C na 66°C¹²⁹.

2.4.2 Proteinski inženjering

Proteinski inženjering se zasniva na manipulaciji genima koji kodiraju za ciljni enzim. Dva glavna metodološka pristupa u inženjeringu proteina su racionalni dizajn i dirigovana evolucija. Kod racionalnog dizajna se mutacije uvode ciljano, a kod dirigovane evolucije nasumično¹³⁰. Racionalni dizajn je moguće primeniti samo kod proteina sa poznatom kristalnom strukturom, što je glavni ograničavajući faktor ove metode. Sa druge strane, zbog nasumičnosti mutacija uvedenih dirigovanom evolucijom dobija se biblioteka mutanata koju je potrebno pretražiti i identifikovati mutirane enzime sa poboljšanim osobinama. Jedna biblioteka može sadržati 10^4 – 10^8 mutanata, pa je potrebno optimizovati i automatizovati testove na osnovu kojih se mutanti biraju¹³¹. Kod dirigovane evolucije je

takođe važno da se za domaćina odabere moćan ekspresioni sistem, koji će po mogućnosti, željeni enzim proizvoditi u vanćelijsku sredinu. Najčešći ekspresioni sistemi u proteinskom inženjeringu su: *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Escherichia coli*³.

Mutacijama aminokiselina unutar tunela za vezivanje supstrata, promenjena je supstratna specifičnost CRL: mutanti u kojima su alifatične aminokiseline, Pro 246 i Leu 413, zamenjene glomaznim Phe su pokazale znatno veću preferenciju prema supstratima sa kraćim alkil-nizom (do 10 C-atoma)²⁷. Racionalnim dizajnom β -glukozidaze iz *Sulfolobus solfataricus* je dobijen mutant koji je uspešno formirao nove β -manozil i β -ksilozil veza, koje su inače problematične prilikom sinteze. Metodom dirigovane evolucije je razvijena i potpuno nova klasa enzima – **glikosintaze** sa blokiranom hidrolitičkom aktivnošću, što je doprinelo značajnom porastu prinosa transglikozilacije¹³².

2.4.3 Imobilizacija enzima

Imobilizacija je jedina tehnika za stabilizaciju enzima koja objedinjuje sve prednosti katalizatora od interesa za industriju²:

- povećanu stabilnost enzima u ekstremnim reakcionim uslovima (pH, temperatura, pritisak, prisustvo denaturišućih agenasa),
- konsektivnu upotrebu enzima u više uzastopnih reakcionih ciklusa,
- lakše odvajanje enzima iz reakcione smeše,
- kompatibilnost sa različitim vrstama bioreaktora,
- prevenciju mikrobiološke kontaminacije i
- hiperaktivaciju enzima.

Zbog toga je to najsveobuhvatnija metoda stabilizacije enzima od industrijskog značaja, pa će u nastavku detaljno biti opisane i upoređene različite metode i nosači za imobilizaciju enzima zajedno sa najvažnijim primerima primene imobilizovanih enzima koji su bili u fokusu ove doktorske disertacije.

2.4.3.1 Metode za imobilizaciju enzima

Sušтина imobilizacije je da se enzim fizički ograniči u definisanom prostoru, ali da istovremeno ostane katalitički aktivan kako bi se mogao koristiti u uzastopnim reakcionim ciklusima. Metode za imobilizaciju enzima mogu biti fizičke ili hemijske. U fizičke metode imobilizacije se ubrajaju adsorpcija i zarobljavanje enzima unutar različitih strukturnih jedinica nosača, dok su glavne hemijske metode imobilizacije kovalentna imobilizacija na nosač i unakrsno umrežavanje enzima bez nosača. Fizičke i hemijske metode imobilizacije se razlikuju u vrsti interakcija koje nastaju između enzima i nosača. Kod metoda fizičke imobilizacije enzim se veže za nosač posredstvom nekovalentnih interakcija: van der Valsovih, elektrostatičkih, hidrofobnih, vodoničnih, metal-koordinatnih ili disulfidnih veza, dok kod hemijskih metoda između enzima i nosača nastaju kovalentne veze¹³³.

Fizička adsorpcija enzima je brza, ne zahteva dodatnu hemijsku funkcionalizaciju enzima ili nosača i odvija se u blagim reakcionim uslovima, tako da enzim zadržava visoku aktivnost. Zbog toga je vrlo česta u praksi. Posebna podvrsta fizičke adsorpcije, imobilizacija preko hidrofobnih interakcija, je od velikog značaja za lipaze. Ovom metodom imobilizacije se lipaze hiperaktiviraju, jer se fiksiraju u otvorenoj konformaciji¹³⁴. Fizička imobilizacija enzima je reverzibilna, jer se nekovalentne interakcije mogu raskinuti u visokoj jonskoj sili ili u prisustvu specifičnih agenasa. Zbog toga enzim „curi“ sa nosača i može kontaminirati proizvod. Sa druge strane, reverzibilnost fizičke imobilizacije može da se iskoristi da se skupi nosači regenerišu u blagim uslovima i da se ponovo koriste za sledeću „rundu“ imobilizacije sveže količine enzima.

Zarobljavanje (enkapsulacija) je ireverzibilna metoda fizičke imobilizacije. Enzim ne reaguje direktno sa nosačem, već je zarobljen unutar strukturnih elemenata nosača (kristala, u mreži između vlakana polimera ili gelova)¹³⁵. Posledično, samo mali molekuli, supstrat i proizvod, mogu da difunduju do i od enzima. Polimeri koji se najčešće koriste za enkapsulaciju su: Ca-alginat, karagenan, kolagen, poliakrilamid, želatin, silikonska guma, poliuretan i poli(vinil alkohol)¹³³. Budući da enzim i nosač ne reaguju hemijski, aktivnost enzima je u velikoj meri očuvana, ali enzim i dalje može da „curi“ iz kapsula. Difuzija supstrata dublje u kapsulu je ograničena, što je jedan od značajnih izazova ove metode¹³⁶.

Kovalentna imobilizacija je ireverzibilna, izuzev kada se enzim imobilizuje na nosače sa aldehidnim grupama ili preko disulfidnih mostova^{137,138}. Samim tim je „curenje“ enzima znatno slabije nego kod fizičkih tehnika imobilizacije. Kako bi se povećala efikasnost kovalentne imobilizacije, u praksi se vrlo često hemijski funkcionalizuju reagujuće grupe enzima ili nosača. Funkcionalizacija nosača je znatno češći pristup, jer je teško usmeriti modifikacije enzima tako da se očuva njihova katalitička aktivnost. Najčešći reagensi za aktivaciju nosača za imobilizaciju su: cijanogen-bromid, glutaraldehid, natrijum-perjodat, tozil-hlorid, epoksidi, karbodiimidi, hinoni i divinilsulfonska kiselina¹³⁹. Ova jedinjenja su *linkeri* preko kojih se enzim vezuje za nosač bez direktnog kontakta, čime se smanjuju sterne smetnje koje bi mogle ometati transformaciju supstrata. Zbog ireverzibilnosti kovalentnih veza enzim može da se inaktivira. Takođe, nakon inaktivacije imobilizata nije moguće ponovo iskoristiti nosač, kao kod fizičke adsorpcije¹³⁶.

Unakrsno umrežavanje enzimskih agregata ili kristala pomoću bifunkcionalnih reagenasa je metoda imobilizacije bez nosača. Za umrežavanje se najčešće koristi glutaraldehid. Umreženi kristali enzima (*eng.* cross-linked enzyme crystals, CLEC) su otporni na različite denaturišuće uslove i imaju visoku specifičnu aktivnost, ali za kristalizaciju stepen prečišćenosti proteina mora biti visok¹⁴⁰.

Agregiranjem se enzim istovremeno prečišćava pa je moguće koristiti direktno fermentacionu tečnost ili ćelijski lizat kao polazni materijal¹⁴¹. Prednosti ove metode imobilizacije su niska desorpcija enzima iz imobilizata i mogućnost stabilizacije kvaternerne strukture multimernih enzima¹³⁶. Međutim, veličina umreženih enzimskih agregata (*eng.* cross-linked enzyme aggregates, CLEA) se teško kontroliše, a uz to su i veoma viskozni. Zbog toga se teško fizički odvajaju iz reakcione smeše, pa je i mogućnost njihove kontinuirane upotrebe vrlo ograničena. Dodatno, alkohol-dehidrogenaza, nitrilhidrataza, peroksidaze i oksidaze ne mogu da se umrežavaju glutaraldehidom, jer se inaktiviraju, pa se umesto njega moraju koristiti polialdehidi nastali perjodatnom oksidacijom polisaharida¹⁴¹.

2.4.3.2 Osobine, vrsta i kriterijumi za odabir nosača za imobilizaciju

Struktura i fizičko-hemijske osobine nosača bitno utiču na osobine, katalitičku efikasnost i primenu enzimskog imobilizata. Najbolji nosač za imobilizaciju je onaj koji stabilizuje trodimenzionalnu strukturu enzima, a istovremeno ima visoku hemijsku, fizičku i biološku stabilnost, ekonomičan je i lako dostupan. Važno je i da se može po potrebi dodatno hemijski funkcionalizovati, ali da istovremeno ni na koji način ne reaguje sa supstratom ili proizvodom enzimske reakcije. Ukoliko je cilj industrijska primena imobilizata, važno je da nosač bude kompatibilan sa različitim vrstama reaktora. Glavne grupe nosača za imobilizaciju enzima prema strukturi i poreklu su prirodni ili sintetički polimeri i neorganske supstance.

Prirodni organski polimeri (biopolimeri) se često koriste za imobilizaciju enzima jer su lako dostupni, ekonomični, biorazgradivi i biokompatibilni. Polisaharidi i proteini su najčešći nosači ove vrste. Polisaharidi se najčešće dobijaju iz biljaka i algi, tako da njihova proizvodnja ne podrazumeva povređivanje životinja (*eng.* cruelty-free), što je značajna prednost u odnosu na uobičajene proteinske nosače¹⁴². Najčešće korišćeni polisaharidni nosači za imobilizaciju enzima su: alginat, agaroz, celuloza, hitin i hitozan. Alginat i agaroz formiraju hidrogelove i pogodni su za enkapsulaciju enzima, dok su hemijski modifikovane agaroze (glioksal-agaroz i oktil-Sepharose) posebno značajne za imobilizaciju lipaza¹⁴³. Mehanička stabilnost alginatnih imobilizata se može dodatno poboljšati primenom karagenana ili PEG¹³⁶. Celuloza, hitin i hitozan imaju veliki broj površinskih -OH i -NH₂ grupa (redom), pa se mogu koristiti za direktnu kovalentnu imobilizaciju enzima. Celuloza se može dodatno hemijski funkcionalizovati sa dietilaminoetil- ili karboksimetil-grupama¹⁴⁴, a hitozan se može koristiti u kompozitima sa alginatom i glinama ili modifikovan sa karbodiimidom ili alkil-grupama^{137,145}. Bitno ograničenje celuloze je što je podložna hidrolitičkom dejstvu mikrobnih celulaza¹⁴².

Proteini su heterofunkcionalni biomakromolekuli koji se ne moraju dodatno modifikovati i zato su vrlo pogodni nosači za imobilizaciju. Proteini nisu prirodni supstrati lipaza i glikozidaza, tako da se mogu koristiti za njihovu imobilizaciju bez bojazni od razgradnje nosača. Kolagen tipa I i želatin su najčešći proteinski nosači za imobilizaciju

enzima. Ukoliko se konjuguju sa akrilamidom, dobijaju se mikrobiološki rezistentni materijali sa odličnim mehaničkim svojstvima¹³⁷.

Sintetički polimeri su najraznovrsniji u pogledu fizičko-hemijskih osobina. Komercijalno su dostupni kao adsorptivne smole, jonoizmenjivači sa različitim kiselim i baznim grupama ili kao preaktivirani nosači sa različitim funkcionalnim grupama. Ovi nosači su otporni na mikrobnu aktivnost i mogu se adaptirati tako da odgovaraju velikom broju različitih enzima¹⁴². Najveću primenu u ovoj grupi nosača imaju polimetakrilati, polistireni, polipropileni i akrilamid.

Eupergit C je hidrofilni metakrilatni nosač sa visokom hemijskom i mehaničkom stabilnošću u opsegu pH 0-14. Zahvaljujući velikoj gustini epoksidnih grupa na površini enzimi se *višetačkasto* kovalentno imobilizuju (*eng.* multi-point covalent immobilization) na neutralnom ili baznom pH, a epoksidne grupe se mogu dalje modifikovati po potrebi. Nakon imobilizacije neizreagovale epoksidne grupe se blokiraju merkaptanolom, etanolaminom ili glicinom da bi se sprečile nespecifične interakcije¹⁴². Sepabeads nosači su takođe polimetakrilati, mikrobiološki su otporni, mehanički stabilni, ne bubre u vodi, nisu imunogeni, niti antigeni. Mogu se modifikovati etilendiamino-, heksametilendiamino- ili epoksidnim grupama, a koriste se za imobilizaciju CRL¹⁴⁶, lipaza iz *Humicola lanuginosa* i *Rhizomucor miehei*¹⁴⁰, maltaze iz *Saccharomyces cerevisiae*¹⁴⁷, α -glukozidaze iz paradajza¹⁴⁸ i penicilin acilaze¹⁴⁹.

Purolite A109, kopolimer stirena i divinilbenzena, je vrlo hidrofoban makroporozni nosač sa česticama prečnika 400 μm . Nakon aktivacije epoksi-grupama, upotrebljen je za kovalentnu imobilizaciju CAL B u visokoj jonskoj sili NaCl, a neizreagovale epoksi-grupe su blokirane Phe¹⁵⁰.

Neorganski nosači su široko zastupljeni u imobilizaciji enzima i značajni su pogotovo kao nosači za fizičku adsorpciju. Odlikuju se visokom hemijskom, fizičkom i biološkom stabilnošću. Neorganski nosači su mikrobiološki otporni, jer ni jedna poznata vrsta bakterija i gljiva ne može koristiti neorgansku materiju kao supstrat za rast¹³⁶. Neki

od najznačajnijih nosača iz ove grupe su: silika-gel, gline, oksidi metala, staklo, aktivni uglj i HAP¹⁴¹.

Silika-gel preko površinskih hidrofilnih silanolnih grupa i hidrofobnih siloksana interaguje sa enzimima ili se dalje modifikuje. Silika-gel je fizičko-hemijski i biološki stabilan i vrlo često se koristi kao nosač za imobilizaciju enzima za dalju primenu u nevodnim reakcionim sistemima¹⁵¹. Na tržištu su dostupne formulacije različite poroznosti i specifične površine: mezoporozni silika-gelovi i stakla kontrolisane poroznosti, međutim ovi nosači su skupi i nisu stabilni u baznoj sredini¹⁴².

Zeoliti su mikroporozna aluminosilikatna molekulska sita, čija je struktura dobro definisana. Zeoliti različitog sastava su dostupni iz prirodnih izvora, ali se za industrijske potrebe koriste sintetički zeoliti. Mikroporozni zeoliti imaju heterogenu površinu sa učestalom distribucijom mesta za adsorpciju zbog čega se najčešće primenjuju za imobilizaciju. Celit je vrlo porozna bioafinitetna dijatomejska zemlja. Ovaj materijal se vrlo često koristi za imobilizaciju enzima, jer je lako pristupačan, polarnost mu je niska i ima veliku kontaktnu površinu. Takođe, ispoljava bioafinitetna svojstva i visoku fizičko-hemijsku stabilnost. Zeoliti, celit i njima slični materijali su i sami katalizatori, na šta se mora obratiti pažnja prilikom imobilizacije, kako ne bi interferirali sa enzimskom reakcijom¹³⁷.

Oksidi metala (Al, Ti, Zr) su reaktivni i mogu se dodatno hemijski modifikovati u cilju poboljšanja svojstava imobilizovanih enzima. Za imobilizaciju se najčešće primenjuju hemijski funkcionalizovane nanočestice oksida metala¹⁵². Metali i oksidi metala nisu porozni, pa im je površina za vezivanje enzima znatno manja nego kod poroznih nosača¹⁴².

Aktivni uglj je vrlo popularan nosač za imobilizaciju zbog velike dodirne površine (600 -1000 m²/g) i prečnika pora 30 – 100 nm. Može se koristiti u svom prirodnom nemodifikovanom obliku, nakon tretmana sa hlorovodoničnom kiselinom ili kao mezoporozni aktivni uglj, koji je sve popularniji kao nosač¹³⁷.

2.4.3.3 Primena imobilizovanih lipaza i glikozidaza

U literaturi je dostupan veliki broj protokola za imobilizaciju lipaza različitog porekla na sve, prethodno opisane načine, sa vrlo raznovrsnom primenom. Lipaza iz *Candida rugosa*, adsorbovana na Lewatit VP OC1600, Amberlit XAD7 ili EP100 polipropilen se koristi u sintezi fitosteril-estara pinolenske kiseline¹⁵³, hidrolizi racemske smeše etoksietil-estara Naproksena¹⁵⁴ i regioselektivnoj esterifikaciji glukoze¹⁵⁵, redom. Kovalentnom imobilizacijom CRL na zlatnoj elektrodi sa naknadno uvedenim tiolnim grupama napravljen je impedimetrijski biosenzor za direktnu i brzu kvantifikaciju diazinona, vrlo otrovnog organofosfatnog insekticida¹⁵⁶. Simultanom kovalentnom imobilizacijom lipaze iz *Pseudomonas sp.*, glicerol-kinaze iz *Cellulomonas sp.* i glicerofosfat-oksidade iz *Pediococcus sp.* napravljen je biosenzor za kvantifikaciju TAG u kožnom sebumu¹⁵⁷. Umreženi enzimski agregati CAL A su uspešno primenjeni za kinetičko razdvajanje cefalosporina¹⁵⁸, dok je CAL B imobilizovana na silika gelu upotrebljena za sintezu izopropil-miristata, aditiva za kozmetičku industriju²⁹. U preglednom radu Tana i saradnika data je sveobuhvatna studija primene imobilizovanih lipaza različitog mikrobnog porekla u proizvodnji biodizela iz različitih biljnih ulja i životinjskih masti¹⁵⁹. Umreženi kristali CRL imaju potencijal za razdvajanje racemskih smeša hiralnih estara: S enantiomer ibuprofena na preparativnoj skali je dobijen u prinosu od 30,6 g iz 100 g smeše enantiomera, a isti biokatalizator je ispoljio i dobru operativnu stabilnost u repetitivnom bač reaktoru tokom razdvajanja racemske smeše ketoprofena¹⁶⁰. Vodeći svetski industrijski giganti (BASF, Pfizer, Chemie linz, Bristol-Meyers-Squibb, Sepracor, Schering-Plough, DSM) već uveliko koriste imobilizovane lipaze iz *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia plantarii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida antarctica* i *Serratia marescens* za industrijsku proizvodnju optički aktivnih jedinjenja za farmaceutsku industriju ili estara kao aditiva za prehrambenu i kozmetičku industriju^{3,108}.

Dominantne metode za imobilizaciju glikozidaza su zarobljavanje i kovalentno vezivanje na različite nosače. Zarobljavanjem kovalentno modifikovane invertaze iz ćelijskog zida *Saccharomyces cerevisiae* u Na-alginatni gel, dobijen je imobilizat za inverziju 60 % saharoze sa prinosom od oko 95 % i sa mesečnom produktivnošću reaktora od 3844 kg invertnog šećera/kg imobilizata¹⁵. β -Glukozidaza iz badema, mikroenkapsulirana u

matriks polialilamin-hidrohlorida i dodekandiol-hlorida, se koristi za sintezu alkil-glikozida i alkil-poliglikozida reverznom hidrolizom i transglukozilacijom u različitim reakcionim sistemima¹⁶¹. Termostabilna β -glukozidaza iz *Pyrococcus furiosus*, zarobljena u želatinski gel dejstvom transglutaminaze, je upotrebljena za glikozilaciju 5-fenilpentanola celobiozom sa prinosom proizvoda od 41 %. Imobilizovani enzim čak ni nakon jednomesečnog čuvanja na 90 °C nije izgubio svoju aktivnost¹⁶². Strukturni analog Eupergita, makroporozni kopolimer etilenglikol polimetakrilata i glicidil metakrilata (poli (GMA-co-EDGMA)), je korišćen za kovalentnu imobilizaciju glukoamilaze iz *Aspergillus niger*. U koloni sa napakovanim slojem, produktivnost enzima je tokom 4 nedelje kontinuirane upotrebe, bila 1300 kg glukoze/1 L zapremine reaktora bez vidljivog gubitka aktivnosti¹⁶³. Nakon kovalentne imobilizacije maltaze iz kvasca na Sepabeads EC-EA, temperaturni optimum imobilizovanog enzima je povećan za 10 °C. Primećeni stabilizacioni efekat imobilizacije je potvrđen i nakon inkubacije slobodne i imobilizovane maltaze: imobilizat je nakon 1 h na 45 °C zadržao 20 % početne aktivnosti, dok se slobodan enzim u istim uslovima potpuno inaktivirao. Sepabeads nosači nisu antigeni, imunogeni, niti toksični, pa je predstavljeni protokol pogodan za imobilizaciju drugih α -glukozidaza, koje bi se primenjivale u medicini za lečenje urođenih metaboličkih poremećaja kao što je Pompeova bolest¹⁴⁷.

2.4.3.4 Prednosti i ograničenja imobilizovanih enzima

Za praktičnu primenu imobilizovanih enzima na industrijskoj skali, moraju se uzeti u obzir sledeći parametri¹⁶⁴:

- mehanička i fizičko-hemijska stabilnost imobilizata,
- uticaj imobilizacije na stabilnost, aktivnost i selektivnost enzima,
- složenost protokola za imobilizaciju,
- mogućnost uporednog prečišćavanja i imobilizacije enzima.

Mehanička otpornost imobilizata određuje u kojim konfiguracijama reaktora će on moći da se primenjuje. Bolju mehaničku otpornost i veću fleksibilnost prilikom dizajna reaktora imaju enzimi imobilizovani na nosače, nego unakrsno umreženi enzimi. Agarozna i celuloza su pogodne za primenu u bioreaktorima sa mehaničkim mešanjem, dok su

neorganski nosači više pogodni za primenu u bioreaktorima sa fiksnim slojem. Umreženi kristali enzima se takođe mogu koristiti u reaktorima sa fiksnim slojem, ali zbog visoke abrazivnosti čestica imobilizata vremenom nastaju problemi u performansama ovakvih bioreaktora. Najlošiju kompatibilnost imaju CLEA, koji se bez dodatne stabilizacije ne mogu koristiti u većini reaktorskih konfiguracija¹⁶⁴.

Stabilizacija enzima je jedan od najvažnijih ciljeva imobilizacije, jer od nje direktno zavisi mogućnost kontinuirane upotrebe imobilizata u više uzastopnih reakcionih ciklusa. Kovalentna imobilizacija enzima na neporozne nosače je najbolji način za sprečavanje destabilizacije enzima organskim rastvaračima, molekulima gasa ili usled međusobnog agregiranja¹⁶⁴. Fizička adsorpcija na hidrofobni nosač, oktil-Sepharose je dobro poznati primer stabilizacije i hiperaktivacije lipaza, čija je efikasnost veća i u poređenju sa kovalentnom imobilizacijom¹⁶⁵. Unakrsno umrežavanje je i dalje najefikasniji način za stabilizaciju multimernih enzima. Imobilizacija na heterofunkcionalne nosače sa epoksi ili glioksal-grupama takođe stabilizuje strukturu multimernih enzima, ali je efikasnost ograničena na komplekse do 4 subjedinice¹⁶⁴.

Aktivnost imobilizovanog enzima je podjednako važna kao i njegova stabilnost. Imobilizovani enzim može biti „zaključan“ u svojoj aktivnoj konformaciji (lipaze fizički adsorbovane na hidrofobnim nosačima, ili unakrsnim umrežavanjem agregata u prisustvu detergenata). Difuziona ograničenja značajno mogu uticati na aktivnost imobilizovanog enzima, pogotovo ako supstrat ima veliku molekulsku masu (biomakromolekul) ili je čvrst (tekstil). U pomenutim slučajevima, enzimi se ne mogu imobilizovati na porozne nosače, zarobljavanjem ili unakrsnim umrežavanjem¹⁶⁴.

Enzimi pokazuju optimalnu selektivnost i specifičnost prema svojim fiziološkim supstratima. Međutim, za industrijsku primenu su vrlo često značajniji ne-fiziološki supstrati prema kojima je enzim slabije selektivan i/ili specifičan. Imobilizacija je jedan od načina kojima se može uticati na selektivnost i specifičnost enzima. To je posebno važno za enzime koji se koriste u razdvajanju racemskih smeša ili u kinetički kontrolisanim sintezama antibiotika i fiziološki aktivnih estara ili glikozida. U naučnoj zajednici se javila ideja da se oformi baza imobilizovanih enzima, koja bi znatno olakšala potragu za

optimalnim protokolom za imobilizaciju, zavisno od željene primene. Najveći doprinos ovoj bazi podataka dale bi fizičke i hemijske metode za imobilizaciju enzima na nosače različitih fizičko-hemijskih osobina. Među njima bi, sa aspekta podešavanja selektivnosti i specifičnosti, posebno bile važni heterofunkcionalni nosači, jer obezbeđuju bolju kontrolu orijentacije enzima tokom imobilizacije¹⁶⁴.

Da bi industrijski proces, u kome se koristi imobilizovani enzim, bio profitabilan potrebno je da protokol za imobilizaciju bude što jednostavniji u pogledu broja koraka, vrste reagenasa i dužine trajanja imobilizacije. U tom smislu, fizička adsorpcija je najčešća metoda imobilizacije enzima za industrijsku primenu, jer u optimalnim uslovima može trajati i svega nekoliko minuta¹⁶⁶. U nekim slučajevima je neophodno da više različitih enzima učestvuje u određenoj biotransformaciji. Ko-imobilizacijom se različiti enzimi mogu kombinovati u jedinstveni bioreaktor za kaskadne međureakcije koje vode do konačnog proizvoda. U ovom slučaju je neophodno da svi ciljni enzimi imaju slične osobine, kako bi se imobilizovali na isti način i u sličnim reakcionim uslovima. Stabilnost ko-imobilizata će biti određena poluživotom najmanje stabilnog enzima. Ko-imobilizacija je jedino rešenje kada je jedan od međuproizvoda vrlo nestabilno i reaktivno jedinjenje, koje može neželjeno modifikovati proizvod druge međureakcije, i za recikliranje enzimskih kofaktora kod oksidativnih enzima¹⁶⁷. Ko-imobilizati se mogu dobiti imobilizacijom na nosače i unakrsnim umrežavanjem. Ako se koriste porozni nosači, prečnik pora određen je dimenzijama najvećeg molekula. Primenom neporoznih nosača moguće je nezavisno imobilizovati enzime i njihove kofaktore¹⁶⁸. Kombi-CLEA preparat hidrosinitril-liaze, nitrilaze i amidaze se koriste za konverziju benzaldehida do *S*-bademove kiseline¹⁶⁴.

U industriji se, zbog znatno niže cene, koriste pretežno delimično prečišćeni ili čak sirovi preparati enzima. Međutim, prečišćeni enzimi imaju značajno bolje katalitičke performanse, jer su oslobođeni inhibitora koji mogu biti prisutni u sirovim ili delimično prečišćenim formulacijama enzima. Interesantnu strategiju za simultano prečišćavanje i zarobljavanje lipaze iz soja *Pseudomonas aeruginosa* san-ai opisali su Dimitrijević i saradnici. Kao nosač za prečišćavanje/imobilizaciju enzima upotrebljen je polisaharid alginatnog tipa, koga sam soj proizvodi i luči u fermentacionu čorbu¹⁶⁹. Ova strategija je

vrlo ekonomična, jer kombinuje prečišćavanje enzima i njegovu stabilizaciju imobilizacijom na nosač koga isti soj proizvodi u istoj fermentacionoj čorbi sa enzimom.

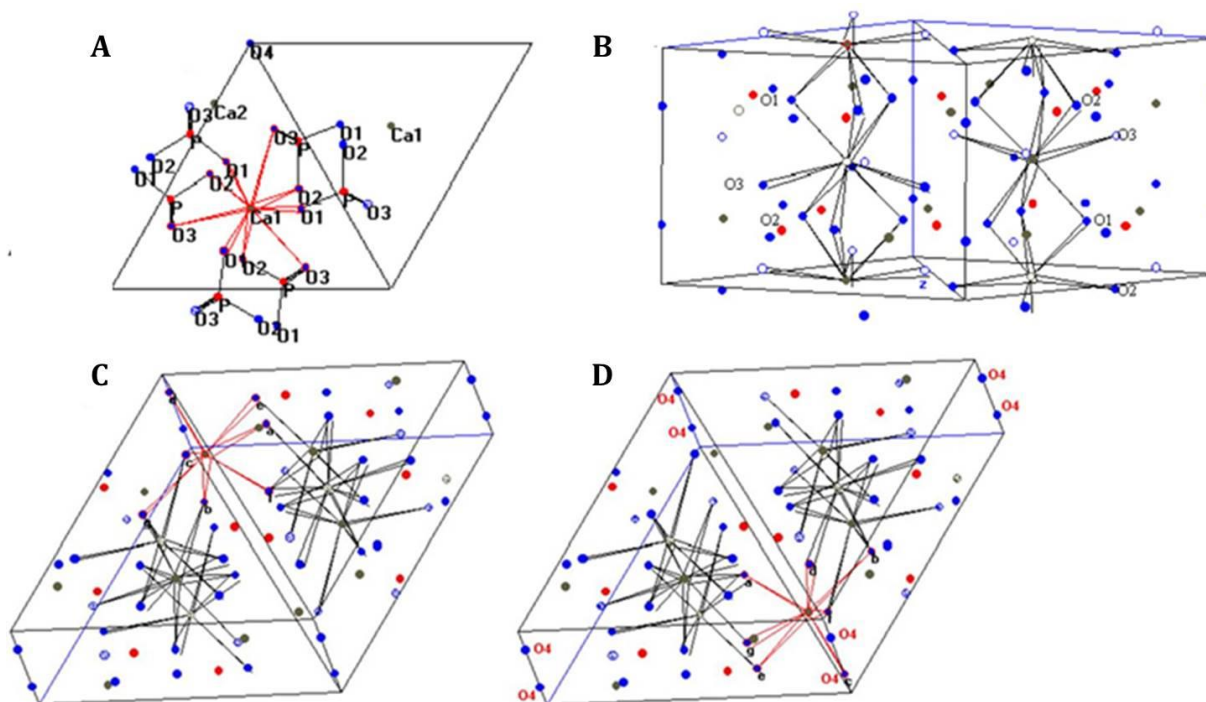
Na osnovu svega navedenog je evidentno da ne postoji univerzalni protokol za imobilizaciju koji bi bio primenjiv na svaki enzim. Dizajn sistema za imobilizaciju je multifaktorijalni proces na koji utiču: fizičko-hemijske osobine enzima i nosača, primena imobilizovanog enzima, odnos cene imobilizata i dobiti ostvarene njegovom primenom.

2.5 Hidroksiapatit kao nosač za imobilizaciju proteina

Hidroksiapatit je bioafinitetni materijal čije su osobine podjednako cenjene u industrijskoj obradi i proizvodnji biološkog materijala (plazmidi farmaceutske čistoće, rekombinantni proteini, terapijska antitela i njihovi fragmenti, endotoksini, viralni genomi, enzimi), kao i u savremenoj medicini (zbrinjavanje povreda i defekata koštanog tkiva različitog intenziteta, stomatološke intervencije, zamena za hrskavicu uha, razvoj očnih implantata, nosač lekova protiv tumora)¹⁷⁰⁻¹⁷⁴. Interakcije HAP sa biomakromolekulima, pogotovo proteinima, esencijalne su za sve nabrojane funkcije. Mehanizam po kome te interakcije nastaju je složen, jer na njega istovremeno utiču osobine biomakromolekula, HAP i sredine u kojoj se one ostvaruju.

2.5.1 Struktura hidroksiapatita

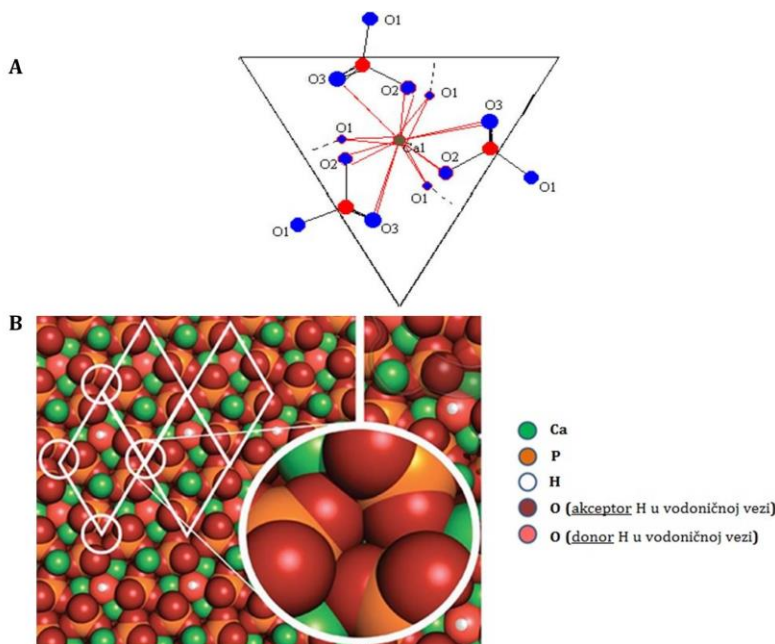
HAP je kristalni oblik kalcijum-fosfata stehiometrijske formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ¹⁷⁵. Kristali HAP imaju heksagonalnu geometriju i pripadaju prostornoj grupi $P6_3/m$. Jedinična ćelija HAP se sastoji iz 2 podjedinice, uređene oko 2 centralna jona kalcijuma (Ca1 i Ca2). Oko centra Ca1 se nalazi 9 atoma kiseonika, pa se ceo sistem naziva CaO_9 (slika 2.13 A). Jedinična ćelija HAP ima ukupno 6 CaO_9 sistema: po 2 na vrhu, u centru i na dnu (slika 2.13 B). Oko centra Ca2 se nalazi 7 atoma kiseonika, grupisanih u CaO_7 sisteme, koji preko vodoničnih veza, drže na okupu CaO_9 sisteme iz susednih podjedinica kristalne ćelije (crvene zvezdaste strukture na slikama 2.13 C i D)¹⁷⁶.



Slika 2.13: Prostorni raspored atoma u kristalnoj rešetki hidroksiapatita¹⁷⁷. **A)** Organizacija CaO_9 sistema; **B)** Raspored funkcionalnih grupa unutar CaO_9 sistema; **C)** Organizacija CaO_7 sistema na vrhu jedinične ćelije; **D)** Raspored funkcionalnih grupa unutar CaO_7 sistema.

Crvene kuglice – fosfor, plave kuglice – kiseonik, sive kuglice – kalcijum, bele kuglice – vodonik.

Oko Ca1 centra su organizovane trijade fosfatnih grupa, tako da jedinična ćelija HAP sadrži ukupno 6 fosfatnih grupa. U stabilizaciji ove strukture ključne su vodonične veze sa kiseonicima 2 i 3 iz CaO_9 sistema (slika 2.14 A)^{176,178}. Atomi kiseonika unutar fosfatnih trijada čine centar negativnog naelektrisanja sa velikim potencijalom za formiranje vodoničnih veza (slika 2.14 B)¹⁷⁹.



Slika 2.14: Organizacija fosfatnih grupa unutar kristalne rešetke hidroksiapatita. **A)** Trijade fosfatnih grupa oko Ca1 (crvene kuglice – fosfor, plave kuglice – kiseonik, sive kuglice – kalcijum, bele kuglice – vodonik)¹⁷⁷; **B)** Struktura centra negativnog naelektrisanja unutar fosfatnih trijada¹⁷⁹.

2.5.2 Vrste interakcija između hidroksiapatita i proteina

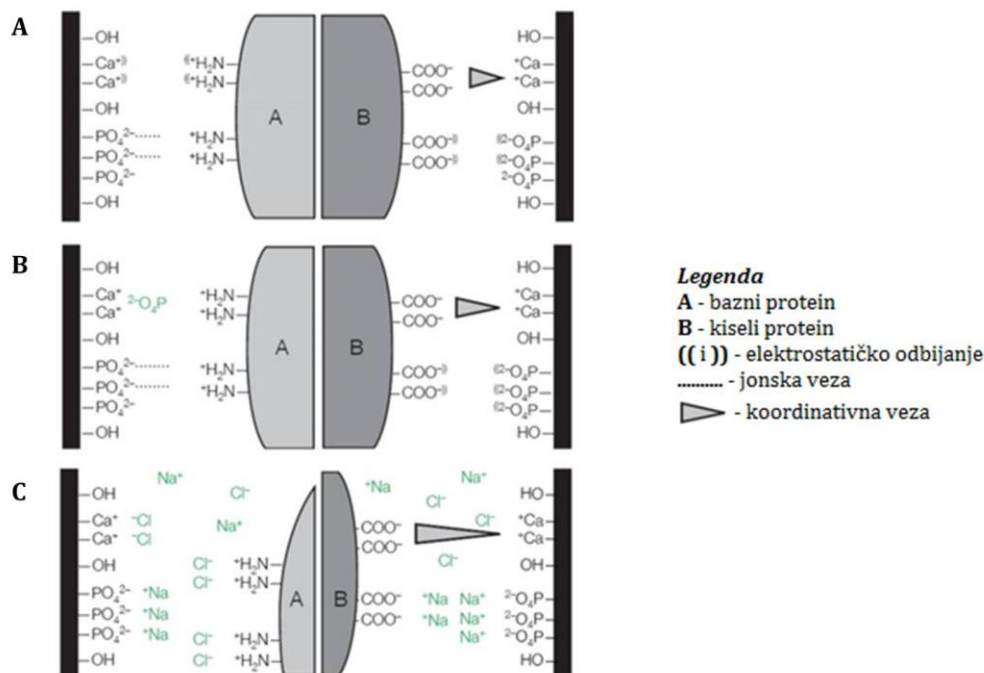
Interakcije biomolekula i HAP se često definišu kao „interakcije mešovitog tipa“ (*eng.* mix-mode), jer više sila različite prirode doprinosi ovom procesu. Glavne vrste interakcija HAP i biomolekula su¹⁸⁰:

- elektrostatičko privlačenje preko kalcijuma i fosfatnih grupa,
- koordinatne veze preko kalcijuma i
- vodonične veze preko -OH grupa.

Vodonične veze nisu ključne u ostvarivanju kontakta biomakromolekula i HAP, već dodatno stabilizuju ovaj kompleks kada se dominantne interakcije već ostvare. One se formiraju i između adsorbovanih proteina međusobno (tzv. bočne interakcije) i stabilne su u prisustvu NaCl¹⁸⁰.

2.5.2.1 Elektrostatičke interakcije u hidroksiapatit-protein kompleksu

Na neutralnom pH moguća je anjonska izmena između kalcijuma na HAP i karboksilnih grupa kiselih proteina ($pI < 5$), odnosno katjonska izmena između fosfata na HAP i -amino-grupa iz baznih proteina ($pI > 8$), što je sumirano na slici 2.15.



Slika 2.15: Doprinos elektrostatičkih interakcija vezivanju proteina na hidroksiapatit¹⁸⁰.

A) Sumarni prikaz; B) Katjonska izmena u prisustvu fosfata; C) Selektivna elucija baznih proteina u prisustvu natrijum hlorida.

Anjonska izmena uključuje privlačne elektrostatičke interakcije između karboksilnih grupa proteina i kalcijuma sa površine HAP, kao i elektrostatičko odbijanje između fosfatnih grupa HAP i karboksilnih grupa sa proteina (slika 2.15 A, kisel protein). Za većinu kiselih proteina, anjonska izmena preko kalcijuma ima sekundarni značaj u poređenju sa mehanizmom kalcijum-koordinativne veze. To je dokazano u eksperimentu u kome su karboksilne grupe nekoliko kiselih proteina zamenjene istovrsno naelektrisanim sulfonatnim grupama. Nakon modifikacije, i pored toga što su proteini zadržali neophodno naelektrisanje, njihov afinitet za vezivanje na HAP je značajno opao, što je istraživače navelo na zaključak da je vrsta funkcionalne grupe, a ne njeno naelektrisanje, ključno za vezivanje kiselih proteina na HAP. I pored toga, anjonske interakcije su neophodne radi

ostvarivanja početnog kontakta kiselih proteina sa HAP i njihove kasnije stabilizacije, pa su po svom efektu slične vodoničnim vezama^{181,182}.

Katjonska izmena je karakteristična za bazne proteine. U ovom slučaju interaguju fosfati sa površine HAP i amino-grupe na proteinu (slika 2.15 B, bazni protein A). Ove interakcije su same po sebi slabe. Zato se u pufer za vezivanje baznih proteina dodaju fosfati u koncentraciji 10-20 mmol/L, jer slobodni fosfati imaju visok afinitet prema kalcijumu na HAP i tako minimizuju elektrostatičko odbijanje sa nosiocima pozitivnog naelektrisanja u proteinu. Smanjenje pH pufera za vezivanje takođe doprinosi jačem vezivanju baznih proteina, zbog porasta njihovog sveukupnog pozitivnog naelektrisanja¹⁸³.

Elektrostatičke interakcije se raskidaju u prisustvu natrijuma i hlorida (slika 2.15 C), u rasponu koncentracija 50-500 mmol/L, zbog elektrostatičkog privlačenja natrijuma sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama nosača, odnosno elektrostatičkog privlačenja hlorida sa pozitivno naelektrisanim jonima kalcijuma na HAP^{182,184}. Joni kalcijuma takođe pospešuju eluciju baznih proteina sa HAP, jer imaju visok afinitet za fosfatne⁻ grupe na nosaču¹⁸⁴.

2.5.2.2 Metal-koordinatna veza

Glavni doprinos vezivanju kiselih proteina za HAP daje metal-koordinatna veza između karboksilnih grupa iz proteina i kalcijuma iz nosača¹⁸⁴. Ova vrsta interakcija je posebno izražena kada su interagujuće grupe na proteinu grupisane, tako da udruženo kompleksiraju kalcijum. Za razliku od većine nosača u proteinskoj hemiji, funkcionalne grupe na HAP su statične, sa precizno utvrđenim rasporedom u kristalnoj rešetki¹⁸⁰. Literaturni podaci potkrepljuju hipotezu da je rastojanje između karboksilnih grupa na površini proteina od velikog značaja za formiranje koordinativne veze sa kalcijumom: Gorbunof i saradnici navode da je efekat heliranja kalcijuma jači kod proteina kod kojih su površinske karboksilne grupe na manjem međusobnom rastojanju, a Makrodimitris i saradnici su opisali motiv za prepoznavanje HAP na staterinu, u kome rastojanja između karboksilnih grupa u proteinu upravo rastojanjima funkcionalnih grupa u kristalnoj rešetki HAP¹⁷⁹.

Metal-koordinatna veza je znatno jača od neselektivne anjonske izmene, tako da se ove interakcije ne mogu raskinuti čak ni u visokim koncentracijama NaCl u elucionom puferu (3 mol/L)¹⁸⁵. Divalentni joni (Ca^{2+} i Mg^{2+}) će samo ojačati ove interakcije, jer formiraju soni most između karboksilnih grupa proteina i fosfatnih grupa HAP¹⁸⁴. Za raskidanje ove vrste interakcija je potreban eluent sa visokim afinitetom za kalcijum, a to su fosfati i fluoridi. Kako je konstanta disocijacije kompleksa Ca-PO₄ (ili Ca-F) mnogo manja od konstante disocijacije Ca-OOC, kiseli proteini se veoma lako eluiraju sa puferom koji sadrži fosfatne ili fluoridne jone u opsegu koncentracija 10-400 mmol/L (izokratski ili gradijentni način elucije)¹⁸³. Proteini sa većim udelom karboksilnih grupa su osetljiviji na eluciju sa fosfatima. Koncentracija fosfata potrebna za eluciju kiselih proteina sa HAP se može lako podešavati, paralelno sa promenom pH u elucionom puferu. Na niskom pH koordinativna veza sa kalcijumom je glavni način vezivanja kiselih proteina. Kada je pH > pKa -COOH grupe, koordinativna veza slabi i elucija se postiže pri nižoj koncentraciji fosfata. Sa daljim porastom pH i ulaskom u baznu oblast, doprinos koordinativne veze opada, ali jača anjonska izmena preko -COO⁻, pa koncentracija fosfata za eluciju ponovo raste dok se ne dostigne plato na 60 mmol/L¹⁷⁵. Visok afinitet fosfatnih grupa prema kalcijumu iz HAP objašnjava jako vezivanje fosfoproteina i fosfolipida za ovaj nosač¹⁷³.

2.5.3 Hidroksiapatit kao nosač za imobilizaciju enzima u industriji i biomedicini

Glavni metod imobilizacije enzima na HAP je fizička adsorpcija. Ureaza iz *Canavalia ensiformis* je adsorbovana na HAP, u prisustvu 2 mM Na₂SO₃ kao stabilizatora ureazes¹⁸⁶. Adsorpcijom α -amilaze iz *Bacillus subtilis* dobijen je efikasan biokatalizator za hidrolizu skroba¹⁵³. Levan-saharaza iz *Zymomonas mobilis*, imobilizovana na HAP, se koristi za proizvodnju levana¹⁸⁷. Imobilizovani preparat fruktozil-transferaze iz *Streptococcus mutans* se primenjuje za sintezu fruktana i glukoze¹⁸⁸. HAP se može primeniti i za simultanu imobilizaciju više enzima, kao što je slučaj sa istovremenom imobilizacijom glukozo-oksidade iz *Aspergillus niger* i ureaze iz *Canavalia ensiformis*. Dobijeni imobilizovani preparat se koristi kao biosenzor za praćenje nivoa glukoze i uree u uzorcima različitog porekla¹⁸⁹. Adsorpcijom peroksidaze iz rena na nano-HAP je dobijen biosenzor za praćenje nivoa H₂O₂ unutar i van ćelije¹⁹⁰. Hidroperoksid-liaza iz *Amaranthus tricolor*, adsorbovana na keramički HAP se primenjuje za sintezu heksanala, 2(*E*)-heksenala i 3 (*Z*)-heksenala,

mirisnih jedinjenja sa aromom svežeg voća i povrća¹⁹¹. Dekstranaza iz *Penicillium aculeatum* je adsorbovana na HAP, prethodno tretiran ultrazvukom, u prisustvu albumina kao stabilizatora i taj preparat se koristi za hidrolizu dekstrana prilikom proizvodnje šećera¹⁹². Nanočestice HAP-a su primenjene i u imobilizaciji sericina iz svile u uslovima simuliranih telesnih tečnosti, kako bi se razvio materijal za remodeliranje tkiva prilikom zarastanja rana¹⁹³. Adsorpcijom proteaze iz *Aspergillus oryzae* je dobijen imobilizovani preparat sa potencijalnom primenom u farmaceutskoj, prehrambenoj, hemijskoj industriji i industriji kože¹⁹⁴. Laktaza iz *Kluyveromyces lactis*, kovalentno imobilizovana glutaraldehydom na hitozan-HAP kompleks se koristi za proizvodnju mleka bez laktoze¹⁹⁵.

2.6 Ciljevi naših radova

1. Optimizacija uslova za imobilizaciju lipaza i glikozidaza od biotehnološkog značaja na hidroksiapatit.
2. Detaljna studija mehanizma interakcija enzim-hidroksiapatit.
3. Ispitivanje uticaja imobilizacije na stabilnost i aktivnost imobilizovanih enzima u nekonvencionalnim reakcionim uslovima.
4. Primena preparata lipaza i glikozidaza u sintezi alifatičnih i aromatičnih estara i glikozida u nevodenim reakcionim uslovima.

3. NAŠI RADOVI

Poglavlje Naši radovi predstavlja prikaz i diskusiju rezultata ove doktorske disertacije. Poglavlje je tematski podeljeno u 5 celina. U prvoj celini je ispitana mogućnost primene HAP kao nosača za imobilizaciju lipaza i glikozidaza. Prvo je iz svake grupe odabran enzim koji se najbolje vezuje za nosač, a potom su optimizovani i ostali reakcioni parametri za imobilizaciju CRL i AOL na HAP. Druga celina obuhvata proučavanje mehanizma interakcija između imobilizovanih enzima i HAP. Pripremljeni imobilizati su okarakterisani skenirajućom elektronskom mikroskopijom, ispitano je pod kojim se uslovima eluiraju sa nosača i identifikovane su sekvence preko kojih interaguju sa HAP. U trećoj celini je ispitan efekat imobilizacije na stabilnost imobilizata u uslovima povišene temperature i organskih rastvarača. Četvrta celina se odnosi na mogućnosti primene dobijenih imobilizata u nevodnim reakcionim sistemima. Katalitička efikasnost imobilizovanih enzima je ispitana u sintezi alifatičnih i aromatičnih estara i glikozida. Dobijeni proizvodi su strukturno okarakterisani i tako je pružen uvid u supstratnu specifičnost imobilizovanih enzima. Poslednja, peta celina, predstavlja zaključke ove doktorske disertacije.

3.1 Imobilizacija lipaza i glikozidaza na hidroksiapatit

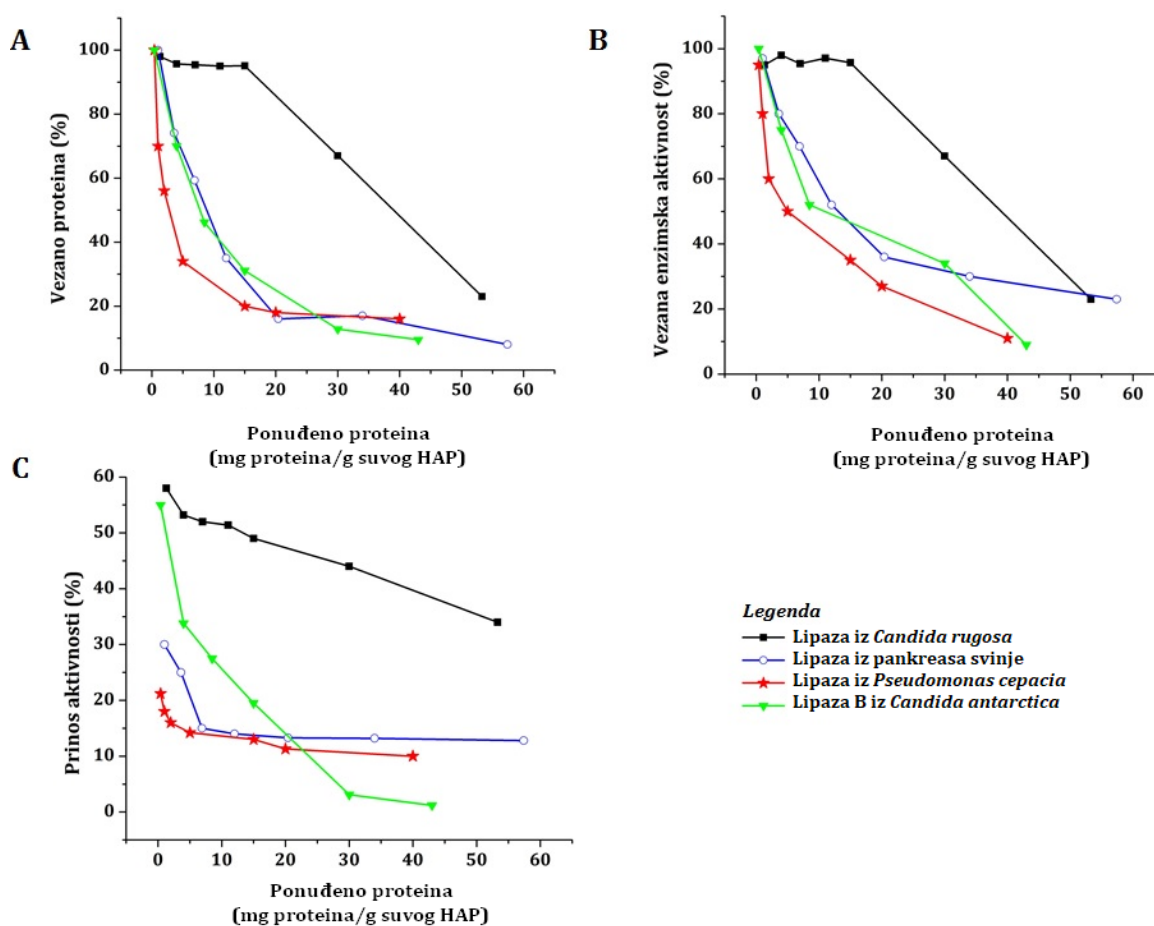
Potencijal HAP, kao nosača za imobilizaciju industrijski značajnih hidrolitičkih enzima, testiran je na primeru ukupno 8 enzima, tačnije 4 lipaze i 4 glikozidaze različitog porekla, strukture i supstrate specifičnosti. Njihove osnovne karakteristike su detaljno opisane u Opštem delu. Osnovni cilj ove grupe eksperimenata je bio da se odaberu enzimi koji se najbolje vezuju za nosač i da se optimizuje njihova imobilizacija na HAP radi dalje karakterizacije i primene.

3.1.1 Odabir lipaze za imobilizaciju na hidroksiapatit

U ovom eksperimentu je testirana efikasnost vezivanja 4 industrijski značajne lipaze za HAP, prema eksperimentalnom postupku iz odeljka 4.1.1. Među njima su dve fungalne lipaze (CRL, CAL B), jedna bakterijska (PCL) i jedna lipaza životinjskog porekla (PPL). Izbor gorepomenutih lipaza je utemeljen na brojnim publikacijama, koje svedoče o njihovoj vrlo raznovrsnoj primeni u hidrolizi složenijih industrijskih supstrata i sintezi brojnih

industrijski značajnih i fiziološki aktivnih jedinjenja, kao što je detaljno opisano u Opštem delu ove doktorske disertacije.

Efikasnost vezivanja je opisana preko 3 kvantitativna parametra: % vezanih proteina, % vezane enzimске aktivnosti i prinosa aktivnosti imobilizovanih lipaza. Rezultati izraženi za % vezanih proteina, odnosno % vezane enzimске aktivnosti su izračunati iz razlike količine proteina, odnosno enzimске aktivnosti nanete na matriks i one koja je detektovana u supernatantima nakon imobilizacije. Prinos aktivnosti je izračunat kao odnos količina enzimске aktivnosti direktno izmerene u imobilizovanom preparatu i vezane enzimске aktivnosti. Na slici 3.1 su sumirani rezultati opisanih merenja.



Slika 3.1: Odabir lipaza za imobilizaciju na hidroksiapatit. **A)** Efikasnost vezivanja lipaza izražena preko % vezanih proteina; **B)** Efikasnost vezivanja lipaza izražena preko % vezane enzimске aktivnosti; **C)** Efikasnost vezivanja lipaza izražena preko % zadržane enzimске aktivnosti u imobilizovanom preparatu.

Iz slike 3.1 se jasno uočava da se po svim nabrojanim kriterijumima za HAP najefikasnije vezuje CRL. Kada se nosaču ponudi oko 10 mg (proteina)/g suvog nosača, tada se na njega adsorbuje više od 95 % proteina, odnosno enzimske aktivnosti iz komercijalnog preparata CRL (slike 3.1 A i 3.1 B). Ovako visoke vrednosti su rezultat blagih reakcionih uslova u kojima je enzim imobilizovan, kao i visokog afiniteta HAP prema pomenutoj lipazi. Ostale ispitane lipaze pokazuju drugačije profile vezivanja: sa porastom ponuđene količine proteina može se uočiti oštar pad svih praćenih kvantitativnih parametara sa slike 3.1.

Lipaze iz *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* i pankreasa svinje pokazuju slične profile prinosa aktivnosti, kod kojih se prinos aktivnosti ne menja značajno sa porastom ponuđene koncentracije proteina, s tim što među testiranim enzimima pri optimalnoj nanetoj količini proteina CRL u imobilizovanom obliku zadržava gotovo 55 % hidrolitičke aktivnosti, a PCL i PPL zadržavanju maksimalno 15 – 25 % hidrolitičke aktivnosti u imobilizatu (slika 3.1 C). Dobijena vrednost za lipazu iz *Candida rugosa* je višestruko veća i u poređenju sa prinosom aktivnosti nekih drugih enzima, imobilizovanih na isti nosač: 13 % za dekstranazu iz *Penicillium aculeatum*, 22 % za α -amilazu iz *Bacillus subtilis* ili 30 % za levan-saharazu iz *Zymomonas mobilis*^{153,187,192}.

Imobilizovana CAL B pri optimalnoj nanetoj količini proteina zadržava sličnu aktivnost kao i CRL. Sa druge strane, kada se uporede profili prinosa aktivnosti ove dve lipaze sa slike 3.1 C, uočava se jasna razlika, jer sa porastom ponuđene koncentracije proteina naglo opada prinos aktivnosti imobilizovane CAL B. Moguće je da se ova lipaza višeslojno imobilizuje na HAP i da se višak enzima „lepi“ za sloj molekula koji su se već vezali za nosač, što se manifestuje smanjenjem prinosa njene aktivnosti u imobilizovanom obliku usled difuzionih ograničenja¹⁹⁶.

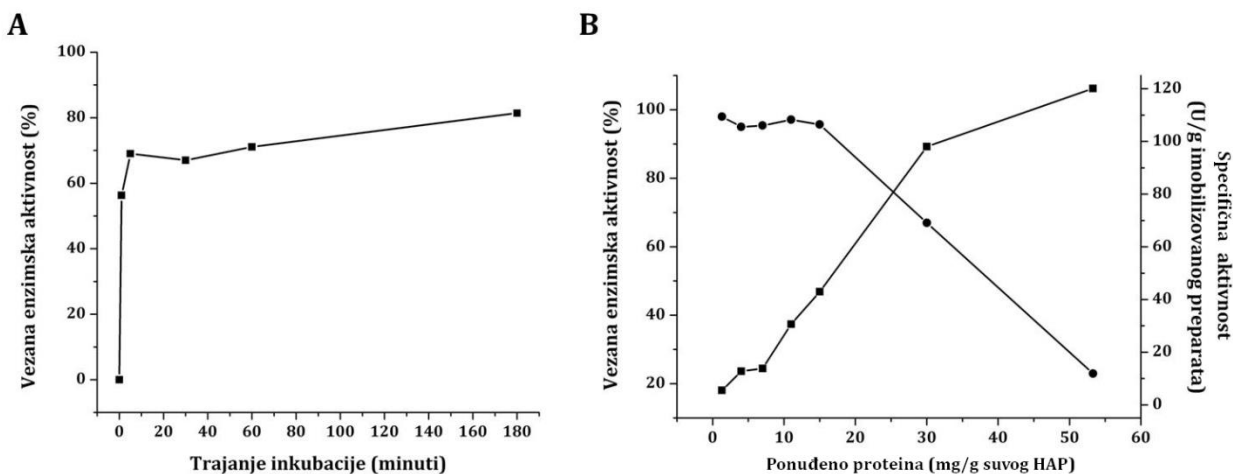
Sve 4 testirane lipaze imaju slične *pI* vrednosti u opsegu 5 – 6, pa se primećena razlika u profilu vezivanja ne može pripisati samo ovom faktoru. Nešto značajnija razlika između lipaza iz ove studije se primećuje u njihovoj molekularnoj masi: molekulske mase CRL, PPL, CAL B i PCL iznose redom: 60 kDa, 50 kDa, 33 kDa i 31 kDa, što bi moglo objasniti bolje vezivanje lipaza sa većim molekularnim masama (lipaze iz *Candida rugosa* i pankreasa

svinje, slike 3.1 B i 3.1 C) zbog većeg broja dostupnih grupa po molekulu proteina za interakcije sa nosačem. Međutim, razlika u molekulskim masama nije jedini faktor koji može objasniti različito vezivanje testiranih lipaza za HAP. Lipaze iz *Candida rugosa* i pankreasa svinje imaju slične molekulske mase, a prinos aktivnosti PPL sa slike 3.1 C je 2 puta manji nego kod CRL, što je verovatno posledica različite orijentacije funkcionalnih grupa na površini ove dve lipaze tokom njihove interakcije sa HAP.

Lipaza iz *Candida rugosa* se po primeni i značaju svrstava u sam vrh industrijskih biokatalizatora iz grupe hidrolitičkih enzima. U preliminarnom eksperimentu imobilizacije različitih lipaza na HAP, čiji su rezultati upravo opisani, isti enzim je pokazao najbolje rezultate u pogledu prinosa imobilizacije po svim kvantitativnim kriterijumima. Stoga je ona odabrana kao predstavnik lipaza za imobilizaciju na HAP, te su za tu kombinaciju enzim-nosač u nastavku optimizovani i ostali reakcioni parametri.

3.1.2 Optimizovanje imobilizacije lipaza iz *Candida rugosa* na hidroksiapatit

Tokom ove grupe eksperimenata su detaljnije ispitane kinetika vezivanja CRL na HAP i kapacitet HAP za vezivanje ovog enzima. Praćenje brzine vezivanja enzima za nosač pruža uvid o optimalnom vremenu kontakta između enzima i nosača kako bi se postiglo najbolje vezivanje. Isto tako je poznato da efikasnost svakog protokola za imobilizaciju enzima u velikoj meri zavisi od kapaciteta nosača¹⁵². U ovim eksperimentima je praćena zavisnost % vezane enzimske aktivnosti od parametra koji se ispituje: dužine trajanja inkubacije ili ponuđene količine proteina. Eksperimentalni postupak je detaljno opisan u odeljku 4.1.2, a rezultati su sumirani na slici 3.2.

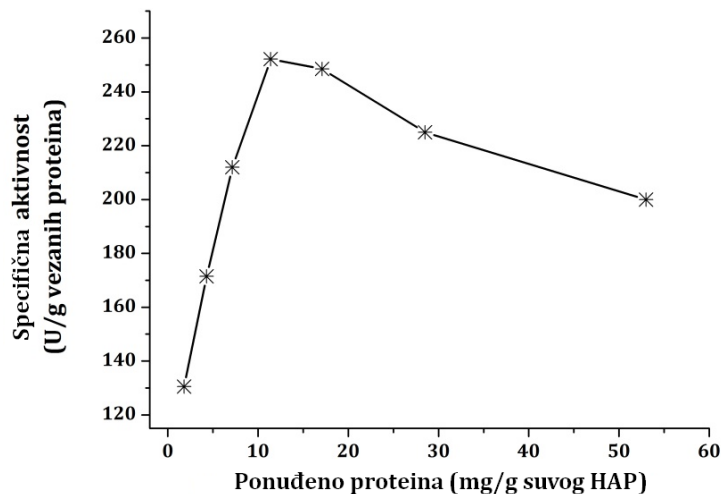


Slika 3.2: Određivanje optimalnih reakcionih parametara za imobilizaciju lipaze iz *Candida rugosa* na hidroksiapatit. **A)** Ispitivanje kinetike vezivanja lipaze za hidroksiapatit; **B)** Uticaj količine ponuđenih proteina i enzimske aktivnosti na efikasnost vezivanja lipaze za hidroksiapatit.

Lipaza iz *Candida rugosa* se imobilizuje na HAP gotovo trenutno: samo u prvom minutu kontakta se čak 50 % enzima vezuje za nosač (slika 3.2 A), što nedvosmisleno ukazuje na visok afinitet nosača prema enzimu, a takođe ukazuje i na to da se CRL imobilizuje na HAP po mehanizmu fizičke adsorpcije. Nakon 5 minuta inkubiranja se dostiže plato u vezanoj enzimskoj aktivnosti, nakon čega sa daljim produžavanjem inkubiranja % enzimске aktivnosti vezane za nosač ne raste značajno. Sličan profil kinetike vezivanja lipaza na HAP je primećen i prilikom adsorpcije termostabilne CAL A. Maksimalni % vezane enzimске aktivnosti za obe lipaze iznosi 80 %, s tim što je optimalno vreme inkubiranja CAL A i HAP iznosilo 30 minuta¹⁹⁷. Kombinacijom rezultata sa slike 3.2 A i onih iz studije sa CAL A, u daljem eksperimentalnom radu je kao optimalno vreme kontakta između enzima i nosača tokom imobilizacije definisana vrednost od 30 minuta. Odabrano vreme je dovoljno da se postigne skoro maksimalno vezivanje lipaze za nosač, a istovremeno je prihvatljivo za industrijsku primenu imobilizata.

Grafik sa slike 3.2 B sumira uticaj ponuđene količine proteina na efikasnost imobilizacije CRL na HAP. Kao što je i očekivano, količina ponuđenih proteina ima značajan uticaj na oba ispitana parametra. Specifična aktivnost imobilizovane lipaze raste sa porastom količine ponuđenih proteina, ali raste manjom brzinom nego što opada vezana

enzimska aktivnost. Naime, ukoliko se količina ponuđenih proteina poveća sa 10 mg/g nosača na 60 mg/g, prinos vezivanja enzima opada sa 97 % na oko 20 %, odnosno oko 5 puta, usled proboja kapaciteta nosača. Pri istim uslovima specifična aktivnost poraste sa 30 U/g na 120 U/g, odnosno svega 4 puta. Ovo se najverovatnije dešava zbog neželjenih protein-protein interakcija na površini HAP, koje onemogućuju pristup supstrata aktivnom mestu enzima.



Slika 3.3: Uticaj ponuđene koncentracije proteina na specifičnu aktivnost imobilizovane lipaze iz *Candida rugosa*.

Ukoliko se posmatra zavisnost specifične aktivnosti (izražene kao U/g vezanih proteina) od ponuđene koncentracije proteina po g suvog nosača, evidentno je da se za vrednosti koncentracije proteina do 10 mg/g suvog nosača postiže maksimalna specifična aktivnost između 130 i 250 U/g (slika 3.3). Sa daljim porastom ponuđene koncentracije proteina, primetan je drastičan pad u specifičnoj aktivnosti imobilizovanog enzima. Dakle, u našem slučaju se pokazalo da je optimalno kada se na nosač nanese oko 10 mg (proteina)/g nosača, jer se tada po g vezanih proteina dobija najveća aktivnost imobilizovanog enzima.

U tabeli 3.1 je upoređena efikasnost imobilizacije lipaze iz *Candida rugosa* na HAP sa adsorpcijom istog enzima na neke druge nosače, opisane u literaturi. Kao kriterijum za poređenje je korišćen % vezane enzimske aktivnosti u optimalnim reakcionim uslovima.

Tabela 3.1: Poređenje efikasnosti imobilizacije lipaze iz *Candida rugosa* adsorpcijom na različite nosače.

Nosač	% Vezane enzimске aktivnosti	Literaturni navod
Hidroksiapatit	97,0	198
Mezoporozni silicijum-dioksid (SBA-15)	80,0	199
Porozni hitozan	78,0	200
Beli bentonit (BMS)	61,0	201
Cirkonijum-oksidi (ZnO)	55,0	199
Aluminijum-oksidi (AlO)	38,0	202
Amorfni niobijum-oksidi (ANO)	27,3	203
Kristalni niobijum-oksidi (CNO)	12,6	203
Pahuljasti neporozni hitozan (eng. chitosan flakes)	7,0	200

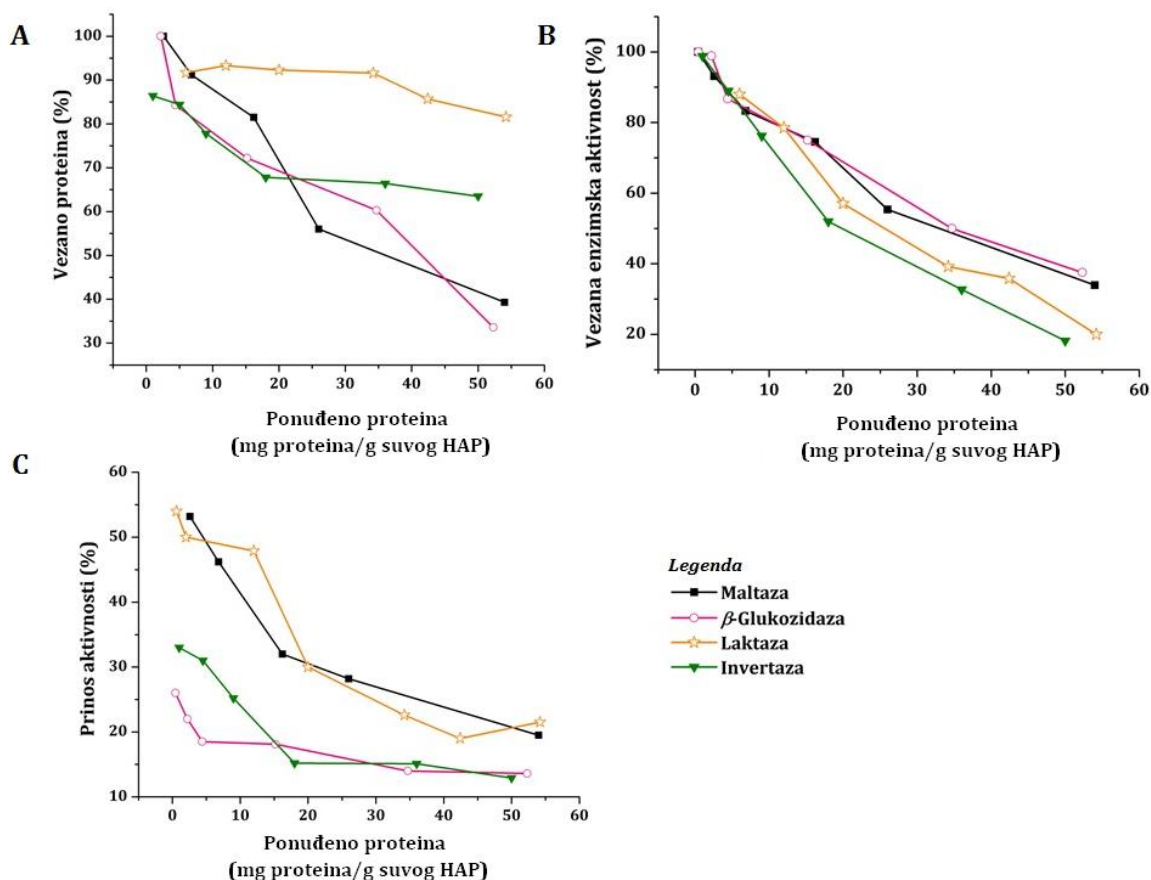
Iz tabele 3.1 se jasno vidi da je HAP najbolji izbor za fizičku adsorpciju lipaze među upoređenim nosačima. Na HAP se veže gotovo 20 % više enzimске aktivnosti lipaze, nego na neke druge popularne nosače (silicijum-dioksid i hitozane). Dodatno, prinos aktivnosti lipaze imobilizovane na porozni hitozan je svega 15 %, što je oko tri puta niže u odnosu na vrednost dobijenu za HAP u ovoj doktorskoj disertaciji (slika 3.1 C)²⁰⁰. U poređenju sa bentonitom, nosačem koji se vrlo često koristi za adsorpciju enzima, % vezane enzimске aktivnosti lipaze je gotovo dva puta veći kada se ona imobilizuje na HAP.

Hidroksiapatit se pokazao kao daleko bolji izbor za imobilizaciju lipaze iz *Candida rugosa* i od nosača baziranih na oksidima metala (ZrO, AlO, ANO, CNO). Poznato je da je glavni mehanizam adsorpcije enzima na nosače ovog tipa posredovan vodoničnim vezama, koje nisu ni dovoljno jake, ni dovoljno specifične da obezbede značajniju imobilizaciju, osim ukoliko se oksidi metala dodatno ne funkcionalizuju¹³⁷. Vrlo značajno ograničenje ove grupe nosača je što su i oni sami katalizatori, pa svojim katalitičkim dejstvom mogu ometati enzimski katalizovanu reakciju.

3.1.3 Odabir glikozidaze za imobilizaciju

U ovom eksperimentu je upoređena efikasnost HAP u vezivanju maltaze i invertaze iz *Saccharomyces cerevisiae*, β -glukozidaze iz badema i AOL. Glikozidaze, koje su testirane u ovom eksperimentu, razlikuju se po poreklu, strukturi i supstratnoj specifičnosti, ali im je zajedničko to što su vrlo zastupljene u brojnim industrijskim transformacijama šećera. Upravo to je i bio glavni kriterijum pri odabiru predstavnika ove grupe hidrolitičkih enzima koji će biti testirani.

Reakcioni parametri i detaljni eksperimentalni postupci su opisani u odeljku 4.1.3. Odabir enzima je baziran na istovetna tri kvantitativna parametara, kao kod lipaza u odeljku 3.1.1. Rezultati ovih eksperimenata su predstavljeni na slici 3.4.



Slika 3.4: Odabir glikozidaze za imobilizaciju na hidroksiapatit. **A)** Efikasnost imobilizacije izražena preko % vezanih proteina; **B)** Efikasnost imobilizacije izražena preko % vezane enzimске aktivnosti; **C)** Efikasnost imobilizacije izražena preko prinosa aktivnosti imobilizovanih glikozidaza.

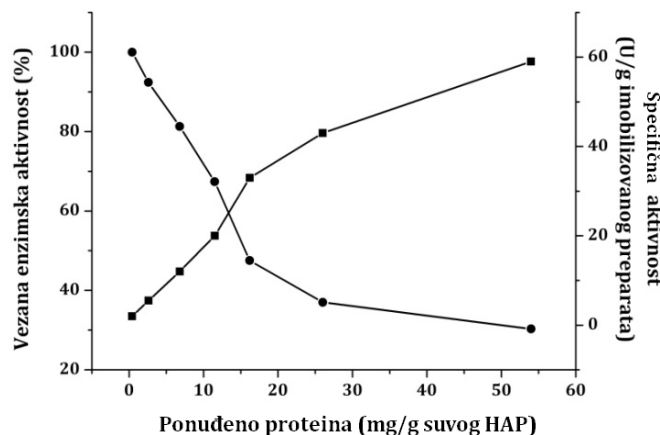
Ukoliko se kao kriterijum efikasnosti uzme % vezanih proteina, sa grafika na slici 3.4 A je jasno da je vezivanje AOL daleko efikasnije u poređenju sa ostalim testiranim glikozidazama. Štaviše, u celom testiranom opsegu ponuđene količine proteina, % vezanih proteina je gotovo nepromenljiv i iznosi 90 ± 2 %. Kada se efikasnost imobilizacije na HAP posmatra preko % vezane enzimske aktivnosti, sva četiri testirana enzima pokazuju sličan profil, gde se maksimalni % vezane enzimske aktivnosti ostvaruje pri nižim ponuđenim koncentracijama proteina (slika 3.4 B).

Kada se posmatra prinos aktivnosti, parametar koji je najznačajniji sa aspekta potencijalne dalje primene imobilizovanog preparata, vidi se da i prema ovom kriterijumu laktaza prednjači u poređenju sa ostalim testiranim glikozidazama (slika 3.4 C), jer za optimalnu ponuđenu količinu od 7 mg proteina/g suvog HAP prinos aktivnosti imobilizovanih glikozidaza opada u nizu: laktaza (55 %) > maltaza (50 %) > invertaza (30%) > β -glukozidaza (22 %).

Laktaza je glikozid-hidrolaza višestrukog značaja u industriji mleka zbog hidrolize laktoze, a još više zbog toga što u sintetičkim reakcijama sintetiše dve značajne grupe proizvoda: galaktozide i galakto-oligosaharidne probiotike. Shodno tome, ona je odabrana kao model enzim iz grupe testiranih glikozidaza, čija je imobilizacija na HAP dalje optimizovana.

3.1.4 Optimizovanje imobilizacije laktaze iz *Aspergillus oryzae* na hidroksiapatit

Budući da je dužina trajanja imobilizacije optimizovana tokom eksperimenta sa lipazom u odeljku 3.1.2, u okviru ovog eksperimenta je najviše pažnje posvećeno ispitivanju uticaja ponuđene količine proteina i enzimske aktivnosti (izraženo po jedinici suve mase odabranog nosača) na aktivnost imobilizovane laktaze. Rezultati su dati na slici 3.5.



Slika 3.5: Efekat ponuđene koncentracije proteina na prinos imobilizacije i specifičnu aktivnost laktaze iz *Aspergillus oryzae* na hidroksiapatit.

U poređenju sa profilima prikazanim na slikama 3.2 B i 3.3 za lipazu, u slučaju laktaze se uočava znatno oštrije uticaj količine ponuđenih proteina na vezanu enzimsku aktivnost. Ukoliko se ovaj parametar uzme kao kriterijum za efikasnost primenjenog protokola za imobilizaciju, maksimalna količina proteina koja se može ponuditi nosaču u slučaju imobilizacije laktaze na HAP je oko 5 mg/g nosača. U tim uslovima laktaza se, slično lipazi iz *Candida rugosa*, gotovo kvantitativno veže za HAP (% vezane aktivnosti je 97 % za laktazu), a specifična aktivnost imobilizovanog preparata iznosi oko 7 U/g preparata.

Efikasnost imobilizacije laktaze na HAP je upoređena sa imobilizacijom istog enzima na drugim, nosačima opisanim u literaturi. Kriterijum za poređenje je relativni % vezane enzimске aktivnosti i rezultati su predstavljeni u tabeli 3.2.

Tabela 3.2: Poređenje efikasnosti imobilizacije laktaze iz *Aspergillus oryzae* na različitim nosačima.

Nosač	Vezana enzimaska aktivnost (%)	Literaturni navod
Hidroksiapatit	96,7	Ova doktorska disertacija
Chromosorb-W	94,8	204
Duolit S-761	94,0	205
Duolit A 568	90,0	206
Duolit A-7	74,0	205
Nativni cink-oksidi (ZnO)	60,0	207
Pamučna vlakna	55,0	208

Kao što se može videti iz tabele 3.2, imobilizacija AOL na HAP daje slične rezultate u pogledu efikasnosti u poređenju sa popularnim nosačima, zasnovanim na glinama (Chromosorb-W) ili jonoizmenjivačkim smolama (Duolite), s tim što je adsorpcija laktaze na HAP dva puta kraće trajala nego adsorpcija istog enzima na Duolite²⁰⁶. Kada se kao nosači za imobilizaciju uporede pamučna vlakna, oksidi metala i HAP, imobilizacija na HAP je prema prinosu imobilizacije bila dva puta efikasnija. U literaturi se često ističe ekonomičnost i laka dostupnost pamučnih vlakana, kao nosača za imobilizaciju. Međutim, pamučna vlakna i njima slični materijali su vrlo inertni i neophodno je dodatno ih hemijski modifikovati kako bi se prinos imobilizacije povećao.

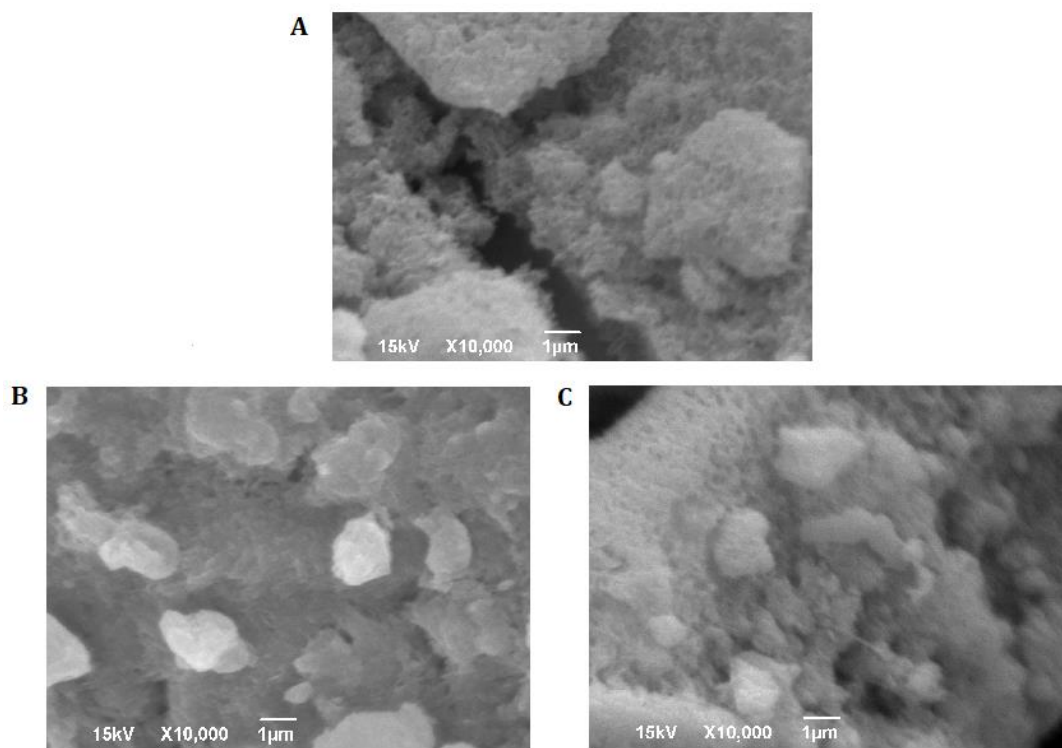
Interesantan protokol za imobilizaciju laktaze, koji se po vrsti korišćenog materijala može uporediti sa HAP, su opisali Karpio i saradnici. Laktaza je, u pomenutoj publikaciji, adsorbovana na čestice sprasjenih kostiju, dobijene nakon obrade i mlevenja pilećih šija. Prinos imobilizacije, izražen preko vezane laktazne aktivnosti je iznosio 83 %²⁰⁹, odnosno 14 % manje nego tokom adsorpcije na HAP (tabela 3.2). Vredi napomenuti i da je imobilizacija laktaze na HAP, iz ove doktorskse disertacije, dala iste rezultate u pogledu prinosa imobilizacije (slika 3.4 C) kao i vrlo često korišćena metoda fizičke imobilizacije enzima zarobljavanjem u gelove kalcijum-alginata²¹⁰. Udeo enzima aktivnog u imobilizovanom obliku je u oba slučaja iznosio oko 55 %.

3.2 Proučavanje mehanizma interakcija između imobilizovanih enzima i hidroksiapatita

Nekoliko metodoloških pristupa je korišćeno u ovoj ekperimentalnoj fazi. Imobilizati su prvo morfološki okarakterisani skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Potom je ispitan uticaj različitih reagenasa za eluciju enzima sa nosača. Na taj način je definisan osnovni mehanizam interakcija enzim-HAP. Na kraju je, tehnikom molekuskog modelovanja i pretragom različitih proteinskih i enzimskih baza podataka, za imobilizovane enzime određen deo strukture preko koga se oni vezuju za HAP.

3.2.1 Morfološka analiza enzima imobilizovanih na hidroksiapatitu skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je primenjena radi analize površinske morfologije uzoraka HAP pre i nakon imobilizacije CRL i AOL. Uzorci su pripremljeni i analizirani u uslovima, opisanim u odeljku 4.2.1, a SEM mikrografije sa uvećanjem 10000 x su predstavljene na slici 3.6.



Slika 3.6: Morfološka analiza uzoraka enzima imobilizovanih na hidroksiapatitu.

- A)** Hidroksiapatit bez enzima; **B)** Hidroksiapatit sa imobilizovanom lipazom iz *Candida rugosa*;
C) Hidroksiapatit sa imobilizovanom laktazom iz *Aspergillus oryzae*.

Čestice HAP, predstavljenog slikom 3.6 A, su pločastog oblika i udružene su u agregate neujednačene veličine. Ivice čestica su nepravilnih crta, dok je površina HAP izrazito hrapava. Između nekoliko većih agregata, jasno se uočava i nekoliko većih šupljina. U literaturi je dokumentovan diverzitet u strukturi, obliku i distribuciji veličina čestica nosača iz porodice apatita, pa tako one mogu biti pločaste, cevaste, granularne, gusto pakovane ili igličaste²¹¹.

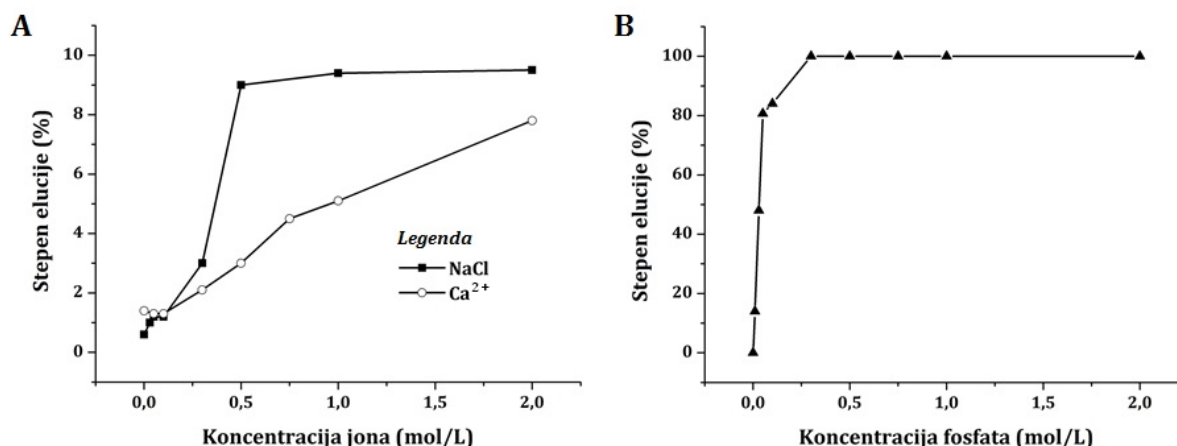
Imobilizacija enzima značajno menja površinsku morfologiju HAP, što je predstavljeno slikama 3.6 B i 3.6 C. Prva bitna razlika između HAP bez enzima i imobilizata je u znatno glađem izgledu površine nosača, posebno kada se na HAP imobilizuje CRL (slika 3.6 B). Dodatno, šupljine uočene između čestica nosača bez enzima na slici 3.6 A, odsutne su u oba preparata imobilizovanih enzima.

Iako su pojedinačni agregati čestica nosača i dalje uočljivi, njihova površina je takođe glađa i pravilnija, a dimenzije pojedinačnih agregata su nekoliko puta manje na slikama 3.6 B i 3.6 C nego na slici 3.6 A. Sve uočene morfološke promene čestica nosača su posledica adsorpcije enzima na njihovu površinu.

Premda je fokus ove doktorske disertacije prvenstveno usmeren na industrijsku primenu enzima imobilizovanih na HAP, ne treba zanemariti ni biomedicinski značaj promena morfoloških karakteristika ovog nosača, uzrokovanih adsorpcijom proteina. Nekoliko značajnih publikacija posvećeno je izučavanju model sistema protein-HAP, na kojima se ispituje efekat adsorbovanih proteina na inženjering koštanog tkiva, ali i degenerativne procese koji leže u osnovi brojnih bolesti koštanog sistema^{179,180,193,212}.

3.2.2 Ispitivanje uslova elucije lipaza iz *Candida rugosa* sa hidroksiapatita

U ovom eksperimentu je ispitan uticaj Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} i PO_4^{3-} na eluciju lipaze iz *Candida rugosa* sa HAP. Rezultati su izraženi kao stepen elucije, izračunat iz razlike količine enzimске aktivnosti vezane za HAP i količine enzimске aktivnosti direktno detektovane u supernatantu nakon tretiranja imobilizata lipaza sa svakim od testiranih reagenasa. Rezultati eksperimenta su sumirani na slici 3.7.

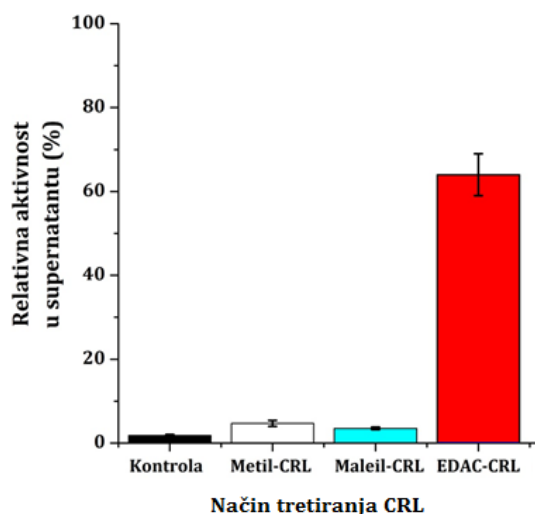


Slika 3.7: Ispitivanje efikasnosti različitih jona u desorpciji lipaze iz *Candida rugosa* sa hidroksiapatita. **A)** Uticaj natrijuma, hlorida i kalcijuma na desorpciju enzima; **B)** Uticaj fosfata na desorpciju enzima.

Sa slike 3.7 A se jasno vidi da Na⁺, Cl⁻ i Ca²⁺ uzrokuju neznatnu desorpciju lipaze sa HAP, jer je stepen elucije ispod 10 %, čak i za koncentracije testiranih jona preko 0,5 mol/L. Na osnovu ovog rezultata se mogu isključiti klasične elektrostatičke interakcije kao način vezivanja enzima za nosač. Sa druge strane, u prisustvu PO₄³⁻ u koncentraciji preko 0,2 mol/L primetna je potpuna desorpcija enzima sa nosača (slika 3.7 B). Opisani trend potvrđuje da su za interakcije dva entiteta ključne karboksilne grupe na enzimu i Ca²⁺ na nosaču. Hloridi bi mogli kompetirati sa karboksilnim grupama lipaze za vezujuća mesta na HAP. Međutim, konstanta disocijacije CaCl₂ je značajno veća nego konstanta disocijacije kompleksa lipaza-COO-Ca-HAP i zato ovi joni ne mogu poremetiti interakcije lipaze iz *Candida rugosa* i HAP^{181,182,184}. Povrh toga, Ca²⁺ u reakcionom sistemu bi čak pospešio vezivanje lipaze za HAP, jer bi nastao soni most između kalcijuma i reagujućih grupa nosača i enzima. Efekat PO₄³⁻ se takođe može obrazložiti preko konstanti disocijacije. Konstanta disocijacije kompleksa lipaza-COO-Ca-HAP je mnogo veća nego konstanta disocijacije soli Ca₃(PO₄)₂¹⁸⁴. Shodno tome, rezultati iz ovog odeljka upućuju na to da je glavni način interagovanja lipaze iz *Candida rugosa* i HAP preko metal-koordinativne veze²⁵.

3.2.3 Identifikacija funkcionalnih grupa uključenih u interakcije lipaza iz *Candida rugosa* i hidroksiapatita

U cilju detaljnije analize interagujućih grupa i potvrde rezultata iz prethodnog odeljka, modifikovane su amino- i karboksilne grupe lipaze. Reduktivnim metilovanjem amino-grupa iz bočnog niza lizina u prisustvu NaBH_4 i form-aldehida se postojeće naelektrisanje maskira u neutralno²¹³. Acetilovanjem istih amino-grupa sa anhidridom maleinske kiseline se menja naelektrisanje modifikovanih grupa iz pozitivnog u negativno²¹⁴. Značaj karboksilnih grupa za vezivanje lipaze na HAP je ispitan na dva načina: imobilizacijom nemodifikovanog enzima u citratnom puferu i njihovim hemijskim blokiranjem sa EDAC-om²¹⁵. Eksperimentalna merenja su urađena u triplikatu, prema protokolima iz odeljka 4.2.3. Dobijeni rezultati su predstavljeni na slici 3.8 kao % enzimске aktivnosti u supernatantu nakon imobilizacije modifikovanih uzoraka u poređenju sa nemodifikovanim kontrolom. Razlika između dva nezavisna merenja nije iznosila više od 5 % i predstavljena je na datom grafiku.



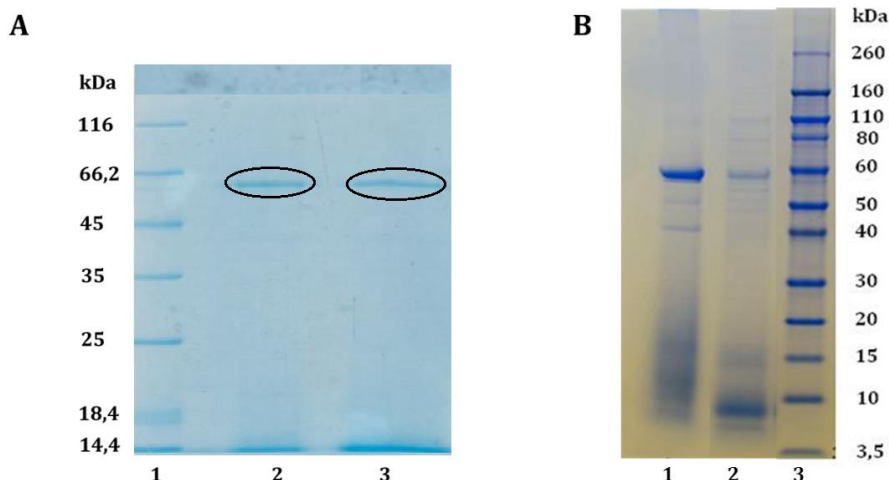
Slika 3.8: Uticaj modifikacija funkcionalnih grupa lipaze iz *Candida rugosa* na vezivanje za hidroksiapatit.

Grafik sa slike 3.8 pokazuje da modifikacije amino-grupa (metil-CRL i maleil-CRL) ne remete vezivanje lipaze na HAP, bez obzira na tip modifikacije (neutralisanje naelektrisanja, ili promena naelektrisanja iz pozitivnog u negativno). Sa druge strane, kada se karboksilne grupe enzima modifikuju EDAC-om, dolazi do dramatičnog porasta

nevezane enzimske aktivnosti u supernatantu nakon imobilizacije EDAC-CRL, budući da se 70 % enzimske aktivnosti detektuje u supernatantu. Identičan efekat je primećen i kada se nemodifikovana lipaza imobilizuje u citratnom puferu (rezultat nije prikazan na slici 3.8). Pri koncentraciji citrata u puferu za imobilizaciju od 0,5 mol/L, u supernatantu nakon imobilizacije registrovano je 90 % aktivnosti lipaze. Ovako visok % nevezane aktivnosti se može objasniti maskiranjem kalcijum mesta na HAP egzogenim karboksilnim grupama primenjenog helatora. Ova dva rezultata predstavljaju definitivnu potvrdu pretpostavke da lipaza i HAP interaguju preko karboksilnih grupa i kalcijuma, gradeći metal-koordinativnu vezu i u skladu su sa rezultatima predstavljenim na slici 3.7.

3.2.4 Ispitivanje specifičnosti hidroksiapatita prema izoformama lipaza iz *Candida rugosa* tehnikom LC-MS/MS

Iz literature je poznato da *Candida rugosa* proizvodi više izoformi vanćelijskih lipaza²¹⁶. Zbog toga je jedno od pitanja koje se nameće i da li je HAP selektivan prema određenoj izoformi ovog enzima tokom imobilizacije. Slika 3.9 predstavlja elektroforetske profile preparata lipaze iz *Candida rugosa* pre i nakon imobilizacije na HAP. Hidroksiapatit u uzorku imobilizovanog enzima je pre elektroforeze hidrolizovan u prisustvu 1 M HCl, nakon čega je uzorak dijalizovan naspram destilovane vode preko noći na +4 °C i nakon toga uobičajeno pripremljen za elektroforezu (odjeljak 4.2.4).



Slika 3.9: Elektroforetsko praćenje imobilizacije lipaze iz *Candida rugosa* na hidroksiapatit.

A) SDS-PAGE na 12 % gelu za razdvajanje. Bunar 1 – markeri molekulskih masa (Pierce™ Unstained Protein MW Marker); Bunar 2 – komercijalni preparat lipaze iz *Candida rugosa* (Sigma, tip VII); Bunar 3 – imobilizat lipaze iz *Candida rugosa* na hidroksiapatitu; **B)** Elektroforetska analiza preparata lipaze iz *Candida rugosa* na gradijentnom gelu za razdvajanje (4-12 % akrilamida). Bunar 1 - komercijalni preparat lipaze iz *Candida rugosa* (Sigma, tip VII); Bunar 2 – imobilizat lipaze iz *Candida rugosa* na hidroksiapatitu; Bunar 3 – markeri molekulskih masa (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard).

Kao što se sa slike 3.9 vidi, elektroforetski profili uzoraka slobodne lipaze i imobilizata na HAP su bili identični i na klasičnom denaturišućem (slika 3.9 A) i na gradijentnom gelu (slika 3.9 B), sa karakterističnom trakom na molekulskoj masi od oko 60 kDa. Prema dostupnim literaturnim podacima, izoforme lipaze iz *Candida rugosa* su međusobno veoma slične po molekulskoj masi, pI vrednostima i stepenu glikozilovanja, zbog čega i nije bilo moguće dobiti odgovor na postavljeno pitanje primenom elektroforetskih metoda^{22,216}.

Rešenje je dobijeno primenom masene spektrometrije ultra-visoke rezolucije (*eng.* Ultra-high resolution). Na slici 3.9 A su označene trake koje su isečene iz gela nakon elektroforeze i zatim pripremljene za analizu masenom spektrometrijom, kao što je opisano u odeljku 4.2.4. Relativna zastupljenost pojedinačnih izoformi u navedenim uzorcima je izražena preko eksponencijalno modifikovanog indeksa zastupljenosti proteina

(eng. *exponentially modified protein abundance index – emPAI*)²¹⁷. Rezultati ovog eksperimenta su sumirani u tabeli 3.3.

Tabela 3.3: Poređenje profila izoformi lipaza u komercijalnom i imobilizovanom preparatu CRL, primenom LC-MS/MS metode.

Uzorak	Identifikacioni broj proteina u UniProt bazi	Oznaka izoforme lipaze	Molekulska masa (Da)	% Preklapanja sekvence	emPAI
Komercijalni preparat	P20261	LIP1	58 798	71	67,95
	P32947	LIP2	59 002	73	35,84
	P32946	LIP3	59 169	45	3,89
Imobilizovani preparat	P20261	LIP1	58 798	66	46,72
	P32947	LIP2	59 002	65	23,01
	P32946	LIP3	59 169	39	2,19

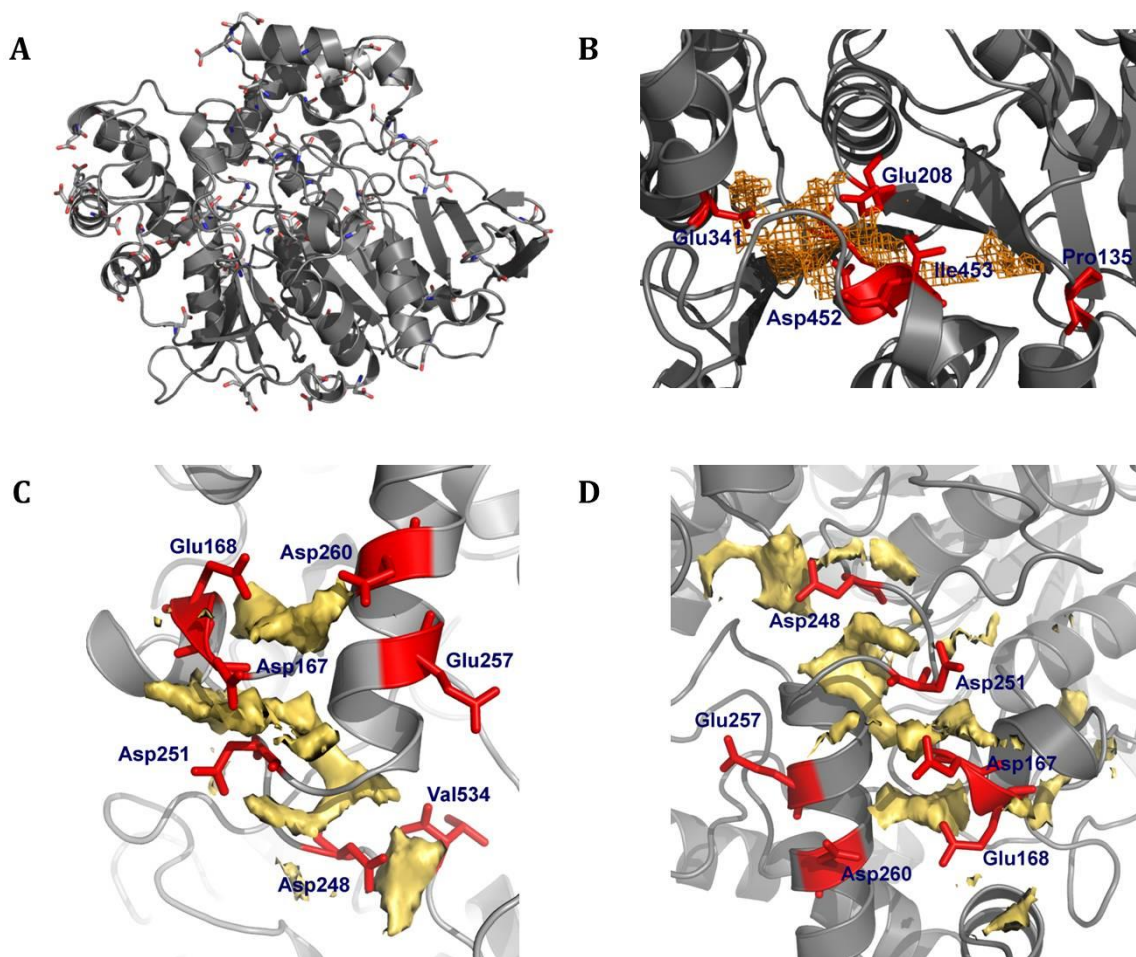
emPAI vrednosti nam pokazuju da je okviran odnos izoformi u komercijalnom preparatu (LIP1:LIP2:LIP3=18:9:1) a u imobilizovanom preparatu (LIP1:LIP2:LIP3=21:10:1). Najvažniji zaključak koji proizilazi iz tabele 3.2 je da HAP ne pokazuje selektivnost prilikom imobilizacije, budući da oba preparata sadrže gotovo identičan profil izoformi lipaza iz korišćenog komercijalnog preparata *Candida rugosa*. Štaviše, ukoliko se uporede emPAI vrednosti, opaža se sličan trend: LIP1 je dominantna u oba uzorka, a zatim po zastupljenosti slede LIP2 koje ima duplo manje nego LIP1, i LIP3 koje ima oko 10 puta manje nego LIP2. Dobijeni rezultati, prema tome, upućuju na to da se vezivanje za HAP odvija preko sekvence koja je identična za sve tri identifikovane izoforme lipaze iz korišćenog komercijalnog preparata.

3.2.5 Identifikacija hidroksiapatit-vezujuće sekvence na izoformi 1 lipaze iz *Candida rugosa* molekulskim modelovanjem

Molekulsko modelovanje predstavlja savremeni naučni pristup u izračunavanju, manipulisanju i predviđanju strukture, funkcije i interakcije biomakromolekula, pre svega proteina, sa drugim biomakromolekulima ili malim molekulima ²¹⁸. Primenom ove metode

je bliže ispitan način vezivanja lipaze iz *Candida rugosa* na HAP, radi identifikacije sekvence enzima koja je ključna za interakcije sa nosačem.

Kao model sistem u ovom eksperimentu je korišćena izoforma 1 lipaze iz *Candida rugosa* (LIP1), jer je to dominantna izoforma ovog enzima u komercijalnom preparatu koji je korišćen tokom izrade ove doktorske disertacije (Sigma, tip VII) i strukturno je detaljno okarakterisana. Ispitan je i efekat konformacionih promena do kojih dolazi prilikom međupovršinske aktivacije enzima usled pomerenja petlje Lb_{3,2}, zbog čega su studijom obuhvaćene strukture otvorene (oznaka 1 CRL u Protein Data Bank) i zatvorene konformacije (oznaka 1 TRH u PDB) izoforme 1^{219,220}. Korišćene 3D strukture su rešene metodom rasejanja X-zraka u rezoluciji od 2,1 Å (0,21 nm). Rezultati molekuskog modelovanja su sumirani na slici 3.10.



Slika 3.10: Rezultati molekuskog modelovanja interakcija izoforme 1 lipaze iz *Candida rugosa* i hidroksiapatita. **A)** Raspored bočnih ostataka asparaginske kiseline i glutaminske kiseline u modelu trodimenzionalne strukture izoforme 1 lipaze iz *Candida rugosa*; **B)** Deo molekula lipaze koji najpovoljnije interaguje sa kalcijum - probom; **C)** Razlike u jačini interakcija otvorene konformacije izoforme 1 lipaze iz *Candida rugosa* sa kalcijum - probom; **D)** Razlike u jačini interakcija zatvorene konformacije izoforme 1 lipaze iz *Candida rugosa* sa kalcijum - probom.

Budući da je u prethodnom odeljku pokazano kako su karboksilne grupe ključne za interakcije lipaze iz *Candida rugosa* i HAP (slike 3.7 i 3.8), prvo je identifikovan broj i poziciju Asp i Glu ostataka u ovom enzimu. Zahvaljujući UniProtKB bazi podataka je utvrđeno da polipeptidni lanac izoforme 1 sadrži ukupno 52 kisela aminokiselinska ostatka, 34 Asp i 18 Glu²²¹. Kao što je i očekivano, većina ovih ostataka je pozicionirana na površini proteina, što se i vidi na slici 3.10 A. Kako bi se stekla šira slika, proračunima je

obuhvaćena celokupna struktura proteina. Pri tome je pretpostavljeno da su bočni lanci enzima fleksibilni, jer je to bliže stvarnom ponašanju proteina u rastvoru, za razliku od statičnih kristalnih struktura dobijenih rasejanjem X-zraka.

Kako je kalcijum iz HAP uključen u interakcije sa karboksilnim grupama lipaze, proračuni su se bazirali na interakcijama kalcijum probe (Ca^{2+}) sa različitim delovima strukture lipaze, što je ispitano u GRID programu²²²⁻²²⁴. Rezultati ovih proračuna, polja interakcija molekula (*eng. molecular interaction fields – MIF*) identifikuju regione proteina koji su ostvarili najpovoljnije, samim tim i najverovatnije, interakcije sa Ca^{2+} probom. Prilikom pretrage 3D strukture proteina, više pažnje je posvećeno onim delovima molekula gde su funkcionalne grupe smeštene na većoj površini, zato što Ca^{2+} u HAP nisu pojedinačni joni, već su deo veće i složenije površine nosača. Najpovoljnije interakcije su uočene između Ca^{2+} probe i šupljine lipaze, koju čine: Pro 135, Glu 208, Gln 240, Glu 341, Asp 452 i Ile 453. Ovaj pojas aminokiselina, koji ostvaruje energetske najpovoljnije interakcije sa Ca^{2+} probom, važi i za otvorenu i za zatvorenu konformaciju enzima. Međutim, sa slike 3.10 B se uočava da je pomenuti pojas aminokiselina veoma blizu katalitičke trijade enzima. U ovom regionu pomenuti aminokiselinski ostaci nisu dovoljno izloženi rastvaraču, stoga ni ne mogu značajno doprineti vezivanju CRL na HAP. Pored toga, vezivanje enzima preko ovog regiona bi se manifestovao inaktivacijom enzima, jer pomenuti ostaci igraju važnu ulogu u pozicioniranju supstrata tokom katalitičkog ciklusa i stabilizaciji prelaznih stanja, kao što je opisano u Teorijskom delu.

Sledeći region enzima, koji je pokazao visok afinitet prema Ca^{2+} probi se nalazi na površini proteina i definisan je sledećim ostacima: Asp 167, Glu 168, Asp 248, Asp 251, Glu 257, Asp 260 i C-terminalnom $-\text{COOH}$ grupom Val 534. U poređenju sa regionom proteina prikazanim na slici 3.10 B, koji sadrži više neutralnih aminokiselinskih ostataka, pojas na površini lipaze je znatno bogatiji aminokiselinama sa kiselim bočnim ostacima, što objašnjava njegov visok afinitet prema Ca^{2+} probi. Važno je naglasiti da je isti površinski region uključen u vezivanje i kod otvorene i zatvorene konformacije CRL na HAP (slike 3.10 C i D, redom).

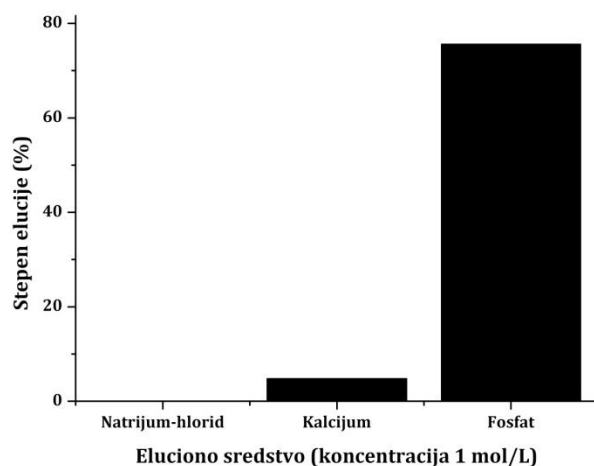
Ukoliko se uporede energije interakcija Ca^{2+} probe sa HAP-vezujućom sekvencom lipaze u otvorenoj (-50 kcal/mol) i zatvorenoj konformaciji enzima (-65 kcal/mol), primećuje se da isti region jače interaguje sa nosačem kada je enzim u zatvorenoj formi. To je najverovatnije posledica razlike u orijentaciji bočnih ostataka u ovom regionu. Takođe je uočeno da prilikom konformacionih promena koje vode aktivaciji enzima, a uzrokovane su pomeranjem petlje koja čini poklopac, dolazi i do promene orijentacije C-terminalnog Val 534. Kada je lipaza u otvorenoj konformaciji, Val 534 je blizu ostalih u površinskoj HAP-vezujućoj sekvenci (slika 3.10 C), ali je dosta udaljen od njih u zatvorenoj konformaciji enzima (slika 3.10 D), što bi takođe moglo objasniti primećenu razliku u energijama interakcija sa Ca^{2+} probom usled uklanjanja eventualnih sternih smetnji. Uočena blaga preferencija HAP prema zatvorenoj formi CRL bi, prema tome, mogla objasniti zašto je maksimalni prinos aktivnosti imobilizata lipaze na HAP oko 50 % (slika 3.1 C). Budući da u ovom slučaju lipaza nije „fiksirana“ u otvorenoj konformaciji, kao što je slučaj prilikom imobilizacije na hidrofobnim nosačima, moguća je njena finija regulacija primenom spoljašnjih međupovršinskih supstanci.

Zbog nedostatka 3D struktura otvorene i zatvorene konformacije izoforme 2 CRL (LIP2) i nerasvetljene 3D strukture izoforme 3 (LIP3) iste proračune nismo mogli ponoviti i na ovim modelima. Međutim, u skladu sa rezultatima iz tabele 3.2 o selektivnosti HAP prema različitim enzimskim izoformama tokom imobilizacije, može se pretpostaviti da je ista površinska HAP-vezujuća sekvencija prisutna i u navedenim izoformama. Ova pretpostavka je i konačno potvrđena na osnovu podataka iz primarne sekvence proteina. Kod LIP3, koja sa LIP1 deli 80 % homologije sekvence, na pozicijama 167, 248, 251, 257 i 260 su identični AK ostaci kao kod LIP1 koja je bila predmet naših proračuna²²⁵. Analogno tome, u LIP2 pomenuti ostaci su za jednu AK pomereni ka N-terminusu^{226,227}.

3.2.6 Ispitivanje uslova elucije laktaze iz *Aspergillus oryzae* sa hidroksiapatita

U ovom eksperimentu je ispitan uticaj Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} i PO_4^{3-} na eluciju laktaze sa HAP. Za razliku od eksperimenta sa lipazom, iz odeljka 4.2.2, imobilizat laktaze je tretiran rastvorima svakog od testiranih jona samo u koncentraciji 1 mol/L, kao što je opisano u odeljku 4.2.6. Rezultati su izraženi kao stepen elucije, praćen preko količine enzimske

aktivnosti, registrovane u rastvorima nakon tretiranja imobilizata laktaze testiranim reagensima i prikazani su na slici 3.11.



Slika 3.11: Ispitivanje elucije laktaze iz *Aspergillus oryzae* sa hidroksiapatita u prisustvu različitih jona.

Slika 3.11 jasno pokazuje da samo PO_4^{3-} u primenjenoj koncentraciji izaziva desorpciju AOL sa HAP. Kada se imobilizat laktaze na HAP inkubira sa fosfatom u koncentraciji 1 mol/L, nakon tretmana u supernatantu se registruje 100 % od prethodno vezane količine enzimске aktivnosti. Ovakvo ponašanje je istovetno kao i u slučaju CRL, pa je prema tome logično zaključiti da i AOL na isti način interaguje sa HAP, posebno kada se u obzir uzme i činjenica da je to kiseli protein, sa pI vrednošću 5,3^{184,228}.

3.2.7 Identifikacija hidroksiapatit-vezujuće sekvence na laktazi iz *Aspergillus oryzae*

Prema literaturno dostupnim podacima o rešenoj trodimenzionalnoj strukturi i uvidom u primarnu sekvencu AOL, ovaj enzim sadrži ukupno 108 kiselih aminokiselinskih ostataka, preko kojih bi mogao interagovati sa HAP. Svi ovi aminokiselinski ostaci su obeleženi u primarnoj sekvenci laktaze na slici 3.12.

10	20	30	40	50
MRLLSVAAVA	LLAAQAAGAS	IKHRLNGFTI	LEHPDPAKRD	LLQDIVTWDD
60	70	80	90	100
KSLFINGERI	MLFSGEVHPF	RLPVPSLWLD	IFHKIRALGF	NCVSFYIDWA
110	120	130	140	150
LLEGKPGDYR	AEGIFALEPF	FDAAKEAGIY	LIARPGSYIN	AEVSGGCFPG
160	170	180	190	200
WLQRVNGTLR	SSDEPFLKAT	DNYIANAAAA	VAKAQITNGG	PVILYQPENE
210	220	230	240	250
YSGCCGVKY	PDADYMQYVM	DQARKAIVV	PFISNDASPS	GHNAPGSGTG
260	270	280	290	300
AVDIYGHISY	PLGFDCAMPS	VWPEGKLPDN	FRTLHLQSP	STPYSLLEFQ
310	320	330	340	350
AGAFDPWGGP	GFERCYALVN	HEFSRVFYRN	DLSFCVSTFN	LYMTFGGTNW
360	370	380	390	400
GMLGHPGGYT	SYDYGSPITE	TRNVTRIKYS	IKLLANFVK	ASPSYLTATP
410	420	430	440	450
RMLTTGVYTI	TSILAVIPLI	GSPGSFFVW	RHTDYSSQES	TSYKIKLPTS
460	470	480	490	500
AGNLTIPTLE	GTLSLNGRDS	KIHVVDYNVS	GTNIIYSTAE	VFTWRKFDGN
510	520	530	540	550
KVLVLYGGPK	EHHELAIASK	SNVTIIEGSD	SGIVSTIKGS	SVIIGWDVSS
560	570	580	590	600
TRRIVQVGD	RVFLDRNSA	YNYWVPELPT	GTSPGFSTS	KITASSIIVK
610	620	630	640	650
ACYLLRGAHL	GALHLTA	FNATTPIVI	GAPTCARNLF	VNGEKASHTV
660	670	680	690	700
DRNGIWSSEV	KYAAPEIKLP	GLRLWKYL	DTLPIKSSY	DDSAWVSADL
710	720	730	740	750
PKTKNTHRPL	TPTSLYSS	YGFHTCYLIY	RGHFVANCKE	SEFFIRTQGC
760	770	780	790	800
SAFGSSVWLN	ETYLGSWTGA	DYAMDCNSTY	KLSQLESCKN	YVITVWIDNL
810	820	830	840	850
GLDENWTVGE	ETMKNPRGIL	SYKLSGQDAS	AITWKLTCNL	CGEDYQDKVR
860	870	880	890	900
GPLNEGGLYA	ERQCFHQPP	PSEWISGSP	LEGLSKPGIG	FYTAQFDL

Slika 3.12: Klasteri karboksilnih grupa laktaze, koji bi mogli interagovati sa hidroksiapatitom (UniProt pristupni broj: B7VU80). Žuto - signalna sekvencija (AK 1- 18); Zeleno - klaster 1 (AK 198 – 258); Tirkizno - klaster 2 (AK 287 – 331); Ružičasto - klaster 3 (AK 377-422); Crveno – klaster 4 (AK 581 – 628); Tamnoplavo – klaster 5 (AK 674-720); Sivo – klaster 6 (AK 861 – 899).

Aminokiselinski ostaci Tyr 96, Asn 140, Ala 141, Glu 142, Asn 199, Asp 258, Tyr 260, Phe 264, Glu 298, Phe 304, Tyr 342, Tyr 364 i Try 806 učestvuju u vezivanju supstrata, dok se Glu 200 i Glu 298 nalaze u aktivnom mestu laktaze⁸³.

Prema slici 2.10 iz Opšteg dela, katalitički domen laktaze obuhvata aminokiselinske ostatke na pozicijama 40-397. Prema tome, klaster 1, klaster 2 i klaster 3 se mogu isključiti iz daljeg razmatranja, jer ulaze u sastav katalitičkog domena laktaze⁸³. Naime, na primerima lipaze iz ove doktorske disertacije (slika 3.10), fibronektina iz vančelijskog matriksa²¹² i staterina iz pljuvačke¹⁷⁹, dokazano je da HAP-vezujući motiv ovih proteina nije blizu aminokiselina koje su ključne za njihovu biološku aktivnost.

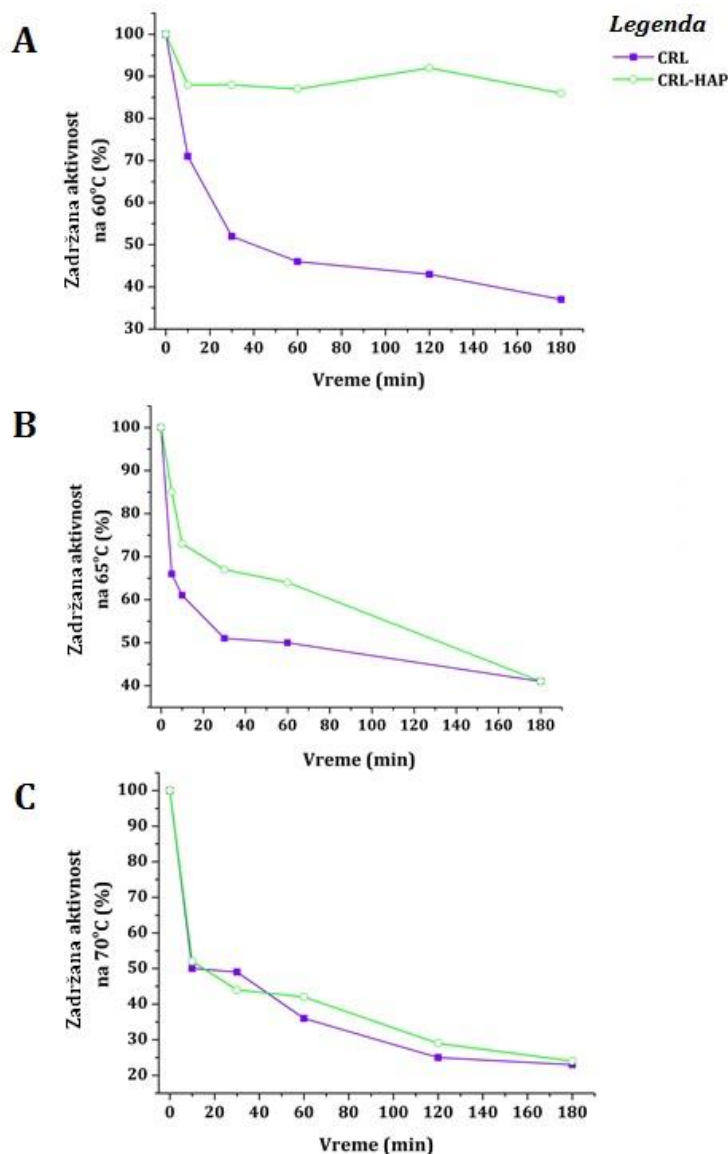
Prema podacima iz literature, metal-koordinativna veza je najjača kada u kompleksiranju kalcijuma na HAP učestvuju blisko grupisane karboksilne grupe proteina^{181,182,184}. Najveći udeo aminokiselina na površini laktaze se nalazi u klasteru 4 (deo sekvence 581 – 628) i klasteru 6 (deo sekvence 861 – 899)²²⁹ tako da je najverovatnije da su upravo ovi delovi sekvence laktaze uključeni u interakcije sa HAP.

3.3 Efekat imobilizacije na stabilnost enzima imobilizovanih na hidroksiapatitu

Industrijska primena imobilizovanih enzima najčešće iziskuje rad u uslovima koji su daleko od optimalnih za dati enzim, što je detaljno objašnjeno u Opštem delu. Prema tome, cilj eksperimenata iz ovog odeljka je bio da se ispita uticaj imobilizacije na stabilnost imobilizovanih enzima na visokim temperaturama, u prisustvu organskih rastvarača i prilikom višestruke upotrebe.

3.3.1 Ispitivanje temperaturne stabilnosti lipaza iz *Candida rugosa* imobilizovanih na hidroksiapatitu

Temperaturna stabilnost preparata slobodne CRL i CRL-HAP je ispitana u opsegu 60 – 70 °C tokom tročasovne inkubacije prema uslovima iz odeljka 4.3.1. Rezultati su predstavljeni kao zavisnost zadržane aktivnosti testiranih uzoraka od vremena inkubiranja na 60, 65 i 70 °C i sumirani su na slici 3.13.



Slika 3.13: Poređenje temperaturne stabilnosti slobodne lipaze iz *Candida rugosa* i imobilizata lipaze na hidroksiapatitu. **A)** 60 °C; **B)** 65°C; **C)** 70 °C.

Sa slike 3.13 je evidentno da najdrastičnija razlika u stabilnosti između slobodne CRL i CRL-HAP postoji na 60 °C (slika 3.13 A). Na ovoj temperaturi nakon tročasovnog inkubiranja CRL-HAP zadržava gotovo nepromenjenu aktivnost (u odnosu na enzimsku aktivnost u početku inkubiranja koja je uzeta kao referentna vrednost od 100 %), dok slobodna CRL gubi 50 % prvobitne aktivnosti nakon samo 30 minuta. Primećeni rezultat se može lako objasniti činjenicom da su imobilizovani enzimi, zbog fizičkog ograničavanja u određenom definisanom prostoru krući, a samim tim i slabije podložni denaturaciji.

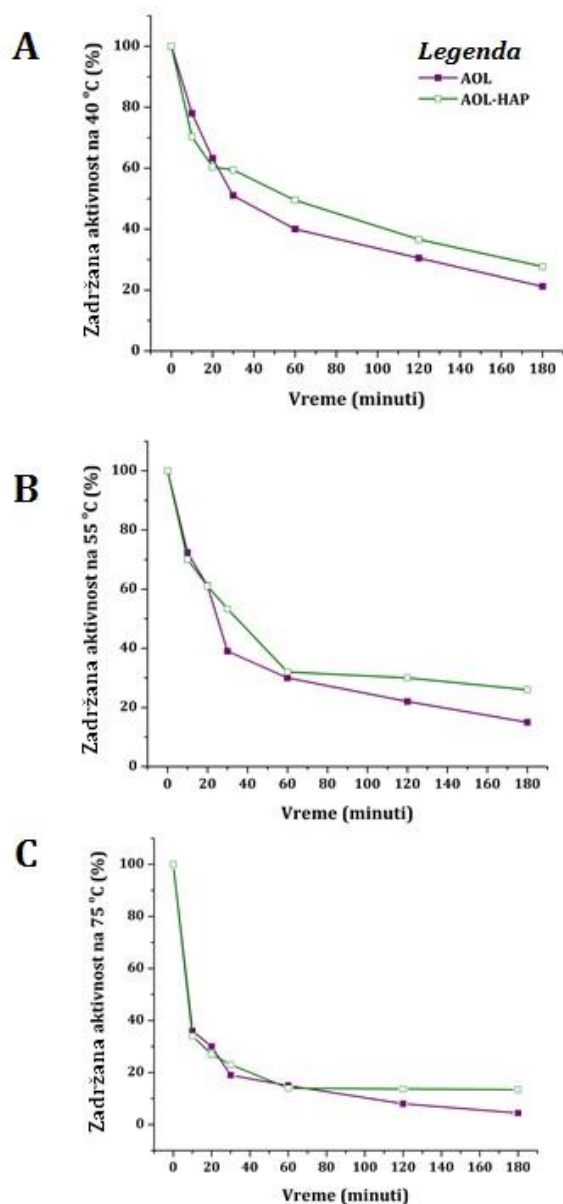
Prilikom imobilizacije na HAP, osim dominantne metal-koordinatne veze sa nosačem, molekuli lipaze adsorbovani na površini, međusobno ostvaruju i bočne vodonične veze, što je opisano u Teorijskom delu. Ove dodatne međumolekulske vodonične veze doprinose povećanju rigidnosti strukture enzima i sprečavaju njegove konformacione promene na višim temperaturama. Ovaj rezultat je od velikog primenjenog značaja, jer je poznato da se radom na povišenim temperaturama predupređuje mikrobnom kontaminacijom, a istovremeno se enzimске reakcije ubrzavaju, što predstavlja dvostruku korist za dalju potencijalnu primenu¹⁹⁸.

Na 65 °C još uvek je imobilizat lipaze značajno stabilniji u poređenju sa slobodnim enzimom: CRL-HAP i nakon 180 minuta inkubiranja na 65 °C zadržava 50 % svoje prvobitne aktivnosti, dok slobodnoj CRL aktivnost opadne na 50 % nakon samo 30 minuta inkubiranja na istoj temperaturi (slika 3.13 B). Konačno, na 70 °C usled denaturacije enzima, oba testirana uzorka pokazuju identičan profil temperaturne inaktivacije u kome nakon 10 minuta izgube 50 % od prvobitne aktivnosti (slika 3.13 C).

Pored kinetike temperaturne inaktivacije enzima, predstavljene na slici 3.13, važno je proučiti i po kom modelu se ona odvija kako bi se predupredila ireverzibilna inaktivacija enzima na visokim temperaturama. Temperaturna inaktivacija većine enzima prati kinetiku prvog reda, gde je brzina inaktivacije enzima proporcionalna vremenu na semilogaritamskoj skali. Drugi, složeniji mehanizam, obuhvata dvofaznu ireverzibilnu inaktivaciju enzima i podrazumeva da na povišenim temperaturama enzim prvo prolazi kroz fazu reverzibilnog gubitka aktivnosti, nakon čega sledi potpuna ireverzibilna inaktivacija⁴. Međutim, kinetika temperaturne inaktivacije CRL se nije mogla uklopiti ni u jedan od pomenutih modela, ni u slučaju slobodne niti imobilizovane lipaze, što ukazuje na veoma složen mehanizam po kome se dešava temperaturna inaktivacija ovog enzima.

3.3.2 Ispitivanje temperaturne stabilnosti laktaze iz *Aspergillus oryzae* imobilizovane na hidroksiapatit

Temperaturna stabilnost slobodne AOL i AOL-HAP je testirana i upoređena na tri temperature: 40, 55 i 75 °C. Rezultati su prikazani na slici 3.14.



Slika 3.14: Poređenje temperaturne stabilnosti laktaze iz *Aspergillus oryzae* pre i nakon imobilizacije na hidroksiapatit. **A)** 40 °C; **B)** 55 °C; **C)** 75 °C.

Na 40 °C (slika 3.14 A) nakon 180 minuta oba preparata laktaze zadržavaju sličnu količinu enzimske aktivnosti u poređenju sa vrednošću na početku inkubiranja (koja je uzeta kao 100 %). Kako temperatura inkubiranja raste, primetno je da je AOL-HAP blago stabilniji u odnosu na slobodnu AOL: na 55 °C nakon 180 minuta inkubiranja slobodan enzim zadržava samo 15 % od prvobitne aktivnosti, dok imobilizovani enzim zadržava 30 % (slika 3.14 B). Na 75 °C stabilizacioni efekat imobilizacije je još izraženiji, budući da

slobodan enzim nakon 180 minuta na ovoj temperaturi zadržava samo neznatnu enzimsku aktivnost (oko 2 % u odnosu na početnu), dok AOL-HAP zadržava 15 % od svoje prvobitne aktivnosti u istim uslovima (slika 3.14 C).

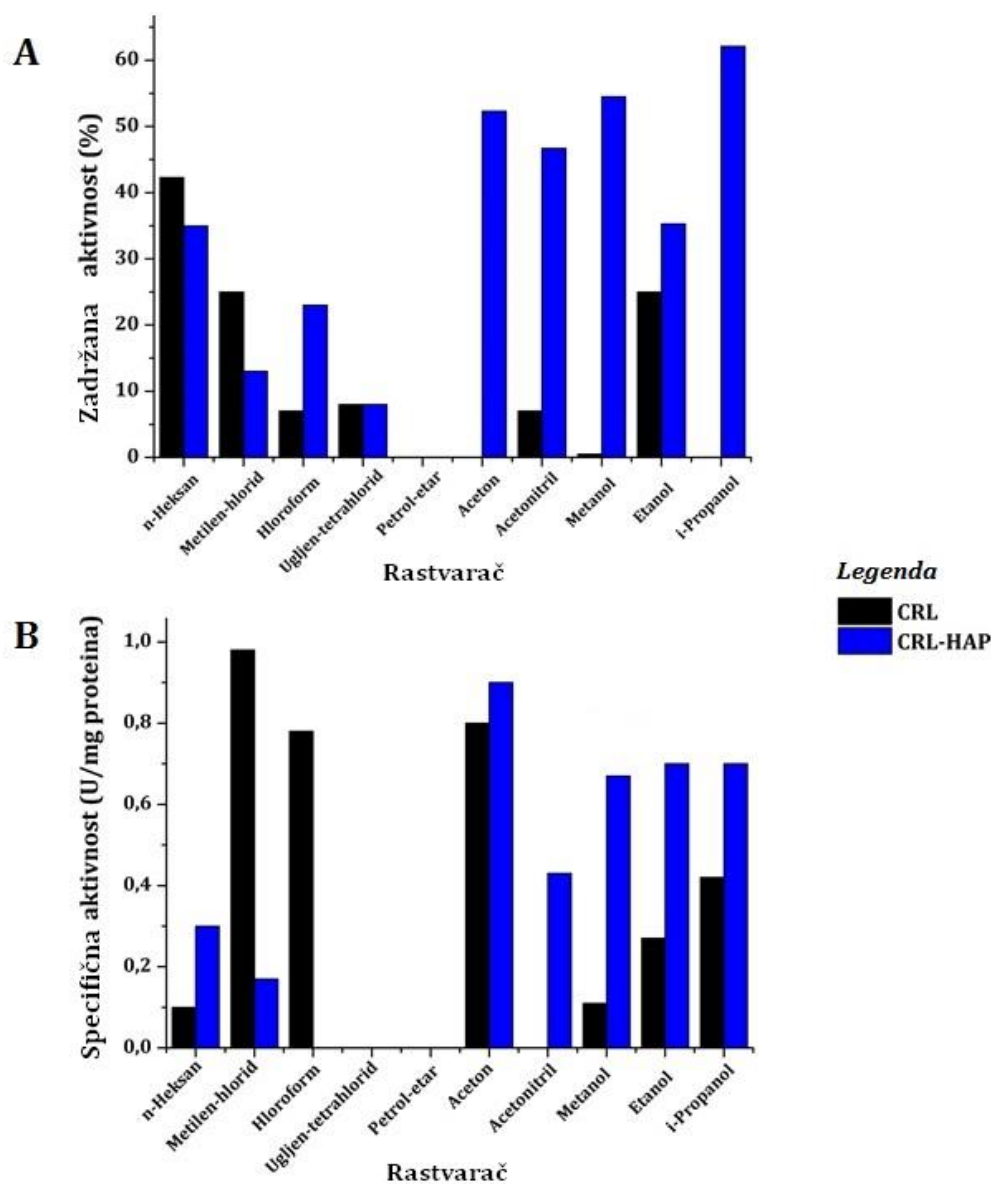
Literaturni podaci o temperaturnoj stabilnosti imobilizovane laktaze su različiti. Na 55 °C laktaza kovalentno imobilizovana na hitozanu²³⁰ i laktaza adsorbovana na mlevene kosti iz pilećih šija²⁰⁹ zadržavaju 65 i 70 % početne aktivnosti, redom. Laktaza adsorbovana na ZnO zadržava 40 % aktivnosti na istoj temperaturi²⁰⁷, slično rezultatima dobijenim za AOL-HAP (slika 3.14 B). Sa druge strane, laktaza adsorbovana na celitu ne pokazuje vidljivu hidrolitičku aktivnost nakon tročasovne inkubacije na temperaturama višim od 65 °C²³¹, dok u našem slučaju imobilizovana laktaza pokazuje aktivnost i na 75 °C (slika 3.14 C).

Na osnovu rezultata, predstavljenih na slici 3.14, se može zaključiti da je HAP pogodan nosač za imobilizaciju AOL, jer obezbeđuje veću temperaturnu stabilnost enzima u dužem vremenskom periodu inkubiranja na povišenoj temperaturi, što i jeste jedan od zahteva za uspešnu primenu biokatalizatora u industrijskim biotransformacijama.

3.3.3 Uticaj organskih rastvarača na stabilnost i aktivnost lipaza iz *Candida rugosa* imobilizovanih na hidroksiapatitu

Svrha ove grupe eksperimenata je bila da se ispita uticaj OR različite polarnosti na stabilnost i aktivnost preparata CRL. Tokom ispitivanja stabilnosti, enzimski preparati su inkubirani ukupno 180 minuta sa OR različite polarnosti i hemijske prirode (alkani, alkil-halogenidi, etri, ketoni, nitrili i alkoholi). Konačna koncentracija rastvarača u reakcionoj smeši je 95 % (v/v) (odjeljak 4.3.2), a njihove log P vrednosti su redom: aceton -0,042; acetonitril -0,334; metanol -0,760; etanol -0,320; *i*-propanol 0,05; *n*-heksan 3,5; metilen hlorid 1,25; hloroform 1,97; ugljentetrahlorid 2,83; petrol etar 3,5-3,8¹⁹⁸. Odabrana koncentracija je veoma važna, jer je vrlo mali broj studija stabilnosti enzima izveden pri ovako visokoj koncentraciji OR, jer OR pri koncentracijama višim od 50 % (v/v) obično izazivaju kompletnu inaktivaciju enzima^{4,19}. Rezultati ovog eksperimenta su prikazani kao relativna aktivnost, koju slobodna i imobilizovana lipaza zadrže u testiranim rastvaračima nakon 180 min inkubiranja, u odnosu na aktivnost u početku inkubiranja (uzeta je kao 100

%). Aktivnost preparata lipaze u OR je izražena kao specifična aktivnost (U/mg proteina). Rezultati su prikazani na slici 3.15.



Slika 3.15: Uticaj organskih rastvarača različite polarnosti na stabilnost i aktivnost slobodne lipaze iz *Candida rugosa* i imobilizata lipaze iz *Candida rugosa* na hidroksiapatitu. **A)** Stabilnost enzimskih preparata u organskim rastvaračima nakon 180 minuta inkubiranja; **B)** Aktivnost enzimskih preparata u organskim rastvaračima.

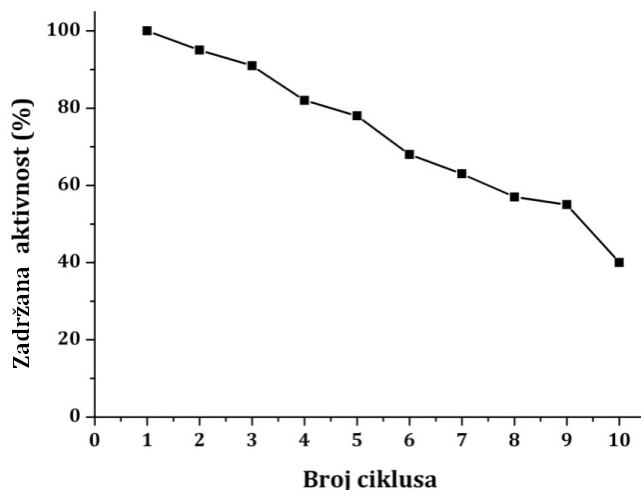
Sa slike 3.15 A zapaža se da je generalno imobilizovana lipaza znatno stabilnija u poređenju sa slobodnom, za sve testirane OR, bez obzira na njihovu polarnost, što je vrlo

značajno, jer ukazuje na to da je imobilizacijom postignuta značajna stabilizacija ovog važnog industrijskog biokatalizatora. Među polarnim OR, najupečatljiviji rezultat je uočen za metanol i u pogledu stabilnosti i aktivnosti. Nakon 180 minuta inkubiranja slobodna CRL se potpuno inaktivira, dok CRL-HAP u istom rastvaraču nakon 180 minuta zdržava 50 % aktivnosti. Slično tome, sa grafika 3.15 B se vidi da je imobilizat CRL na HAP znatno aktivniji u metanolu nego slobodan enzim. Ovaj rezultat je od ključnog značaja, jer literaturno dostupni podaci ukazuju da najpogubniji efekat na aktivnost enzima imaju OR sa $\log P < 2$ ^{232,233}. Prema tome, očekivalo bi se da metanol kao polaran rastvarač snažno inaktivira lipazu. Razlog za ovakav rezultat se može potražiti u hidrofilnosti primenjenog nosača: HAP je neorganski hidrofilni nosač i kao takav održava integritet hidratacione ljuske, esencijalne za očuvanje aktivnosti lipaze u OR.

Među nepolarnim OR, najveću stabilnost imobilizovana lipaza pokazuje u *n*-heksanu (35 %) i hloroformu (25 %) (slika 3.15 A). Međutim, kada se uporedi efekat ova dva rastvarača na aktivnost CRL-HAP, evidentno je da je imobilizovani preparat lipaze aktivan u *n*-heksanu, ali ne i u hloroformu (slika 3.15 B). Na osnovu svega navedenog, metanol je odabran za dalji rad među polarnim OR, dok je među nepolarnim OR izabran *n*-heksan. Heksan je posebno bitan jer iako je slobodna CRL stabilnija nego CRL-HAP u ovom rastvaraču, aktivnost imobilizovanog preparata u njemu je 3 puta veća.

3.3.4 Stabilnost lipaza iz *Candida rugosa* imobilizovanih na hidroksiapatitu tokom kontinuirane hidrolize *p*-nitrofenil-palmitata

Prednost imobilizovanih enzima, pored veće stabilnosti u različitim nekonvencionalnim reakcionim uslovima, leži i u mogućnosti njihove višestruke upotrebe. Ovo je posebno značajno zbog budućeg dizajna i efikasnosti bioreaktora u kome će se enzim koristiti. Mogućnost višestruke upotrebe CRL-HAP je ispitana u reakciji hidrolize *p*-nitrofenil-palmitata (*p*NPP). *p*-Nitrofenil-palmitat je obojeni supstrat, tako da je ovo bio brzi skrining-test za određivanje operativne stabilnosti imobilizata. Eksperimentalni uslovi su opisani u odeljku 4.3.4, a rezultati su prikazani na slici 3.16.



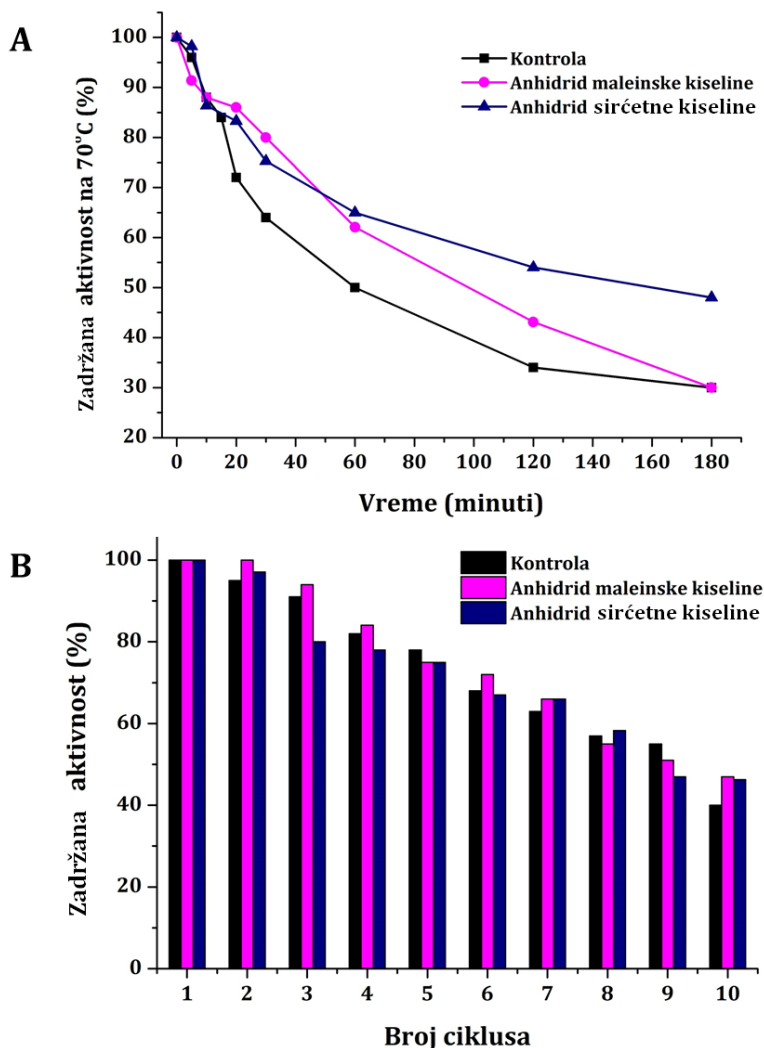
Slika 3.16: Mogućnost višestruke upotrebe lipaze iz *Candida rugosa* imobilizovane na hidroksiapatitu u hidrolizi *p*-nitrofenil palmitata.

Iz gornjeg grafika se vidi da CRL-HAP pokazuje veoma dobre rezultate u pogledu mogućnosti višestruke upotrebe, jer tek nakon 9 uzastopnih reakcionih ciklusa zaostala aktivnost pada ispod 50 %. Dobijeni rezultati pokazuju da ista šarža imobilizata može da se koristi u skoro dva puta više reakcionih ciklusa u poređenju sa imobilizovanim preparatom istog enzima na štapičastom mezoporoznom silika-gelu (5 ciklusa)²³⁴. Iako se silika-gel često koristi u imobilizaciji enzima u raznim oblicima, bolje performanse imobilizata CRL na HAP se u ovom slučaju mogu pripisati razlikama u hemijskim karakteristikama nosača. Nosači na bazi silika-gela, ukoliko nisu dodatno funkcionalizovani, imaju samo silanolne grupe dostupne za interakciju sa drugim molekulima²³⁵. U slučaju CRL, interakcije koje se ostvaruju sa ovakvim nosačima su bazirane na elektrostatičkim interakcijama i vodoničnim vezama, koje su znatno slabije u poređenju sa metal-koordinativnom vezom, koja se ostvaruje između CRL i HAP^{236,237}.

3.3.5 Uticaj acetilovanja na stabilnost lipaza iz *Candida rugosa* imobilizovanih na hidroksiapatitu

Budući da smo u prethodnim odeljcima potvrdili mehanizam vezivanja CRL za HAP po mehanizmu metal-koordinativne veze, cilj ovog eksperimenta je bio da se proba dodatno poboljšati stabilnost CRL-HAP povećanjem količine karboksilnih grupa na enzimu. U literaturi su dostupni dokazi da anhidridi različitih kiselina doprinose stabilizaciji enzima.

Modifikacijom papaina, cistein-proteaze iz lateksa papaje, sa anhidridom maleinske kiseline, značajno je povećana temperaturna stabilnost ovog enzima na temperaturama preko 60 °C²³⁸. Sličan stabilizacioni efekat je naveden i nakon modifikacije α -amilaza iz *Bacillus amyloliquefaciens* i *Bacillus licheniformis* sa anhidridom citrakonske kiseline²³⁹. U našem slučaju su za modifikaciju lipaze korišćeni anhidridi sirćetne i maleinske kiseline, reagensi koji se najčešće koriste za acetilovanje proteina¹²⁵. Uzorci modifikovanog enzima su imobilizovani na HAP i zatim su upoređene temperaturne stabilnosti i mogućnost višestruke upotrebe modifikovanih uzoraka sa nemodifikovanom kontrolom. Temperaturna stabilnost je upoređena samo na 70 °C, jer su tu profili temperaturne inaktivacije slobodne i imobilizovane lipaze bili veoma slični (slika 3.15), dok je mogućnost višestruke primene ponovo ispitana na primeru hidrolize pNPP. Eksperimentalni postupak je detaljno opisan u odeljku 4.3.5, a rezultati ovog eksperimenta su sumirani na slici 3.17.

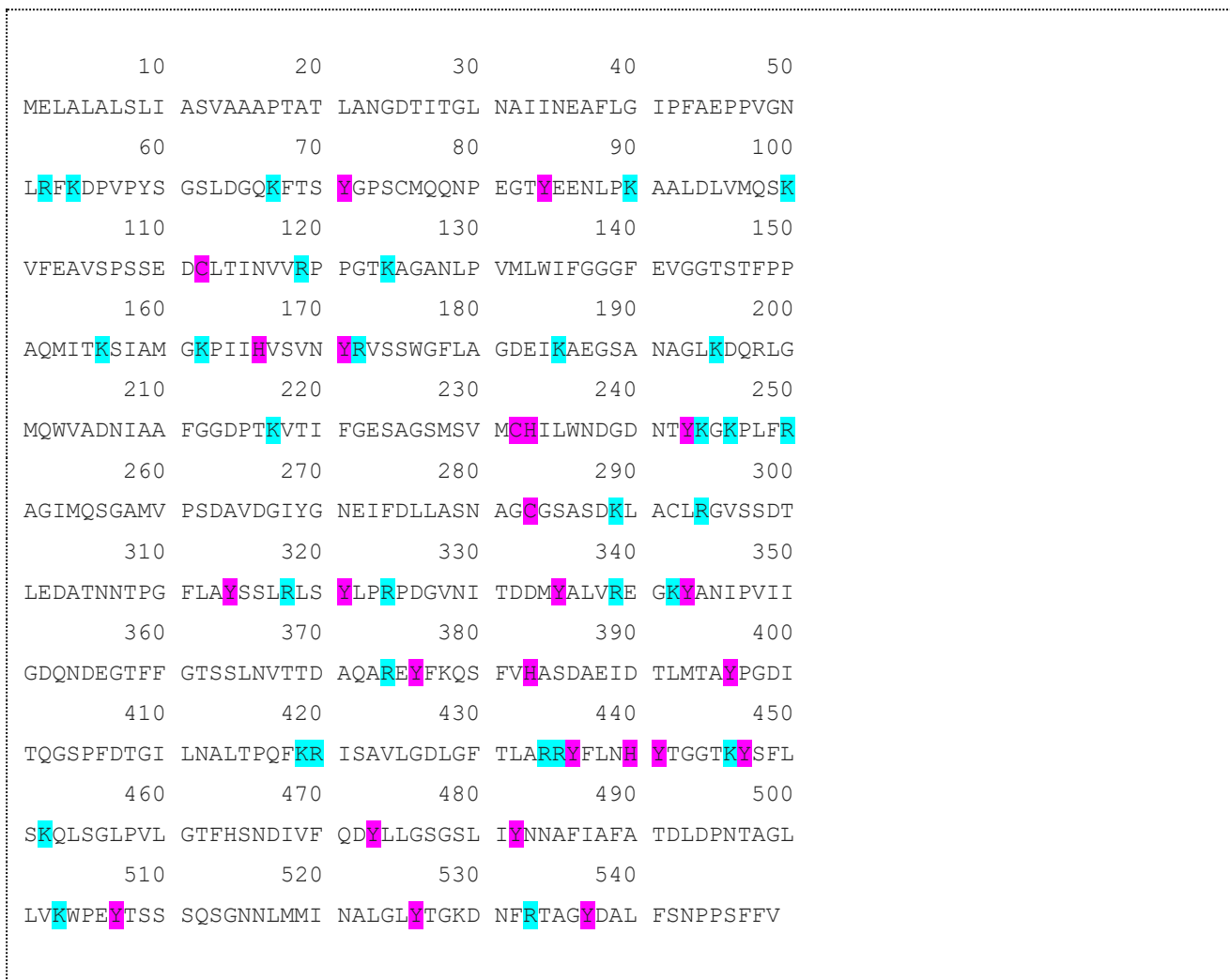


Slika 3.17: Ispitivanje efekta acitilovanja na stabilnost lipaze iz *Candida rugosa* imobilizovane na hidroksiapatitu. **A)** Poređenje temperaturne stabilnosti modifikovanih uzoraka i nedomifikovane kontrole na 70 °C; **B)** Uticaj acitilovanja na mogućnost višestruke upotrebe imobilizovane lipaze u hidrolizi *p*-nitrofenil palmitata.

Slika 3.17 A pokazuje da acitilovanje sa anhidridom sirćetne kiseline doprinosi stabilizaciji imobilizovane lipaze na 70 °C. Iz grafika se može videti da u slučaju acitilovanja lipaze sa anhidridom sirćetne kiseline, imobilizovani preparat nakon 180 minuta inkubiranja zadržava 50 % od početne aktivnosti, dok nedomifikovana kontrola i enzim modifikovan anhidridom maleinske kiseline nakon istog vremena inkubiranja zadržavaju svega 30 % od prvobitne aktivnosti. Poboljšanje temperaturne stabilnosti je posledica formiranja novih unutarmolekulskih interakcija, pre svega vodoničnih veza u kojima

učestvuju acetilovani aminokiselinski ostaci. Blagi pomak u odnosu na nemodifikovanu kontrolu se vidi i na primeru višestruke upotrebe modifikovanog imobilizata lipaze u hidrolizi *p*NPP (slika 3.17 B). U ovom slučaju se mogućnost primene modifikovanog imobilizata povećava za još jedan reakcioni ciklus.

U odeljku 3.2.5 je pokazano da su aminokiseline na površini CRL ključne u prepoznavanju vezujućeg mesta na HAP i interakciji sa njim. Uvidom u primarnu strukturu najzastupljenije izoforme 1 CRL, UniProt pristupni broj: P20261 se vidi da u celoj strukturi zrelog proteina postoji ukupno 18 lizina (3,4 % od ukupnog broja AK u zreom proteinu), to jest 13 arginina (2,4 % od ukupnog broja AK u zreom proteinu) (slika 3.18, AK obeležene tirkiznom bojom)²²¹.



Slika 3.18: Pozicija aminokiselinskih ostataka u izoformi 1 lipaze iz *Candida rugosa* (LIP1) koji su moguće mete acetilovanja - UniProt pristupni broj P20261²⁴⁰. Tirkiznom bojom su označeni ostaci Arg i Lys, koje specifično acetiluje anhidrid maleinske kiseline. Ružičasto su označeni ostaci His, Tyr i Cys koje pored Arg i Lys može nespecifično acetilovati anhidrid sirćetne kiseline.

Potencijalne mete za acetilovanje sa slike 3.18, koje se nalaze na površini zrelog nativnog proteina, su najverovatnije razučene i previše međusobno udaljene da bi mogle doprineti značajnijem poboljšanju vezivanja, a samim tim i stabilnosti u testiranim uslovima. Nešto bolji efekat modifikacije anhidridom sirćetne kiseline, u pogledu stabilizacije se može objasniti činjenicom da se radi o slabije selektivnom modifikatoru, koji pored Lys i Arg takođe modifikuje i Tyr, His i Cys, pa je % modifikovanih AK ostataka koji bi mogli učestvovati u vezivanju veći (slika 3.18, aminokiselinski ostaci obeleženi ružičastom bojom)¹²⁵.

3.4 Primena enzima imobilizovanih na hidroksiapatitu u nevedenim reakcionim sistemima

Primena imobilizovanih enzima u specifičnim biotransformacijama je kruna svakog istraživanja, vezanog za njihovu stabilizaciju. Imajući na umu sve prednosti nevedene biokatalize, katalitička efikasnost pripremljenih imobilizata je ispitana u različitim vrstama nevedenih reakcionih sistema i u različitim sintetskim reakcijama. Sintetisana jedinjenja su strukturno okarakterisana i na osnovu toga je utvrđena supstratna specifičnost imobilizovanih enzimskih preparata. Takođe je ispitana i stabilnost imobilizovanih enzimskih preparata tokom kontinuirane sinteze navedenih proizvoda.

Efikasnost preparata CRL je testirana u sledećim nevedenim reakcionim sistemima:

- sintezi kapsinoida esterifikacijom vanilil-alkohola slobodnim masnim kiselinama u n-heksanu,
- sintezi kapsinoida transesterifikacijom kokosovog ulja vanilil-alkoholom u n-heksanu,
- sintezi mirisnih metil-estara esterifikacijom metanola karboksilnim kiselinama.

Odabir organskih rastvarača za gorepomenute biotransformacije je utemeljen na rezultatima iz odeljka 3.3.3.

Efikasnost preparata AOL je testirana tokom transgalaktozilacije vanilil-alkohola (sinteza vanilil-galaktozida) ili laktoze (sinteza galakto-oligosaharida). Navedene biosinteze su izvedene u koncentrovanom rastvoru laktoze, u uslovima iz odeljaka 4.4.3 i 4.4.4.

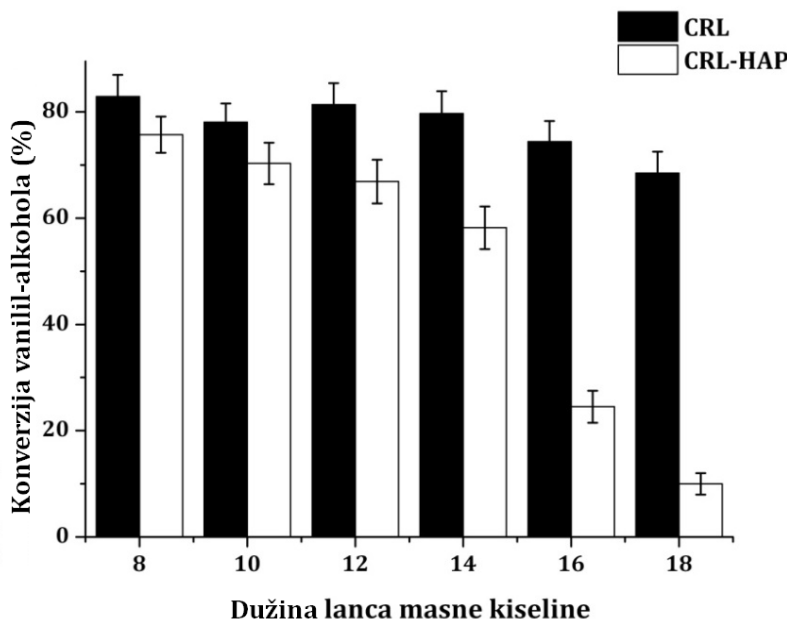
3.4.1 Primena lipaza iz *Candida rugosa* u sintezi kapsinoida

Kapsinoidi su važna podgrupa nutraceutika, koji se mogu dobiti enzimskom esterifikacijom vanilil-alkohola primenom različitih lipaza. Do sada je najveći broj enzimskih sinteza ovih jedinjenja izveden sa komercijalnim preparatom CAL B, Novozyme 435, međutim zbog njegove visoke cene traže se alternativne lipaze koje bi mogle izvesti

pomenutu transformaciju^{29,241,242}. Budući da je CRL jedna od najpopularnijih lipaza za industrijske transformacije, ispitana je efikasnost slobodne i imobilizovane forme ovog enzima u njihovoj sintezi. U okviru ovog poglavlja takođe su upoređene i 2 grupe acil-donora za esterifikaciju vanilil-alkohola: slobodne MK različite dužine alkil-niza i TAG iz kokosovog ulja kao složenog supstrata. Strukturnom karakterizacijom nastalih proizvoda je određena supstratna specifičnost korišćenog enzima.

3.4.1.1 Ispitivanje supstratne specifičnosti lipaza iz *Candida rugosa* prema masnim kiselinama

U ovom eksperimentu je ispitana supstratna specifičnost preparata lipaze iz *Candida rugosa* prema zasićenim MK različite dužine alkil-niza tokom esterifikacije VA. Među testiranim kiselinama su 3 sa lancem srednje dužine: oktanska (kaprilna, C8:0), dekanska (kaprinska, C10:0) i dodekanska (laurinska, C12:0), kao i 3 sa dugim lancem: tetradekanska (miristinska, C14:0), heksadekanska (palmitinska, C16:0) i oktadekanska kiselina (stearinska, C18:0). Tokom esterifikacije je upoređena efikasnost slobodne CRL i CRL-HAP. Kao reakcioni medijum za sintezu kapsinoida je korišćen *n*-heksan, u skladu sa rezultatima stabilnosti i aktivnosti lipaze iz odeljka 3.3.3. Finalna koncentracija oba supstrata u reakcionoj smeši je iznosila 0,025 mol/L. Tok eksperimenta je predstavljen u odeljku 4.4.1.1, a rezultati su predstavljeni u vidu grafika zavisnosti % konverzije VA od broja ugljenikovih atoma u alkil-niza MK. Eksperiment je ponovljen u triplikatu i na grafiku je prikazana vrednost standardne greške (slika 3.19).



Slika 3.19: Ispitivanje supstratne specifičnosti slobodne i imobilizovane lipaze iz *Candida rugosa* prema masnim kiselinama tokom esterifikacije vanilil alkohola.

Slika 3.19 pokazuje da testirani preparati lipaze, slobodna CRL i CRL-HAP, pokazuju značajnu razliku u supstratnoj specifičnosti. Naime, kada se kao katalizator koristi slobodna lipaza, dužina acil-donora nema značajnog uticaja na prinos sintetizovanih kapsinoida: svi proizvodi su dobijeni u značajnom prinosu od $70 - 82 \pm 5 \%$. Kao što je navedeno u Opštem delu, CRL je poznata po svojoj širokoj supstratnoj specifičnosti, tako da je navedeni rezultat očekivan. Pored toga, na osnovu rezultata iz tabele 3.3 je utvrđeno da korišćeni komercijalni preparat CRL sadrži 3 različite izoforme lipaza. Iako su navedene izoforme vrlo slične po molekulskoj masi i imaju visok procenat homologije sekvence²², one se razlikuju po svojoj supstratnoj specifičnosti. To je potvrđeno i u radu Benjamina i Pandija, nakon izolovanja i prečišćavanja 3 izforme CRL sa različitom supstratnom specifičnošću tokom hidrolize TAG²⁴³.

Ukoliko se rezultati sa slike 3.19 za slobodnu lipazu ipak malo detaljnije prouče, vidi se da su nešto viši prinosi kapsinoida dobijeni tokom esterifikacije sa MK srednje dužine niza (8 – 12 C) i to pogotovo sa dodekanskom (laurinskom) kiselinom. To se može objasniti anatomijom mesta za vezivanje supstrata, koje je kod CRL u obliku dugačkog, širokog tunela. Najhidrofobniji regioni tunela su oni, koji obuhvataju supstrat u regionu između C4 i

C7, kao i od C12 do C14²⁶, tako da se upravo MK srednje dužine najpovoljnije pozicioniraju u supstrat-vezujućem džepu.

Kada se kao katalizator koristi imobilizovana lipaza, profil supstratne specifičnosti je mnogo jasnije i oštrije definisan. U ovom slučaju u najvišem prinosu nastaje vanilil-oktanoat (prinos $76 \pm 3,4$ %), u kome je acil-niz za 4 C-atoma kraći u poređenju sa vanilil-dodekanoatom iz reakcije katalizovane slobodnom lipazom. Sa daljim porastom dužine alkil-niza, prinos odgovarajućih kapsinoida oštro opada, tako da je prinos vanilil-oktadekanoata, sintetizovanog sa imobilizovanom lipazom, gotovo 7 puta niži u poređenju sa prinosom istog estera sintetizovanog sa slobodnom lipazom. Sličan trend supstratne specifičnosti je uočen u studiji kinetike esterifikacije sulkatola u toluenu sa CRL adsorbovanom na Accurel EP100²⁴⁴, kao i tokom transesterifikacije metil-estara zasićenih MK sa VA u prisustvu Novozyme 435²⁴¹. Promena supstratne specifičnosti nije neuobičajena pojava prilikom imobilizacije enzima, zbog drugačije fizičke orijentacije imobilizovanog enzima u odnosu na slobodan enzim u rastvoru³⁰.

Bitno je napomenuti da je prinos dobijenih kapsinoida i sa slobodnom i sa imobilizovanom lipazom značajno viši u poređenju sa sličnim pristupima, opisanim u literaturi. Naime, u proceduri za sintezu vanilil-nonanoata, Kobata i saradnici su dobili ciljni ester u maksimalnom prinosu od svega 11,9 %, primenom slobodne CRL, odnosno 71 % primenom Novozyme 435.²⁴¹ Robi i saradnici su sintetisali vanilil-estar dokozaheksaenske kiseline (C 22:6) sa Novozyme 435 u prinosu od 54 %²⁴⁵. Ovako velika razlika u prinosima se može objasniti odabirom OR kao medijuma za biotransformaciju. Obe grupe autora su esterifikaciju izvodile u polarnim OR: Kobata i saradnici u dioksanu i acetonu za CRL, odnosno dioksanu za Novozyme 435²⁴¹, a Robi i saradnici u acetonitrilu²⁴⁵. Za sintezu kapsinoida u ovoj disertaciji je korišćen nepolarni rastvarač, *n*-heksan, u skladu sa rezultatima predstavljenim na slici 3.15. I druge studije svedoče o tome da je CRL bila efikasnija prilikom esterifikacije u nepolarnim OR: *izo*-oktan je korišćen kao reakcioni medijum za sintezu amil-izobutirata²⁴⁶ i enantioselektivnu sintezu butil-estra *S*-flurbiprofena²⁴⁷ sa prinosom proizvoda u obe reakcije preko 95 %; *n*-amil-izobutirat je dobijen u prinosu od preko 80 % sa lipazom zarobljenom u hidrogelove *N*-

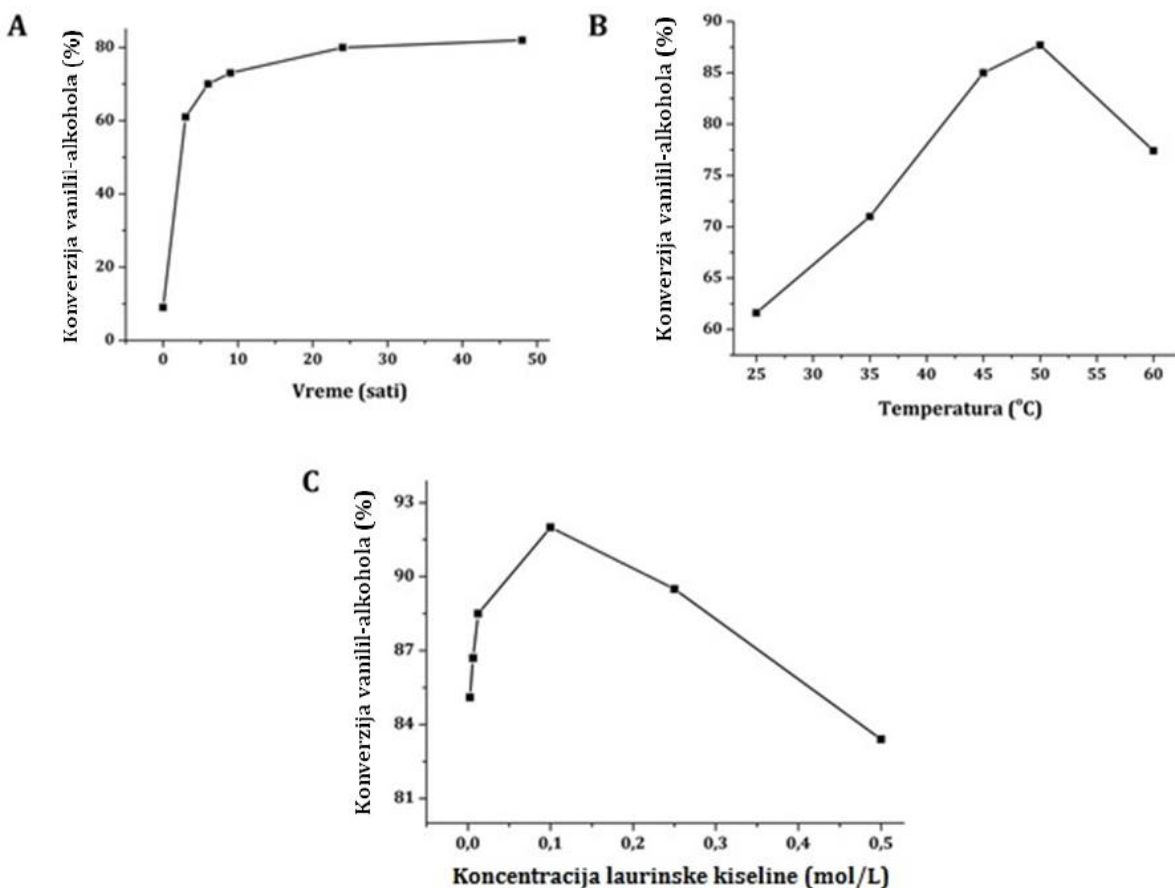
izopropilakrilamida i itakonske kiseline u *n*-heksanu²⁴⁸. Isti rastvarač je korišćen i za sintezu citronelil-butirata primenom CRL adsorbovane na Amberilte XAD-1180²⁴⁹.

Log P OR, kao reakcionog medijuma za nevodenu biokatalizu, je u najboljoj korelaciji sa enzimskom aktivnošću. Potvrđeno je da OR sa log P > 2 (nepolarni OR) doprinose očuvanju aktivnosti enzima²⁵⁰. Nepolarni OR se ne mešaju sa vodom, te ne remete celovitost hidratacione ljuske enzima, neophodne za njihovu katalitičku aktivnost u nevodnim reakcionim sistemima. Novija istraživanja na primeru lipaza pokazuju da neorganski rastvarači imaju još jedan pozitivan efekat, jer doprinose konformacionom prelazu zatvorene u otvorenu formu ovog enzima, a time i njegovoj aktivaciji²⁵¹.

Pomenute studije Kobate i saradnika, odnosno Robija i saradnika, važne su i zato što pružaju mogućnost poređenja katalitičke efikasnosti imobilizata CRL iz ove doktorske disertacije sa Novozyme 435, komercijalnim imobilizatom CAL B velikog industrijskog značaja. Na osnovu rezultata sa slike 3.20 može se zaključiti da je, zavisno od reakcionog sistema, CRL-HAP pokazao veću katalitičku efikasnost tokom sinteze vanilil-estara, a pripremljen je na znatno jednostavniji, brži i jeftiniji način nego Novozyme 435.

3.4.1.2 Optimizovanje reakcionih uslova za sintezu vanilil-laurata

Kako je u preliminarnom eksperimentu esterifikacije VA prinos vanilil-laurata (VL) bio najviši među sintetizovanim individualnim kapsinoidima, dodatno su optimizovani i ostali reakcioni parametri za njegovu sintezu. Svi eksperimenti iz ovog odeljka su izvedeni u *n*-heksanu kao reakcionom medijumu, sa slobodnom lipazom kao katalizatorom. Kinetika sinteze je ispitana pri fiksnoj koncentraciji oba supstrata (0,025 mol/L), na 50 °C tokom ukupno 72 sata. Uticaj reakcione temperature je ispitan tokom 24-časovnog inkubiranja reakcione smeše sa 0,025 mol/L supstratima, u temperaturnom opsegu od 25 – 60 °C. Tokom proučavanja efekta molarnog odnosa supstrata, koncentracija vanilil-alkohola u reakcionoj smeši je održavana fiksnom (0,025 mol/L), dok je koncentracija laurinske kiseline varirana u opsegu 0,0025 – 0,5 mol/L. Detaljan eksperimentalni postupak je dat u odeljku 4.4.1.2. Rezultati ovog eksperimenta su prikazani kao zavisnost procenta konverzije vanilil-alkohola od svakog testiranog reakcionog parametra (slika 3.20).



Slika 3.20: Efekat osnovnih reakcionih parametara na prinos esterifikacije vanilil alkohola laurinskom kiselinom. **A)** Kinetika sinteze vanilil laurata; **B)** Uticaj reakcione temperature; **C)** Uticaj molarnog odnosa supstrata.

Optimalno vreme inkubiranja reakcione smeše je 24 sata, kao što se vidi na slici 3.20A. Tada se postiže maksimalan prinos konverzije VA od 80 %, koji sa daljim produžavanjem inkubiranja samo neznatno raste. Profil temperaturne zavisnosti prinosa VL ima zvonasti oblik, sa jasno izraženim pikom na 50 °C. Prinos konverzije VA na ovoj optimalnoj temperaturi iznosi gotovo 90 % (slika 3.20 B). Oštar pad prinosa VL sa daljim povećanjem reakcione temperature je posledica temperaturne inaktivacije lipaze.

Esterifikacija je ravnotežna reakcija, stoga se povećanjem koncentracije supstrata može uticati na njenu ravnotežu usled delovanja Zakona o dejstvu masa. Sa druge strane, previsoka koncentracija supstrata može uzrokovati inhibiciju enzima, pa je neophodno odrediti optimalnu vrednost ovog parametra, pri kojoj će se postići kompromis između

pomenutih zahteva. Zavisnost prinosa VL od molarnog odnosa supstrata takođe pokazuje tipičan zvonasti profil (slika 3.20 C). Maksimalni stepen konverzije VA od 90%, se postiže kada je koncentracija laurinske kiseline u reakcionoj smeši 0,1 mol/L. To odgovara molarnom odnosu alkohol: kiselina 1:4. Pri koncentracijama acil-donora iznad 0,1 mol/L prinos esterifikacije VA naglo opada, što je posledica supstratne inhibicije enzima prisutnom kiselinom²⁵².

U optimalnim reakcionim uslovima, prinos VL je veoma visok, 90 %. Ta vrednost je za 20 % viša u poređenju sa prinosom istog kapsinoida, dobijenog hemijskom sintezom u tetrahidrofuranu, sa $CeCl_3$ kao katalizatorom. Osim po prirodi katalizatora, dva protokola se razlikuju i po prirodi acil-donora, jer je tokom hemijske sinteze izvor acil-grupe za esterifikaciju VA bio lauril-hlorid²⁵³. Acil-hloridi su znatno reaktivniji u poređenju sa odgovarajućim kiselinama, pa se reakcije u kojima oni učestvuju mogu odvijati na sobnoj temperaturi²⁵⁴. Međutim, veliki problem u radu sa njima su sporedne reakcije, zbog kojih se smanjuje prinos ciljnog proizvoda, kao i egzotermna priroda procesa, tokom koga se oslobađa toksični i korozivni gas, hlorovodonik²⁵⁴. Prema tome, jasno je da je optimizovani postupak za sintezu VL, sa lipazom kao katalizatorom, znatno bolje rešenje i u pogledu prinosa reakcije i u pogledu bezbednosti, zbog čega ima veliki potencijal za dalje razvijanje na industrijskom nivou proizvodnje.

Nekoliko publikacija novijeg datuma ukazalo je na veliki zdravstveni značaj laurinske kiseline i njenih estara. U *in vitro* uslovima zabeležena je inhibicija rasta *Propionibacterium acnes*, gram-pozitivne anaerobne bakterije i glavnog uzročnika akni, povezanog i sa upalom išijačnog nerva zbog čega mogu biti od interesa za farmaceutsku i kozmetičku industriju²⁵⁵. U revijalnom radu Dajrita je sumirano mikrobicidno i mikrobiostatsko dejstvo laurinske kiseline i monolaurina protiv brojnih gram pozitivnih bakterija, gljiva i virusa²⁵⁶. Studija Lapano i saradnika iz 2017. godine je dokazala da laurinska kiselina inhibira rast ćelija tumora debelog creva i deluje antiproliferativno i proapoptotski na ćelije tumora dojke i endometrijuma²⁵⁷.

Prema tome, osim što sam VL, kao kapsinoid ima dokumentovano fiziološko dejstvo, on istovremeno može da omogući i sporije oslobađanje laurinske kiseline i na taj način

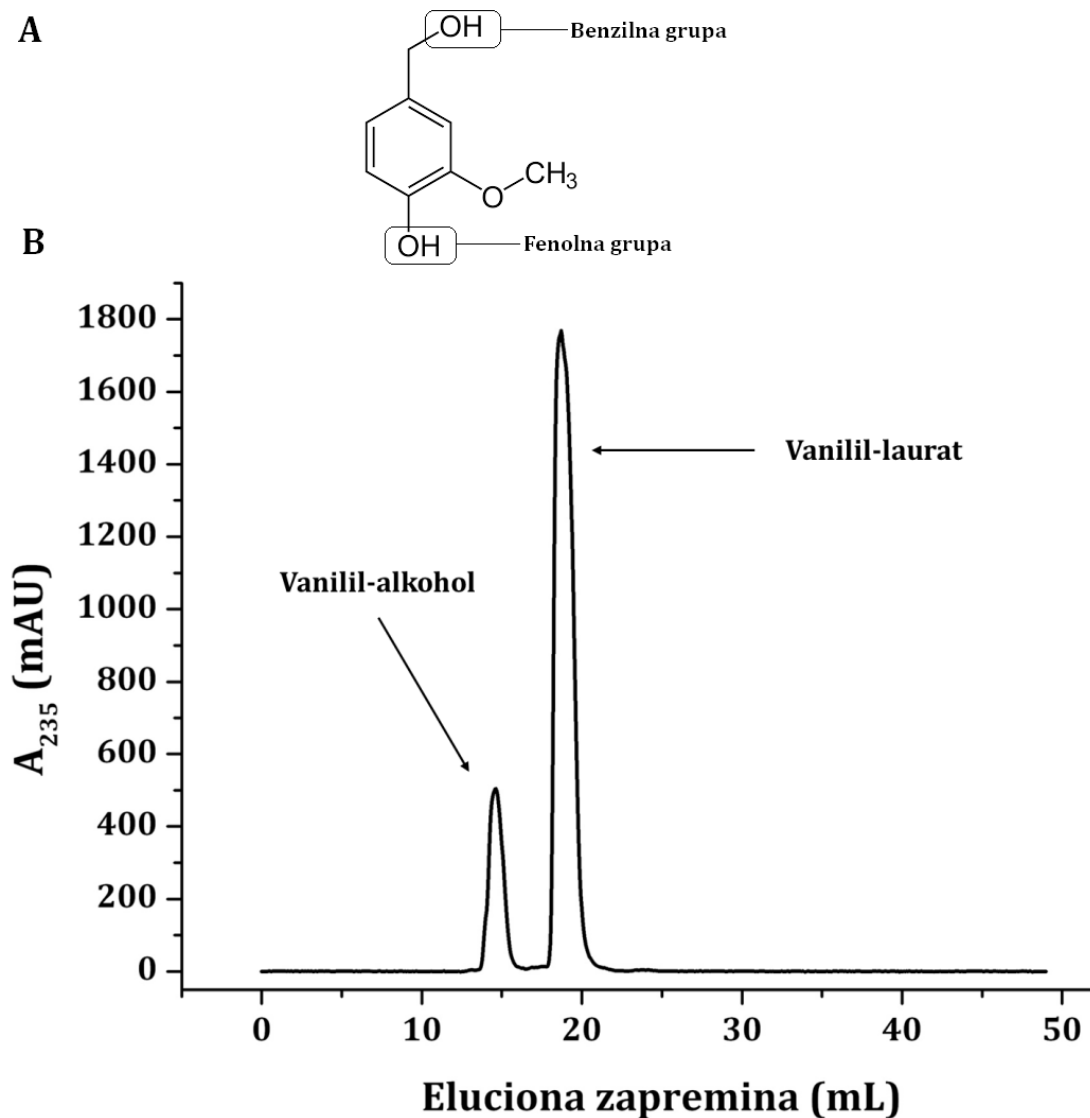
ostvari nove fiziološke uloge. To jasno govori o velikom značaju enzimske sinteze VL, optimizovane u ovoj doktorskoj disertaciji.

3.4.1.3 Strukturna analiza vanilil-laurata

Iz strukturne formule VA, predstavljene na slici 3.21 A, vidi se da on ima dve grupe, preko kojih se može esterifikovati laurinskom kiselinom: benzilnu grupu (primarni alkohol) i fenolnu grupu. Prema tome, tri proizvoda esterifikacije su moguća:

- proizvod u kome je esterifikovana samo benzilna grupa,
- proizvod u kome je esterifikovana samo fenolna grupa,
- proizvod u kome su esterifikovane i benzilna i fenolna grupa.

Da bi se nedvosmisleno utvrdilo koji proizvod nastaje, VL je bilo potrebno prečistiti i strukturno analizirati. Za prečišćavanje ovog kapsinoida korišćena je preparativna reverzno-fazna HPLC hromatografija prema uslovima iz odeljka 4.4.1.3. Elucioni profil VL je prikazan na slici 3.21 B.



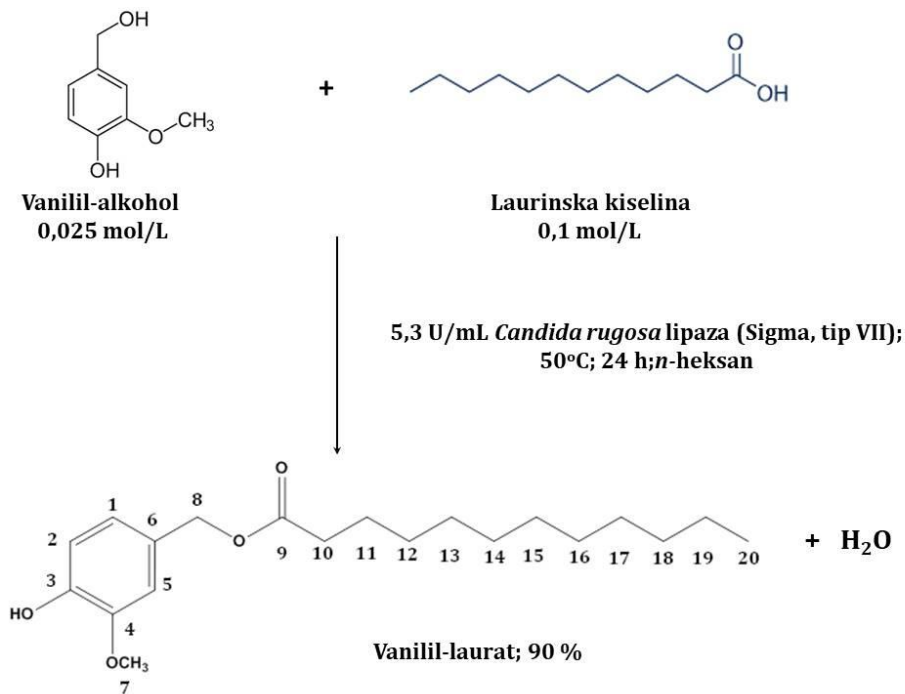
Slika 3.21: Strukturna analiza vanilil laurata. **A)** Struktura vanilil alkohola; **B)** Elucioni profil vanilil laurata nakon preparativne reverzno-fazne HPLC hromatografije.

Na prikazanom hromatogramu sa slike 3.21 B se uočava samo jedan pik koji po položaju odgovara VL. Na osnovu njegove elucione zapremine se bez dileme može isključiti nastajanje proizvoda u kome su obe hidroksilne grupe VA esterifikovane. Da je nastao takav proizvod, njegov pik bi se javio znatno kasnije na hromatogramu, usled velike nepolarosti. Međutim, hromatogram sa slike 3.21 B nije dovoljno informativan da se sa sigurnošću utvrdi da li je nastali proizvod čisto jedinjenje ili smeša estara u kojima je lauril-ostatak vezan za različite hidroksilne grupe alkohola.

Za precizniju strukturnu analizu nastalog jedinjenja primenjene su 1 D NMR tehnike (^1H NMR i ^{13}C NMR). U tom smislu, upoređeni su ^1H NMR spektri vanilil-laurata dobijenog enzimskom sintezom sa vanilil lauratom kod koga je primarna OH grupa esterifikovana, a koji je dobijen hemijskom sintezom (Prilog 1). Ova dva spektra su bila potpuno identična, što je nedvosmisleno ukazalo da je jedinjenje, nastalo enzimskom esterifikacijom VA, VL u kome je isključivo esterifikovana primarna (benzilna) OH-grupa acil-akceptora.

Hemijska pomeranja prečišćenog vanilil-laurata, dobijenog primenom lipaze iz *Candida rugosa* kao katalizatora, su za ^1H NMR (200 MHz; CDCl_3): 6,90 – 6,85 (m, 3H); 5,03 (s, 2H); 3,89 (s, 3H); 2,33 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,73 – 1,52 (m, 2H); 1,36 – 0,20 (m, 16 H); 0,88 (t, $J = 6,4$ Hz, 3 H. Hemijska pomeranja vanilil-laurata u ^{13}C NMR spektru (50 MHz; CDCl_3) su: 173,84; 146,46; 145,74; 128,00; 121,97; 114,32; 111,22; 66,24; 55,85; 34,34; 31,84; 29,53; 29,40; 29,26; 29,20; 29,08; 24,91; 22,62; 14,03 (usled preklapanja, jedan signal nedostaje). Prikazana hemijska pomeranja odgovaraju strukturi proizvoda u kojoj je esterifikovana samo benzilna (primarna) –OH grupa.

Sumiranjem svih rezultata iz odeljaka 3.4.1.1 i 3.4.1.2, reakcioni mehanizam sinteze kapsinoida VL se može predstaviti shemom na slici 3.22.



Slika 3.22: Struktura vanilil laurata, enzimski sintetizovanog sa lipazom iz *Candida rugosa*, potvrđena nuklearnom magnetnom rezonancom.

Strukturna karakterizacija sličnih vanilil-estara je pokazala istu preferenciju korišćenih enzima prema benzilnoj grupi VA: Robi i saradnici su sintetisali vanilil-estar dokozaheksaenske kiseline (C22:6) sa Novozyme 435²⁴⁵, a Liu i saradnici su, tokom studije acetilacije različitih alkohola sa CRL dokazali da kod svih testiranih aromatičnih alkohola lipaza esterifikuje isključivo primarnu grupu, zbog očiglednih sternih razloga koji onemogućuju esterifikaciju sekundarne aromatične hidroksilne grupe²⁵⁸.

3.4.1.4 Obogaćivanje kokosovog ulja kapsinoidima

Kako je pokazano u prethodnom odeljku, kapsinoidi se mogu u visokom prinosu proizvesti direktnom esterifikacijom VA slobodnim MK. Međutim, kako bi proizvodnja ovih jedinjenja bila isplativa i na većoj proizvodnoj skali, neophodno je pronaći neki jeftiniji supstrat. Kokosovo ulje se tradicionalno koristi kao prehrambeno ulje širom sveta, ali je ono takođe cenjeno i kao važna industrijska sirovina. Trigliceridi kokosovog ulja se odlikuju visokim sadržajem zasićenih masnih kiselina, pa je ono zato znatno otpornije na kvarenje u poređenju sa drugim uljima. U kokosovom ulju su najzastupljenije MK srednje

dužine alkil-lanca, koje su ujedno i sastavne komponente kapsinoida²⁵⁹. Laurinska kiselina je najzastupljenija MK u kokosovom ulju i zanimljivo je da je po njenom sadržaju ono slično humanom mleku²⁶⁰. Supstratna specifičnost preparata lipaze iz *Candida rugosa* sa slike 3.19, je bila još jedan značajan razlog više da se ispita njihova efikasnost u transesterifikaciji kokosovog ulja. Kokosovo ulje je prvi put korišćeno kao supstrat tokom sinteze kapsinoida transesterifikacijom sa lipazom iz *Candida rugosa*.

I u ovom eksperimentu su upoređene transesterifikacione efikasnosti slobodne i imobilizovane lipaze. Za razliku od esterifikacije VA sa slobodnim MK, u ovom slučaju je nastajanje proizvoda registrovano samo u reakcionoj smeši u kojoj je kao katalizator korišćena slobodna lipaza. Najverovatniji razlog tome je razlika u polarnosti supstrata, jer ulje kao izrazito nepolaran supstrat teško može da dopre do enzima adsorbovanog za hidrofilni nosač. Zbog toga se rezultati, prikazani u tabeli 3.4, odnose isključivo na slobodan enzim.

Tabela 3.4: Efikasnost lipaze iz *Candida rugosa* u sintezi smeše kapsinoida iz kokosovog ulja.

Estar	Prinos konverzije vanilil-alkohola nakon 48 h (%)	Sadržaj odgovarajuće masne kiseline u kokosovom ulju (%) ²⁶¹
Vanilil-kaprilat	26	Kaprilna kiselina: 5 – 9
Vanilil-kaprat	13	Kapriinska kiselina: 6 – 10
Vanilil-laurat	41	Laurinska kiselina: 44 – 52

Iz tabele 3.4 je očigledno da se najveći prinos konverzije VA postiže sa laurinskom kiselinom, što je očekivano kada se uzmu u obzir sastav kokosovog ulja i prethodno određena supstratna specifičnost sa slike 3.20. Rezultati ovog eksperimenta pokazuju da se spektar industrijskih složenih supstrata lipaze iz *Candida rugosa* može proširiti i na kokosovo ulje za dobijanje kapsinoida. Kokosovo ulje je glavno prehrambeno ulje u zemljama tropskog pojasa, ali je sve popularnije i širom sveta. Stoga je mogućnost njegovog obogaćivanja fiziološki aktivnim kapsinoidima na jednostavan i brz način, vrlo značajno za proizvodnju funkcionalne hrane i nutraceutika.

Mbatia i saradnici su predstavili vrlo sličan sistem za transesterifikaciju ribljeg ulja. Pomenuti autori su prvo iz ribljeg ulje lososa prethodno koncentrovali višestruko nezasićene masne kiseline, a zatim su ih esterifikovali vanilil-alkoholom i rutinom primenom Novozyme 435. Prinos vanilil-estara masnih kiselina iz ribljeg ulja je bio viši, nego kod rutin-estara i iznosio je 60 %²⁴². Kada se ovaj podatak uporedi sa prinosom transesterifikacije kokosovog ulja iz ove doktorske disertacije, vidi se da je efikasnost upoređenih biokatalizatora u sličnom rangu. Pored toga, protokol Mbatie i saradnika uključuje dodatni korak koncentrovanja i prečišćavanja masnih kiselina, koji oduzima vreme i zahteva dodatni utrošak ionako skupog biokatalizatora, a ne manifestuje se značajno višim prinosom krajnjeg proizvoda.

3.4.2 Primena lipaza iz *Candida rugosa* u sintezi kratkolančanih metil-estara

Estri su još jedna značajna grupa industrijskih proizvoda, dobijenih sintetskom aktivnošću lipaza različitog porekla. Rezultati eksperimenata, opisanih u ovom odeljku, se direktno nadovezuju na rezultate studije stabilnosti i aktivnosti različitih lipaze iz *Candida rugosa* u prisustvu metanola, opisanih u odeljku 3.3.3.

3.4.2.1 Ispitivanje supstratne specifičnosti lipaze iz *Candida rugosa* prema karboksilnim kiselinama

Supstratna specifičnost slobodne lipaze iz *Candida rugosa* i imobilizata lipaze na HAP je ispitana tokom esterifikacije metanola karboksilnim kiselinama sa 2 – 6 C-atoma u *n*-heksanu (odeljak 4.4.2.1). Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 3.5.

Tabela 3.5: Ispitivanje supstratne specifičnosti slobodne i imobilizovane lipaze iz *Candida rugosa* prema karboksilnim kiselinama tokom sinteze metil estara.

Estar	Prinos sa slobodnom lipazom (%)	Prinos sa lipazom imobilizovanom na hidroksiapatitu (%)
<i>Metil-etanoat</i>	2,6	52,5
<i>Metil-butanoat</i>	14,7	8,7
<i>Metil-heksanoat</i>	10,2	5,8

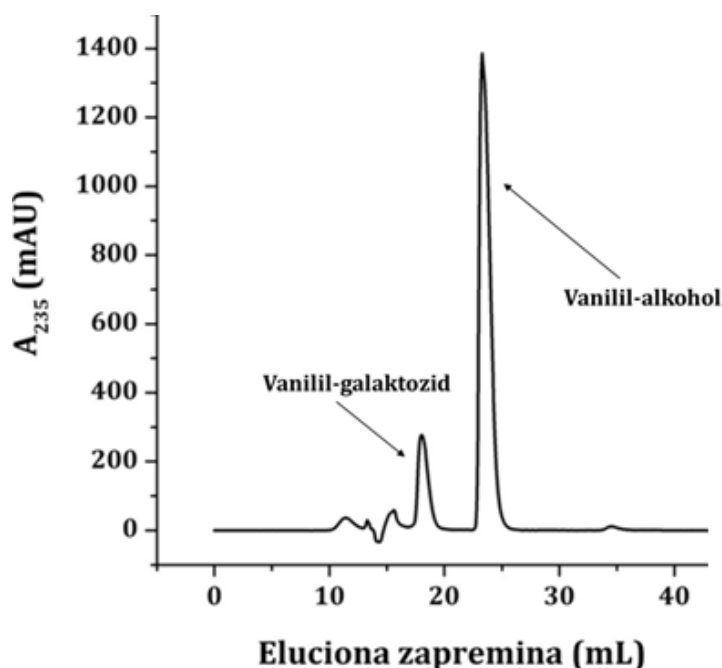
Rezultati iz tabele 3.5 potvrđuju promenu supstratne specifičnosti lipaze iz *Candida rugosa*, do koje dolazi usled imobilizacije na HAP. Najveće razlike u supstratnoj specifičnosti između dve upoređene formulacije lipaze uočavaju se prilikom esterifikacije metanola karboksilnom kiselinom najkraćeg niza, a to je etanska kiselina (C2). Imobilizovani preparat lipaze u znatno većem prinosu sintetise metil-etanoat nego slobodan enzim. U slučaju slobodne lipaze dobijeni rezultat nije iznenađujući, jer je opštepoznato da metanol snažno inhibira ovu lipazu. U slučaju imobilizovanog preparata, skok u prinosu metil-etanoata se može pripisati prirodi nosača za imobilizaciju: HAP kao hidrofilan nosač na sebi zadržava određeni sloj vode i na taj način održava hidratacioni sloj lipaze, štiteći je od inhibicije u prisustvu alkohola.

Primer sinteze metil-etanoata, proizvoda esterifikacije u kojoj su oba supstrata kratkolančani, nije do sada zabeležen u literaturi na primeru *wild-type* lipaze iz *Candida rugosa*, bilo slobodne, bilo imobilizovane (maseni spektar metil-etanoata nakon gasne hromatografije dat je u Prilogu 2). U Opštem delu^{22,26,216}, kao i tokom esterifikacije vanilil-alkohola u ovoj doktorskoj disertaciji, potvrđeno je da CRL prefereira supstrate sa srednjom dužinom lanca. Šmit i saradnici su tehnologijom rekombinantne DNK proizveli mutante izoforme 1 *Candida rugosa* lipaze sa visokom specifičnošću prema kratkolančanim supstratima, međutim ovi autori nisu ispitivali ponašanje lipaze sa supstratima koji imaju manje od 6 C-atoma u ugljovodoničnom nizu²⁷. Prema tome, HAP kao nosač za imobilizaciju lipaze iz *Candida rugosa*, otvara mogućnosti sasvim nove primene u sintezi metil-estara karboksilnih kiselina sa manje od 6 C-atoma. To je od velikog značaja, jer je na globalnom tržištu industrijskih sirovina metanol jeftiniji od etanola⁶¹, acil-akceptora koji se najčešće koristi u sličnim transformacijama. Takođe, jedini za sada poznati način industrijske proizvodnje metil-etanoata je hemijska sinteza preko dve rute: karbonilacijom metanola²⁶², ili esterifikacije sirćetne kiseline metanolom reaktivnom destilacijom u prisustvu sumporne kiseline²⁶³. Prema tome, rezultati prikazani u ovom poglavlju predstavljaju dobar smer za razvoj enzimske sinteze metil-etanoata u budućnosti.

3.4.3 Primena laktaze iz *Aspergillus oryzae* u sintezi vanilil-galaktozida

U ovom odeljku su opisani rezultati ispitivanja katalitičke efikasnosti preparata AOL imobilizovane na HAP u nevodenoj sredini. Laktaza je testirana tokom galaktozilacije VA, u cilju dobijanja anti-oksidansa vanilil-galaktozida (VG) i u transgalaktozilaciji laktoze u cilju dobijanja složenijih proizvoda, GOS probiotika. U obe ove reakcije je kao donor galaktozil-ostatka korišćena laktoza i ispitana je mogućnost višestruke primene imobilizovanog preparata laktaze na HAP.

Vanilil-galaktozid je sintetizovan i prečišćen prema protokolima, detaljno opisanim u odeljku 4.4.3. Elucioni profil prečišćenog VG je prikazan na slici 3.22.



Slika 3.22: Elucioni profil vanilil-galaktozida tokom reverzno-fazne HPLC hromatografije.

Pre prečišćavanja VG je kroz kolonu propušten standard 0,025 M VA, koji je pokazivao jedan intenzivan pik na oko 24 mL. Poređenjem hromatograma standarda i hromatograma prikazanog na slici 3.23, zaključeno je da VG predstavlja pik koji silazi nakon približno 20 mL, što odgovara jednoj zapremini preparativne kolone, korišćene za njegovo prečišćavanje. Frakcije, koje su se tokom prečišćavanja javile pod ovim pikom su

prikupljene i spojene i nakon prečišćavanja su, na analitičkoj HPLC koloni u istim reverzno-faznim uslovima, pokazale jedan pik.

Po analogiji sa acilovanjem VA u prisustvu CRL, na osnovu izgleda hromatograma sa slike 3.22 se odmah može eliminisati mogućnost nastanka diglikozida, a da bi se utvrdila tačna struktura proizvoda, bila je neophodna detaljnija strukturna karakterizacija.

3.4.3.1 Strukturna analiza vanilil-galaktozida

Prečišćeno jedinjenje je okarakterisano primenom LC/ESI TOF MS, kako bi se ono nedvosmisleno identifikovalo, a zatim je podvrgnuto detaljnijoj strukturnoj analizi primenom NMR tehnike kako bi se utvrdila njegova tačna struktura u pogledu pozicije -OH grupe alkohola za koju je vezan šećerni ostatak.

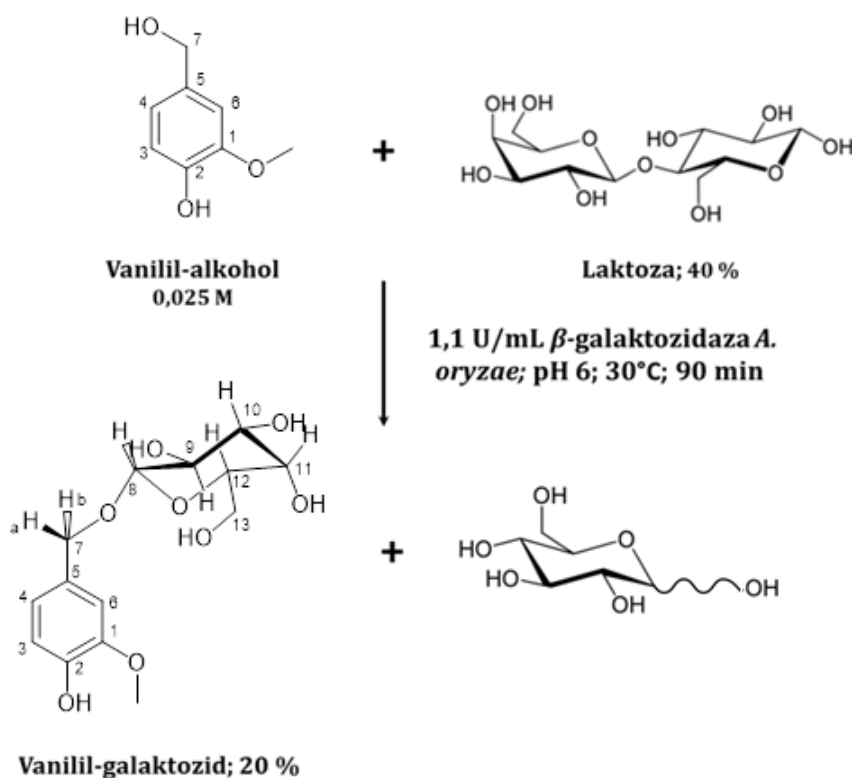
HRMS (ESI) izračunat za maseni jon $C_{14}H_{20}O_8HCOOH [M-H]^-$ iznosi 361,1140 Da a nađeno je 361,1142 Da, što odgovara vanilil-galaktozidu, kao očekivanom proizvodu.

Hemijska pomeranja, karakteristična za ovo jedinjenje, u 1H NMR spektru (200 MHz; MeOD) su: 7,05 (H_6 ; d, $J=1,7$ Hz); 6,82 (H_4 ; dd; $J=8,0$; 1,7 Hz); 6,74 (H_3 ; d; $J=8,0$ Hz); 4,82 ($H_{7\alpha}$; d; $J=11,4$ Hz); 4,58 ($H_{7\beta}$; d; $J=11,4$ Hz); 4,28 (H_8 ; d; $J=7,7$ Hz); 3,82 (H_{11} ; m); 3,78 (H_{12} ; m); 3,58 (H_{OMe} ; s); 3,56 (H_9 ; m); 3,49 (H_{13} ; m); 3,45 (H_{10} ; m). Za ^{13}C NMR (50 MHz; MeOD), hemijska pomeranja su: 149,07 (C_1); 147,42 (C_2); 130,59 (C_5); 122,57 (C_4); 115,92 (C_3); 113,51 (C_6); 103,52 (C_8); 76,90 (C_{13}); 75,16 (C_{10}); 72,72 (C_9); 71,83 (C_7); 70,51 (C_{11}); 62,73 (C_{12}); 56,52 (C_{OMe}).

Da bi se stekao detaljniji uvid u strukturu jedinjenja, u cilju identifikovanja funkcionalne grupe alkohola koja je modifikovana i vrste novoformirane glikozidne veze, urađena je i 2 D NMR analiza (Prilozi 3-7). Na osnovu korelacija protona 7β (poreklom iz vanilil-alkohola) i protona 8 (poreklom iz galaktoze) iz NOE spektra, utvrđeno je da se interakcija sa šećerom ostvaruje isključivo preko benzilne -OH grupe VA, analogno esterifikaciji iz odeljka 3.4.1.3 Iz literature je poznato da su glikozidaze izuzetno hemoselektivne u pogledu vrste hidroksilne grupe i da njihova reaktivnost opada u nizu: primarni alkohol > sekundarni alkohol > fenol, a da su potpuno nereaktivne prema tercijernim alkoholima⁶⁴. Ovi rezultati su u potpunom skladu i sa prethodno objavljenim

rezultatima iz naše laboratorije, prema kojima u sličnoj reakciji, maltaza iz *S. cerevisiae* glikoziluje VA isključivo preko benzilne grupe⁷¹.

U COSY spektru je uočeno da proton u položaju 7α iz VA nije u ravni sa protonom u položaju 8 iz šećera, ali jeste u korelaciji sa protonom 7β iz VA. Na osnovu toga je zaključeno da je novoformirana glikozidna veza β -tipa. Ovo saznanje nije bilo neobično, budući da se zna da AOL mehanistički pripada glikozid-hidrolazama koje zadržavaju konformaciju anomernog centra polaznog supstrata, u ovom slučaju laktoze²⁶⁴. Prema tome, opšta reakcija i struktura nastalog proizvoda je prikazana na slici 3.23.



Slika 3.23: Reakciona shema sinteze vanilil galaktozida, katalizovane laktazom iz *Aspergillus oryzae*.

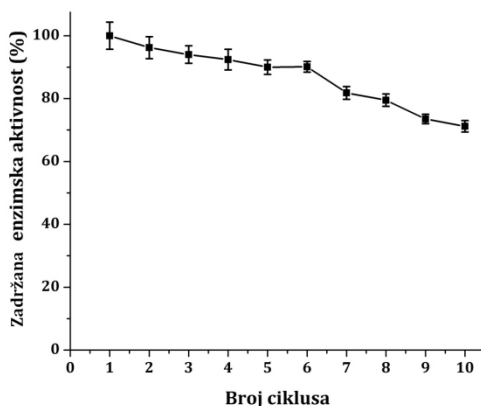
Ostvareni prinos VG od 20 % je vrlo sličan rezultatu Lopeza-Munguje i saradnika, koji su sintetisali galaktozide VA i homovanilil-alkohola u prinosu od 30-35 %, u prisustvu laktaze iz *Kluyveromyces lactis*. Pomenuti autori su takođe potvrdili da se korišćeni alkoholi galaktoziluju isključivo preko benzilne grupe. Za razliku od naše studije, prema kojoj je

jedini registrovani proizvod monogalaktozid VA, Lopez-Munguja i saradnici su u svom reakcionom sistemu uočili i nastanak digalaktozida vanilil-alkohola, iako je prinos ovog drugog proizvoda značajno niži (ispod 5%)⁹⁵. Sličnu studiju sa laktazom iz *Klyveromyces lactis*, tokom sinteze serije od 6 galaktozida različitih aromatičnih alkohola, objavili su i Bridau i saradnici. Galaktozidi *m*-anisil-alkohola, 4-hidroksibenzil-alkohola, 3-hidroksibenzil-alkohola i salicil-alkohola su sintetisani u prinosu od 10-76 %. I u ovom radu je potvrđeno da se preferencijalno galaktoziluje primarna benzilna grupa galaktozil-akceptora⁹⁹.

Kako je već naglašeno u Opštem delu, fiziološki značaj glikozida VA ogleda se u njihovom antioksidativnom dejstvu. Konkretno, galaktozid VA ima sličnu aktivnost i mehanizam dejstva kao neki dobro poznati anti-oksidansi: rezveratrol, izoflavonoidi, i sl. Uzimajući to u obzir, zajedno sa rezultatima predstavljenim u odeljku 3.4.3, jasno je da imobilizat AOL iz ove doktorske disertacije pokazuje veliki potencijal za širu primenu u sintezi ovog i sličnih jedinjenja.

3.4.3.2 Ispitivanje mogućnosti kontinuirane upotrebe laktaze iz *Aspergillus oryzae* imobilizovane na hidroksiapatitu u sintezi vanilil-galaktozida

Mogućnost kontinuirane upotrebe AOL-HAP je ispitana tokom 10 uzastopnih ciklusa sinteze VG. Eksperiment je ponovljen u triplicatu prema uslovima opisanim u odeljku 4.4.3.2, a rezultati prikazani na slici 3.24 su sa izračunatim greškama merenja.

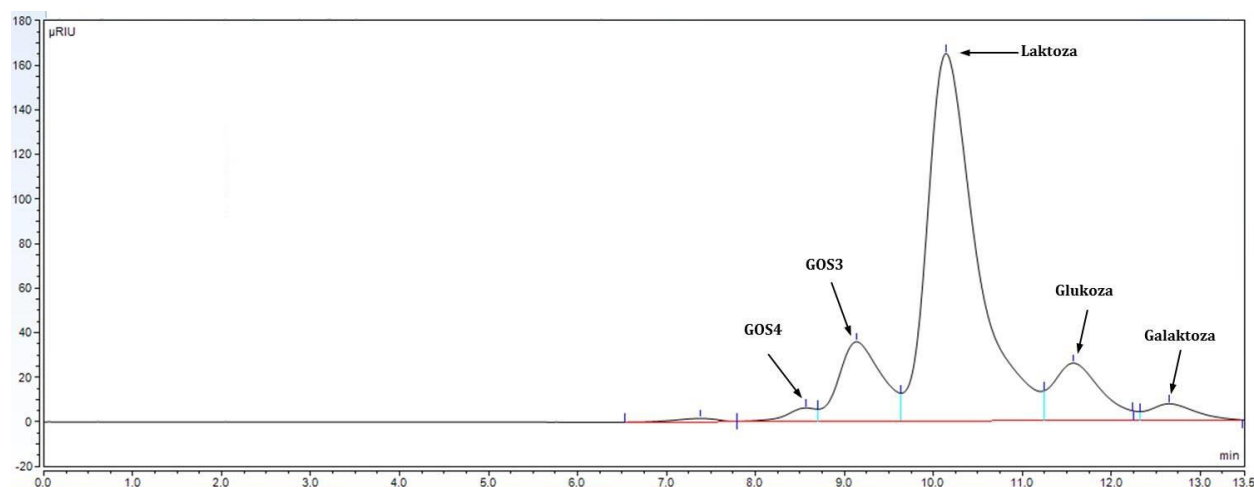


Slika 3.24: Testiranje mogućnosti višestruke upotrebe imobilizovanog preparata laktaze na hidroksiapatitu u sintezi vanilil galaktozida.

Rezultati na slici 3.24 pokazuju da i nakon 10 uzastopnih reakcionih ciklusa (15 h kontinuirane upotrebe) imobilizovani preparat AOL zadržava čak 75 % aktivnosti (u odnosu na prvi ciklus, gde je aktivnost uzeta kao 100 %). Prilikom pretrage literature nisu nađene publikacije posvećene primeni imobilizovane laktaze u sintezi galaktozida aromatičnih alkohola. Jedine dve studije, vezane za sintezu VG i sličnih proizvoda, odnose se na primenu slobodne laktaze i to iz *Kluyveromyces lactis*^{95,99}. Imajući to u vidu, rezultati predstavljeni na slici 3.25, ukazuju na veliki potencijal preparata AOL-HAP u sintezi VG, bilo kao finalnog proizvoda, bilo kao prekursora za dalju sintezu složenijih bioaktivnih supstanci.

3.4.4 Primena laktaze iz *Aspergillus oryzae* u sintezi galakto-oligosaharida

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je bio i da se detaljnije ispita efikasnost imobilizovanog preparata laktaze u sintezi probiotika na bazi GOS. Detalji eksperimentalnog protokola su opisani u odeljku 4.4.4, a hromatografski profil nastalih proizvoda je prikazan na slici 3.25.



Slika 3.25: Efikasnost imobilizovanog preparata laktaze iz *Aspergillus oryzae* na hidroksiapatitu u sintezi galakto-oligosaharida transgalaktozilacijom laktoze.

Sa slike 3.25 se vidi da u primenjenim reakcionim uslovima nastaje smeša tri- i tetra-saharida (GOS3 i GOS4, redom). U kvantitativnom smislu, trisaharidi su dominantni proizvodi tokom transgalaktozilacije, što su potvrdile i dve nezavisne studije Carević i saradnika i Urutije i saradnika^{265,266}. Ukupan prinos dobijenih GOS je 65 g/L (58 g/L GOS3 i

7 g/L GOS4). Predstavljeni rezultat ima dvojak primenjeni značaj, jer se istim enzimom istovremeno hidrolizuje laktoza (nepoželjna komponenta hrane za osobe sa netolerancijom na laktozu) i dobijaju se probiotici, koji imaju blagotvorno dejstvo na sistem organa za varenje. Ostvareni prinos GOS sa AOL-HAP je u dobroj korelaciji sa prinosom kada se koristi AOL enkapsulirana u gelove od polivinil-alkohola (70 g/L GOS)²⁶⁷. Istovremeno, navedeni prinos je znatno bolji od prinosa proizvoda kada se koristi AOL kovalentno imobilizovana na hitozan (45 g/L GOS)²³¹. Za razliku od Gaura i saradnika, kod kojih je transgalaktozilacija trajala 12 sati, u ovom eksperimentu je ista reakcija trajala svega 90 minuta. Naime, poznato je da u slučaju, kada se kao katalizatori tokom transgalaktozilacije koriste glikozid-hidrolaze, prinos reakcije generalno raste do 2 sata reakcije, nakon čega počinje naglo da opada usled pomeranja ravnoteže i sekundarne hidrolize proizvoda²⁶⁵.

Različitim literaturnim navodima je dobro dokumentovano da su reakcije transgalaktozilacije kinetički kontrolisane i da na prinos proizvoda jako utiče koncentracija laktoze u reakcionoj smeši⁹⁵. Potvrđeno je da se znatno bolji rezultati transgalaktozilacije postižu u koncentrovanijim rastvorima laktoze, zbog pomeranja termodinamičke ravnoteže reakcije ka sintezi GOS: sa povećanjem koncentracije laktoze sa 5 % na 40 %, prinos GOS raste gotovo 3 puta²⁶⁸. Dodatno, u koncentrovanijim rastvorima laktoze je slabije izražena kompetitivna inhibicija β -galaktozidaze galaktozom, na šta je posebno osetljiva AOL²⁶⁹. Svi ovi podaci potvrđuje bolju efikasnost AOL-HAP u sintezi GOS, budući da je za tu reakciju korišćen 40 %-ni rastvor laktoze u poređenju sa 20 %-nim, koji su primenili Gaur i saradnici.

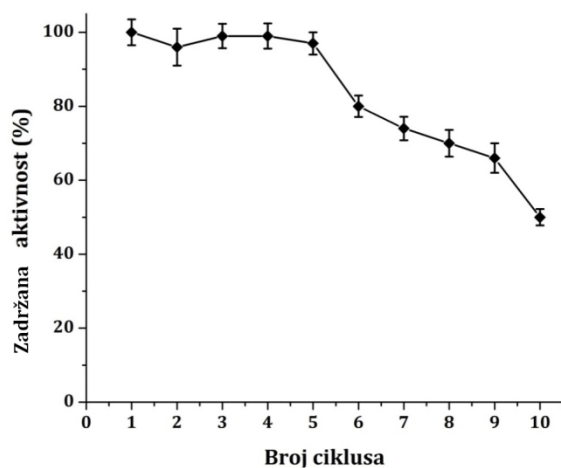
Pored koncentracije laktoze, temperatura je još jedan značajan reakcioni parametar koji diriguje prinos GOS. Pretragom literature je uočeno da je temperaturni opseg transgalaktozilacije širok: od 35 – 50 °C²⁶⁹, što odgovara mezofilnim enzimima, kakva je i laktaza iz ove doktorske disertacije. Međutim, treba imati na umu da je rastvorljivost laktoze na ovim temperaturama ograničena. Kako bi se ovi problemi prevazišli, za transgalaktozilaciju su korišćeni i termofilni organizmi: *Thermotoga maritima* i *Sulfolobus solfataricus*. Dobijeni rezultati su bili protivrečni, jer je prinos GOS u reakciji sa *T. maritima* bio 19 %, dok je u slučaju *S. solfataricus* prinos iznosio 50 %. Dodatno ograničenje

termofilnih organizama je što su retko komercijalno dostupni i nemaju potrebne sanitarne dozvole za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji²⁶⁹. Te činjenice dodatno govore u prilog odabiru laktaze iz ove doktorske disertacije, jer je dobro izučena, komercijalno dostupna i već se uveliko koristi tokom prerade mleka i proizvodnje mlečnih proizvoda.

Visoka efikasnost AOL-HAP u ovako visoko-koncentrovanom rastvoru laktoze, na umereno visokoj temperaturi je od velikog značaja za industrijsku primenu imobilizovanog preparata, jer rad sa visoko-koncentrovanim supstratima sa jedne zbog smanjenja aktiviteta vode pomera ravnotežu ka sintezi ciljnog proizvoda, a istovremeno doprinosi generalnim uštedama u pogledu potrošnje vode i redukcije reakcione zapremine²⁷⁰.

3.4.4.1 Ispitivanje mogućnosti upotrebe imobilizovanog preparata laktaze iz *Aspergillus oryzae* u kontinuiranoj sintezi galakto-oligosaharida

Mogućnost višestruke upotrebe je testirana u 10 uzastopnih ciklusa transgalaktozilacije (odjeljak 4.4.4.1). Eksperiment je ponovljen u triplicatu, a dobijeni rezultati su predstavljeni na slici 3.26.



Slika 3.26: Testiranje mogućnosti višestruke upotrebe imobilizovanog preparata laktaze iz *Aspergillus oryzae* u sintezi galakto-oligosaharida.

Tokom prvih 5 ciklusa transgalaktozilacije, imobilizovana laktaza zadržava nepromenjenu aktivnost u odnosu na prvi ciklus. Nakon petog ciklusa se usled početka desorpcije enzima sa nosača, uočava pad zaostale aktivnosti imobilizata, koja u naredna 3

ciklusa ostaje konstantna (oko 80 %), da bi u poslednjem, desetom ciklusu opala na 50 %. Ovi rezultati su u dobroj korelaciji sa sličnim primerima iz literature. β -Galaktozidaza, zarobljena unutar gelova polivinil-alkohola zadržava 95 % prvobitne aktivnosti nakon sedam uzastopnih ciklusa transgalaktozilacije. Isti enzim iz pomenute studije, zarobljen unutar sol-gel silikatnih struktura, zadržava maksimalno 61 % od prvobitne aktivnosti tokom sedam ciklusa transgalaktozilacije¹⁵³. Feng i saradnici su uočili da isti biokatalizator imobilizovan na kalcijum-alginatu već posle prvog ciklusa gubi čak 80 % prvobitne aktivnosti i da se jedna šarža imobilizovanog enzima može koristiti u najviše četiri uzastopne reakcije²⁷¹. Sa druge strane, Pan i saradnici su zaključili da laktaza, kovalentno imobilizovana na magnetne nanočestice hitozana, zadržava 90 % od početne aktivnosti i nakon 15 uzastopnih ciklusa transgalaktozilacije²⁷².

Nedavna studija Carević i saradnika je pokazala da, prilikom transgalaktozilacije, AOL u najvećoj meri sintetiše GOS u kojima su monosaharidne jedinice vezane β (1 \rightarrow 3) i β (1 \rightarrow 6) glikozidnim vezama. Ovo je od izuzetne važnosti, budući da se najizraženiji probiotički efekat pripisuje upravo ovim strukturnim varijantama galakto-oligosaharida^{101,265,273}. Imajući to saznanje na umu, sama činjenica da se imobilizovani preparat AOL na HAP može, bez značajnijeg pada aktivnosti, koristiti tokom 10 uzastopnih reakcionih ciklusa transgalaktozilacije još dodatno opravdava izbor HAP kao nosača za imobilizaciju i stabilizaciju ovog važnog industrijskog enzima.

3.5 Zaključci

1. Među testiranim hidrolitičkim enzimima za hidroksiapatit se najefikasnije vezuju enzimi sa nižim *pI* vrednostima: lipaza iz *Candida rugosa* (*pI* 4,7) i laktaza iz *Aspergillus oryzae* (*pI* 5,3). U optimalnim reakcionim uslovima oba enzima se gotovo kvantitativno adsorbuju na hidroksiapatit (preko 95 % enzimске aktivnosti se veže za nosač nakon 30 minuta inkubacije), a prinos aktivnosti imobilizovanih enzima iznosi preko 50 %.
2. Metal-koordinatna veza, ostvarena preko interakcija kalcijuma sa hidroksiapatita i karboksilnih grupa proteina je glavni mehanizam adsorpcije lipaze iz *Candida rugosa* i laktaze iz *Aspergillus oryzae* na ovaj nosač. Hidroksiapatit-vezujuće sekvence na oba enzima se nalaze na njihovoj površini i sastoje se iz klastera od oko 10 kiselih aminokiselinskih bočnih ostataka Asp, Glu i karboksilnih grupa na C-terminusu.
3. Najupečatljiviji stabilizacioni efekat imobilizacije u slučaju lipaze iz *Candida rugosa* je uočen u metanolu. Nakon 180 minuta inkubacije imobilizat lipaze iz *Candida rugosa* na hidroksiapatitu zadržava 50 % početne aktivnosti, dok kod slobodnog enzima aktivnost nije detektovana. Ovakav rezultat je prvi put do sada zabeležen u literaturi, jer je metanol poznat kao snažan inhibitor velikog broja industrijski najznačajnijih lipaza. Među nepolarnim organskim rastvaračima, imobilizovana lipaza je bila najstabilnija u *n*-heksanu (35 % zadržane aktivnosti nakon 180 minuta inkubacije).
4. Imobilizacijom laktaze se pospešuje stabilnost ovog enzima na temperaturama preko 50 °C: na 55 °C imobilizat laktaze na hidroksiapatitu zadržava dva puta veću aktivnost u poređenju sa slobodnom laktazom. Na 75 °C stabilizacioni efekat imobilizacije je još izraženiji, jer imobilizat laktaze zadržava gotovo osam puta veću aktivnost nego slobodan enzim.
5. Biokatalitičkim dejstvom lipaza iz *Candida rugosa* su u reakcijama esterifikacije i transesterifikacije kao proizvodi dobijene dve značajne grupe jedinjenja: bioaktivni kapsinoidi i mirisni metil-estri karboksilnih kiselina. U obe reakcije je uočeno da imobilizacija na hidroksiapatitu uzrokuje promenu supstratne specifičnosti lipaze iz

Candida rugosa ka acil-donorima sa kraćim lancem. U slučaju kapsinoida, slobodna lipaza u najvećem prinosu sintetiše estar vanilil-alkohola i laurinske kiseline (C12:0), dok imobilizovana lipaza u najvećem prinosu sintetiše estar vanilil-alkohola i oktanske kiseline (C8:0). U slučaju metil-estara, slobodna lipaza je u najvećem prinosu sintetisala metil-estar butanske kiseline (C4), za razliku od imobilizovane lipaze, koja je u najvećem prinosu sintetisala metil-estar etanske kiseline (C2).

6. Transesterifikacijom kokosovog ulja vanilil-alkoholom u prisustvu slobodne lipaze iz *Candida rugosa*, je ovo, trenutno vrlo popularno prehrambeno ulje, obogaćeno smešom tri kapsinoida: vanilil-oktanoata, vanilil-dekanoata i vanilil-laurata. U istom eksperimentu je pokazano da hidroksiapatit nije pogodan nosač za lipaze, u transformacijama sa vrlo nepolarnim supstratima, kao što su ulja.
7. Katalitička efikasnost imobilizovanog preparata laktaze iz *Aspergillus oryzae* je ispitana tokom transgalaktozilacije vanilil-alkohola i transgalaktozilacije laktoze, u kojima kao proizvodi nastaju vanilil-galaktozid i galakto-oligosaharidni probiotici. Za reakciju transgalaktozilacije su od posebnog značaja bili rezultati temperaturne stabilnosti imobilizovane laktaze na 55 °C, jer je ova temperatura omogućila korišćenje koncentrovanijeg rastvora laktoze, što je pozitivno uticalo na prinos galakto-oligosaharida.
8. Strukturnom karakterizacijom derivata vanilil-alkohola: vanilil-laurata, sintetisanog sa imobilizatom lipaze iz *Candida rugosa* na hidroksiapatitu, i vanilil-galaktozida, sintetisanog sa imobilizatom laktaze iz *Aspergillus oryzae* na hidroksiapatitu, potvrđeno je da oba imobilizata tokom sintetskih reakcija modifikuju vanilil-alkohol isključivo preko benzilne (primarne hidroksilne) grupe.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

UREĐAJI:

- Tehnička vaga Petit Balance MK-500 C (Chyo Calibration)
- Analitička vaga (Mettler Toledo)
- pH-metar PHS-3BW (Bante)
- Mikrotalasna rerna VT-1693 (Vitek)
- Vorteks EV-100 (Tehtnica Železniki)
- Magnetna mešalica HI 190 M (Hanna Instruments)
- Termošejker TS-100 (Biosan)
- Orbitalni šejker sa platformom ES-20 (Biosan)
- Minifuga Minispin (Eppendorf)
- Centrifuga 5430 R (Eppendorf)
- Liofilizator Alpha 2-4 LD plus (Christ)
- Vakuum koncentrador 5301 (Eppendorf)
- Vertikalni sistem za elektroforezu Hoefer SE 600 Ruby (GE Healthcare)
- UV/VIS spektrofotometar Evolution 3000 (Thermofisher Scientific)
- Ultra-mikro kvarcna kiveta, zapremine 200 μ L (Helma Analytics)
- UHPLC sistem Dionex Ultimate 3000 (Thermofischer Scientific)
- HPLC sistem Äkta purifier 10 (GE Healthcare)

- Symmetry C18 analitička kolona za reverzno-faznu HPLC (dimenzije kolone (dužina x unutrašnji prečnik): 150 x 4,6mm; dijametar čestica 5 μm ; dimenzije pora: 100 Å) (Waters)
- Hypersil gold C18 kolona za preparativnu HPLC (dimenzije kolone: 150 x 4,5 mm; dimenzije čestica: 5 μm) (Thermofischer Scientific)
- Hypersil gold C18 kolona za preparativnu HPLC (dimenzije kolone: 250 x 10 mm; dijametar čestica: 5 μm ; dimenzije pora: 175 Å) (Thermofischer Scientific)
- Hyper REZ XP Carbohydrate Ca²⁺ kolona za šećere (dimenzije kolone: 300 x 7,7 mm; dijametar čestica: 8 μm ;) (Thermofischer Scientific)
- RefractoMax detektor na bazi indeksa refrakcije (ERC)
- Dionex RSLC 3000 kuplovan sa LTQ-Orbitrap VELOS masenim spektrometrom (Thermofischer Scientific)
- Dionex Acclaim Pepmap C18 reverzno-fazna kolona za peptide (dimenzije kolone: 15 cm x 75 μm ; dimenzije čestica 2 μm ; dimenzije pora 100 Å)
- HP-INNOWax polietilen-glikolna kapilarna kolona: (dimenzije kolone: 30 m x 0,32 mm; debljina filma: 0,25 μm) (Agilent Technologies)
- Gasni hromatograf opremljen split/splitless injektorom, plameno jonizacionim detektorom i masenim selektivnim detektorom (Agilent 7890A) sa kvadrupolnim analizatorom (Agilent 5975C inert XL EI/CI MSD)
- NMR spektrometar Varian Gemini 2000 (Agilent Technologies)
- NMR spektrometar ADVANCE III (Brucker)
- HPLC-ESI/TOF MS
- Skener CanoScan Lide 110 (Canon)

- Sistem za skenirajuću elektronsku mikroskopiju: uređaj za naparavnje uzoraka zlatom kao provodnikom (BAL-TEC SCD 005 Sputter Coater) i skenirajući elektronski mikroskop (JEOL JSM-6390 LV)

ENZIMI:

- Lipaze iz *Candida rugosa*, tip VII (Sigma)
- Lipaza B iz *Candida antarctica* rekombinantno proizvedena u *Aspergillus niger* (Sigma)
- Lipaza iz *Pseudomonas cepacia* (Sigma)
- Lipaza iz pankreasa svinje, tip II (Sigma)
- Laktaza iz *Aspergillus oryzae* (Sigma)
- β -Glukozidaza iz badema (Sigma)
- Maltaza iz *Saccharomyces cerevisiae*, prečišćena prema protokolu iz ⁷¹
- Invertaza iz *Saccharomyces cerevisiae*, prečišćena prema kombinaciji protokola iz ^{274,275}

4.1 Imobilizacija lipaza i glikozidaza na hidroksiapatit

4.1.1 Odabir lipaze za imobilizaciju na hidroksiapatit

4.1.1.1 Priprema hidroksiapatita

Fosfatni pufer pH 6,8 se pripremi mešanjem 900 mL 0,5 M NaH₂PO₄ (54 g NaH₂PO₄ se rastvori u 800 mL destilovane vode, podesi se pH i dopuni vodom do 900 mL) i 900 mL 0,5 M Na₂HPO₄ (63,9 g Na₂HPO₄ se rastvori u 800 mL destilovane vode, podesi se pH i dopuni se vodom do 900 mL). U njega se pri brzini od 10 mL/min postepeno ukapava ukupno 1,5 L rastvora 0,5 M CaCl₂ uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici i na sobnoj temperaturi (25 °C) (ST). Po dodatku celokupne količine 0,5 M CaCl₂ mešanje se nastavi još sat vremena. Suspenzija se ostavi na ST da se talog slegne, a supernatant (SN) čiji je pH 3,4 se odekantuje. Talog se resuspenduje u 4 L destilovane vode, doda se 1 mL 1 % (v/v) rastvora

fenolftaleina i 1 M amonijaka do stalne ružičaste boje uz neprekidno mešanje na magnetnoj mešalici. Suspenzija se zagreva do ključanja 30 min, uz održavanje ružičaste boje. Kada se suspenzija malo ohladi i slegne se talog, topao (60 °C) SN se odekantuje, a talog se ispere 3-4 puta sa po 3 L destilovane vode. Pripremljeni kristali HAP se čuvaju do upotrebe u frižideru kao 50 %-na suspenzija u 0,005 M Na-fosfatnom puferu pH 6,8 sa dodatkom toluena²⁷⁶.

4.1.1.2 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bredfordu

Reagensi i način pripreme koncentrovanog rastvora boje CBB G-250, su dati u tabeli 4.1²⁷⁴.

Tabela 4.1: Sastav koncentrovanog rastvora boje CBB G-250.

Reagens	Potrebna količina
<i>CBB G-250</i>	100 mg
<i>95 % etanol</i>	50 mL
<i>H₃PO₄</i>	100 mL
<i>Destilovana voda</i>	do 200 mL

Boja se rastvori u etanolu, a zatim se redom dodaju kiselina i voda do konačne zapremine od 200 mL. Radni Bredfordov reagens se dobija mešanjem 100 mL koncentrovanog rastvora boje sa 400 mL destilovane vode. Ovaj rastvor se procedi nekoliko puta na nabranu filter-hartiju (tokom ceđenja se filter-hartija ne menja, niti se dodiruje prstima) do stabilne svetlosmeđe boje. Prilikom ceđenja prvih 20-30 mL rastvora (na 1 L proceđenog rastvora) se odbaci²⁷⁴.

Za konstruisanje standardne prave se u mikrotitar pločici sa ravnim dnom pomeša 0,2 mL radnog rastvora Bredforda sa 0,005 mL standarda BSA (tabela 4.2) za makro metod, odnosno sa 0,020 mL standarda BSA (tabela 4.3) za mikro metod. Za slepu probu (SP) se umesto BSA dodaje destilovana voda. Nakon 5 minuta inkubiranja se ELISA čitaču izmeri apsorbanca na 595 nm (A_{595}) i konstruiše se grafik zavisnosti očitane A_{595} od c (BSA) u mg/mL iz tabela 4.1 i 4.2. Za određivanje koncentracije proteina u uzorku se radni rastvor Bredforda meša sa odgovarajućom zapreminom uzorka, umesto standardnog rastvora BSA.

Linearnom regresionom analizom pomenute zavisnosti se dobijaju jednačine prave, na osnovu kojih se izračunava koncentracija proteina u uzorku.

Tabela 4.2: Priprema standardnih rastvora BSA za Bredfordov makro metod.

Početni rastvor BSA koncentracije 1 mg/mL (μL)	Destilovana voda (μL)	Finalna koncentracija BSA u standardu (mg/mL)
100	900	0,1
250	750	0,25
500	500	0,50
750	250	0,75
1000	0	1

Tabela 4.3: Priprema standardnih rastvora BSA za Bredfordov mikro metod.

Početni rastvor BSA koncentracije 0,1 mg/mL (μL)	Destilovana voda (μL)	Finalna koncentracija BSA u standardu (mg/mL)
100	900	0,01
250	750	0,025
500	500	0,050
750	250	0,075
1000	0	0,1

4.1.1.3 Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti lipaza iz *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* i pankreasa svinje sa *p*-nitrofenil-palmitatom

Supstrat se priprema u 0,1 M Tris puferu (za 1 L pufera se 12,1 g TrisHCl rastvori u destilovanoj vodi, podese se pH na 8,2 i potom se dopuni vodom do 1 L). U 10 mL 0,1 M Tris pufera pH 8,2 se rastvori 0,0159 g *p*NPP; 0,017 g SDS i 1 g Tritona X 100. Finalna koncentracija *p*NPP u ovako pripremljenom rastvoru je 0,0042 M. Rastvor se inkubira 15 minuta u vodenom kupatilu uz povremeno snažno mućkanje dok se supstrat ne rastvori ¹⁹.

Za određivanje hidrolitičke aktivnosti rastvornih lipaza se u 0,2 mL supstrata doda 0,020 mL rastvora enzima. Reakciona smeša se promućka u ultra-mikro kvarcnoj kiveti i na spektrofotometru se u kinetičkom modu na svakih 20 sekundi tokom ukupno 3 minuta prati promena apsorbance na 410 nm (A_{410}). Za određivanje hidrolitičke aktivnosti imobilizovanih lipaza se u 0,2mL supstrata doda 0,010 g vlažnog imobilizovanog preparata lipaza i suspenzija se mućka 3 minuta na ST na termobloku pri intenzitetu mućkanja od 650 tresaka/min. Suspenzija se zatim centrifugira 10 sekundi na minifugi pri maksimalnoj brzini (13400 o/min) na ST. Žuto obojeni SN se odvoji i u njemu se izmeri A_{410} .

Hidrolitička aktivnost rastvornih lipaza i glikozidaza korišćenih u ovoj disertaciji se izračunava prema opštoj formuli:

$$C_e = \frac{\Delta A}{\text{min}} * \frac{V_{rs}}{V_e} * \frac{R}{\epsilon * b}$$

Hidrolitička aktivnost imobilizovanih preparata lipaza i glikozidaza korišćenih u ovoj disertaciji se izračunava prema opštoj formuli:

$$S_p = \frac{A * V_{rs}}{\epsilon * b * t * m}$$

gde su:

C_e – koncentracija enzimske aktivnosti (U/mL); $\frac{\Delta A}{\text{min}}$ - promena apsorbancije na određenoj talasnoj dužini (400 – 415 nm) tokom jednog minuta; V_{rs} – zapremina reakcione smeše; V_e – zapremina enzima; R – razblaženje enzima; ϵ – milimolarni ekstinkcioni koeficijent *p*-nitrofenolata (*p*-NP) čije vrednosti variraju zavisno od uslova eseja; b – širina kivete (1 cm); S_p – specifična aktivnost imobilizovanih lipaza (U/g imobilizovanog preparata lipaza); A – apsorbanca izmerena tokom eseja; t – vreme trajanja eseja; m – masa imobilizovanog preparata dodata u reakcionu smešu za esej.

U uslovima opisanog eseja (pH 8,2), ϵ (*p*NPP) iznosi 13 mL $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ¹⁹. Sređivanjem gornjih izraza se za izračunavanje aktivnosti rastvornih lipaza CRL, PCL i PPL dobija izraz: $C_e = \frac{\Delta A}{\text{min}} * 0,85 * R$ (U/mL rastvora enzima). Analogno tome se aktivnost

imobilizovanih lipaza CRL, PCL i PPL izračunava iz sredehog izraza: $S_p = A_{410} * 0,51$ (U/g imobilizovanog preparata).

Tokom ove doktorske disertacije, jedna jedinica hidrolitičke aktivnosti lipaza ili glikozidaza (U) se definiše kao ona količina enzima koja za 1 min oslobodi 1 μ mol *p*-NP u navedenim uslovima eseja, osim ako nije drugačije navedeno.

4.1.1.4 Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti lipaze B iz *Candida antarctica* sa *p*-nitrofenil-butiratom

U 1 mL dioksana se rastvori 0,0105 g *p*NPB i ovako pripremljeni 0,05 M rastvor supstrata se do upotrebe čuva u frižideru²⁷⁷. Za određivanje hidrolitičke aktivnosti rastvorne CAL B se u 0,1964 mL 0,1 M Tris pufera pH 8,2 doda 0,002 mL rastvora enzima i 0,0016 mL 0,05 M rastvora *p*NPB. Reakciona smeša se kratko promućka u kivetu i zatim se na spektrofotometru u kinetičkom modu na svakih 20 sekundi tokom ukupno 3 minuta prati promena apsorbance na 410 nm (A_{410}). Analogno ovome, aktivnost imobilizovanog preparata CAL B se određuje na sledeći način: u 0,1984 mL 0,1 M Tris pufera pH 8,2 se doda 0,003 g imobilizovanog preparata CAL B i 0,0016 mL 0,05 M štoka *p*NPB. Reakciona smeša se mućka 3 minuta na ST na termobloku pri intenzitetu 650 tresaka/min. Nakon toga se suspenzija centrifugira na minifugi 10 sekundi. SN se odvoji i u njemu se izmeri A_{410} .

Ekstinkcioni koeficijent *p*NP u uslovima opisanog eseja iznosi 13 mL μ mol⁻¹cm⁻¹. Sređivanjem opštih formula iz odeljka 4.1.2.2.1 se za izračunavanje enzimске aktivnosti rastvorne CAL B dobija izraz: $C_e = \frac{\Delta A}{min} * 6,7 * R$ (U/mL rastvora). Po istom principu se za izračunavanje enzimске aktivnosti CAL B imobilizovane na HAP koristi izraz: $S_p = A_{410} * 1,7$ (U/g imobilizovanog preparata). Jedna jedinica hidrolitičke aktivnosti CAL B (U) se definiše kao što je opisano u odeljku 4.1.1.3.

4.1.1.5 Određivanje kapaciteta hidroksiapatita za vezivanje lipaza

Za ekvibraciju nosača se 0,025 g suvog HAP resuspenduje u 1 mL 0,01 M Tris pufera pH 7 (za 1 L ovog pufera se u destilovanoj vodi rastvori 1,2 g TrisHCl. Nakon podešavanja pH zaprema se dopuni vodom do 1 L). Suspenzija se centrifugira 10 minuta u minifugi pri

maksimalnoj brzini. SN se odbaci, a ispiranje sa puferom se ponovi još četiri puta. Svaka od nabrojanih lipaza se rastvori u 0,01 M Tris pH 7, tako da finalna koncentracija preparata bude 60 mg/mL. Dobijeni rastvori se centrifugiraju na minifugi 10 minuta pri maksimalnoj brzini i za dalji rad se koriste bistri supernatanti u kojima je koncentracija proteina merena Bredfordovom metodom (odjeljak 4.1.2.1) iznosila oko 1 mg/mL. Za svaku od lipaza se pripremi serija razblaženja u 0,01 M Tris puferu pH 7. Po 1 mL svakog od pripremljenih razblaženja se pomeša sa ekvilibrisanim HAP, tako da za svaku lipazu opseg mase ponuđenih proteina po jedinici mase suvog nosača iznosi 1 – 60 mg (proteina)/g suvog HAP. Pripremljene suspenzije se inkubiraju na termobloku 30 minuta na ST, pri intenzitetu mućkanja od 650 tresaka/min. Reakcione suspenzije se potom centrifugiraju na minifugi 10 minuta. SN sa frakcijom lipaza koje se nisu vezale za HAP se odvojeni, a imobilizati se isperu tri puta sa po 1,5 mL 0,01 M Tris pufera pH 7. U supernatantima nakon imobilizacije je određena koncentracija proteina i enzimaska aktivnost, dok je u imobilizatima određena samo enzimaska aktivnost.

Rezultati ovog eksperimenta su izraženi preko prinosa imobilizacije (IY) u odnosu na proteine i enzimsku aktivnost i prinosa aktivnosti (AY) lipaza imobilizovanih na HAP. Prinos imobilizacije (IY) je za svaku eksperimentalnu tačku izračunat na osnovu formule:

$$IY (\%) = \frac{(A - B)}{A} * 100$$

Prinos aktivnosti imobilizovanih lipaza (AY) je za svaku eksperimentalnu tačku izračunat na osnovu formule:

$$AY (\%) = \frac{C}{(A - B)} * 100$$

gde je: **A** – količina proteina ili enzimaska aktivnost u polaznom uzorku; **B** – količina proteina ili enzimaska aktivnost u SN nakon imobilizacije; **C** – enzimaska aktivnost imobilizovanih lipaza¹⁹⁸.

4.1.2 Optimizovanje imobilizacije lipaza iz *Candida rugosa* na hidroksiapatit

4.1.2.1 Kinetika adsorpcije lipaza iz *Candida rugosa* na hidroksiapatit

Preparat CRL se rastvori u 0,01 M Tris puferu pH 7, tako da njegova finalna koncentracija iznosi 10 mg/mL. Rastvor enzima se centrifugira i talog odbaci, a 1 mL bistrog SN se pomeša sa ekvilibrisanim HAP. Reakciona smeša se inkubira ukupno tri sata na ST na termobloku, pri intenzitetu mućkanja 650 tresaka/min. Alikvoti RS od po 0,05 mL se uzimaju nakon 0, 5, 15, 30, 60, 120 i 180 minuta. Alikvoti se centrifugiraju na minifugi 10 minuta pri maksimalnoj brzini, talog se odbaci a u SN se odredi enzimaska aktivnost. Rezultat ovog eksperimenta je izražen kao zavisnost % relativne vezane aktivnosti CRL od vremena inkubiranja.

4.1.2.2 Imobilizacija lipaza iz *Candida rugosa* na hidroksiapatit

U 5 mL 0,01 M Tris pufera pH 7 se rastvori 0,050g komercijalnog preparata CRL (finalna koncentracija komercijalnog preparata je 10 mg/mL). Rastvor se centrifugira 20 minuta na ST, pri brzini 4000 o/min. Talog se odbaci, a bistar SN se pomeša sa 0,125 g prethodno ekvilibrisanog HAP. U ovako pripremljenoj RS se na nosač nanese 15 mg (proteina)/g suvog HAP, što je optimalna eksperimentalno određena vrednost (odeljak 4.1.1.5). Reakciona suspenzija se inkubira u optimalnim uslovima: 30 minuta, ST na orbitalnom šejkeru sa platformom na maksimalnom intenzitetu mućkanja od 250 tresaka/min. Po završetku inkubiranja, RS se centrifugira i SN se odbaci, a talog (CRL imobilizovana na HAP) se ispere tri puta sa po 10 mL 0,01 M Tris pufera pH 7. Nakon toga se imobilizat liofilizuje. Specifična aktivnost imobilizovanog preparata CRL nakon sušenja iznosi 3,1 U/g imobilizata.

4.1.3 Odabir glikozidaze za imobilizaciju na hidroksiapatit

4.1.3.1 Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti maltaze iz *Saccharomyces cerevisiae* sa *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranozidom

Za pripremu supstrata se *p*NP α DG rastvori u 0,05 M Na-fosfatnom puferu pH 6,8 koji sadrži 0,001 M (za 1 L ovog rastvora potrebno je: 7,1 g NaH₂PO₄ i 0,078 g β -ME. Nakon

podešavanja željenog pH, zapremina pufera se dopuni destilovanom vodom do 1 L). Finalna koncentracija supstrata u ovom rastvoru je 0,3 mg/mL²⁷⁸. Za određivanje hidrolitičke aktivnosti rastvorne maltaze se u 0,2 mL rastvora supstrata doda 0,01 mL rastvora enzima, RS se promućka i u kinetičkom modu na spektrofotometru se na svakih 20 sekundi tokom ukupno 3 minuta prati promena apsorbance na 405 nm (A_{405}). Za određivanje hidrolitičke aktivnosti imobilizovane maltaze se u 0,2 mL rastvora supstrata bez β -ME doda 0,010 g vlažnog preparata imobilizovane maltaze. RS se inkubira 3 minuta na ST na termobloku, pri intenzitetu mućkanja 650 tresaka/min. Nakon toga se RS centrifugira 10 sekundi na minifugi pri maksimalnoj brzini. Žuti SN se odvoji i u njemu se na spektrofotometru izmeri A_{405} .

Ekstinkcioni koeficijent p NP pri opisanim uslovima eseja iznosi 18,3 mL $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.²⁷⁹ Za izračunavanje enzimске aktivnosti rastvorne i imobilizovane maltaze se koriste opšte formule:

$$C_e = \frac{\Delta A}{\text{min}} * \frac{V_{rs}}{V_e} * \frac{R}{\epsilon * b}, i$$

$$S_p = \frac{A * V_{rs}}{\epsilon * b * t * m}$$

Sređivanjem opšte formule za izračunavanje hidrolitičke aktivnosti slobodnog enzima, dobija se izraz: $C_e = \frac{\Delta A}{\text{min}} * 1,12 * R$ (U/mL rastvora). Po istoj analogiji se enzimska aktivnost imobilizovane maltaze izračunava na osnovu izraza: $S_p = A * 0,36$ (U/g imobilizovanog preparata). Jedna jedinica hidrolitičke aktivnosti maltaze se definiše kao u odeljku 4.1.1.3.

4.1.3.2 Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti β -glukozidaze iz badema sa p -nitrofenil- β -D-glukopiranozidom

Koncentrovani rastvor supstrata se pripremi rastvaranjem p NP β DG u destilovanoj vodi do finalne koncentracije od 0,02 M (za 10 mL ovog rastvora je potrebno 0,06 g p NP β DG). Tokom eseja se 0,5 mL koncentrovanog rastvora supstrata razblaži sa 1 mL 0,1 M acetatnog pufera pH 5 (za 1 L pufera potrebno je 8,2 g anhidrovanog CH_3COONa) i ovaj rastvor se termostatira 5 minuta na 37 °C. Za SP u ovu smešu se doda 2 mL 0,2 M Na_2CO_3

(reagens za prekidanje reakcije), a za određivanje enzimske aktivnosti uzorka se doda 0,5 mL rastvora enzima, odnosno 0,005 g vlažnog imobilizovanog preparata β -glukozidaze. SP i RS se paralelno inkubiraju na 37 °C tačno 15 minuta uz mućkanje intenziteta 650 tresaka/min, nakon čega se u SP dodaje 0,5 mL rastvora enzima, a reakcija u smeši koja sadrži enzim čija se aktivnost meri se stopira dodavanjem 2 mL 0,2 M Na_2CO_3 u RS²⁸⁰. Na spektrofotometru se izmeri apsorbanca na 400 nm (A_{400}) prvo za SP, a potom i za uzorak. Kada se određuje enzimska aktivnost imobilizovane β -glukozidaze, pre merenja A_{400} uzorak se centrifugira 10 sekundi na minifugi i za merenje se koristi bistar, žuto obojeni SN.

U navedenim uslovima eseja ekstinkcioni koeficijent *p*NP iznosi 18,1 mL $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ²⁸⁰. Sređeni izraz za izračunavanje hidrolitičke aktivnosti rastvorne β -glukozidaze ima oblik: $C_e = A * 0,03 * R$ (U/mL rastvora). Sređeni izraz za izračunavanje hidrolitičke aktivnosti imobilizovane β -glukozidaze ima oblik: $S_p = A * 2,94$ (U/g imobilizovanog preparata). Jedna jedinica hidrolitičke aktivnosti β -glukozidaze se definiše kao u odeljku 4.1.1.3.

4.1.3.3 Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti invertaze iz *Saccharomyces cerevisiae* sa saharozom i 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS)

U 1 mL rastvora supstrata se doda 0,1 mL destilovane vode (SP), 0,1 mL rastvora enzima ili 0,003 g imobilizovane invertaze i RS se inkubiraju tačno 5 minuta na ST. Nakon toga se reakcije prekidaju dodatkom 2 mL baznog rastvora DNS i RS se inkubiraju 10 minuta na ključalom vodenom kupatilu. RS se potom ohlade do ST i razblaže se sa 3 mL 0,05 M acetatnog pufera do finalne zapremine od 6,1 mL. Na spektrofotometru se izmeri apsorbanca na 540 nm (A_{540}).

Ekstinkcioni koeficijent *p*NP u uslovima opisanog eseja iznosi 2 mL $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ^{1,281}. Enzimska aktivnost rastvorne invertaze se određuje iz formule $C_e = A * 3,1 * R$ (U/mL rastvora), a enzimska aktivnost imobilizovane invertaze se određuje na osnovu izraza $S_p = A * 101,7$ (U/g imobilizovanog preparata). Jedna jedinica hidrolitičke aktivnosti invertaze se definiše kao ona količina enzima koja za 1 minut oslobodi 1 μmol invertnih šećera iz saharoze u opisanim uslovima eseja²⁸¹.

4.1.3.4 Spektrofotometrijski esej za određivanje hidrolitičke aktivnosti laktaze iz *Aspergillus oryzae* sa *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidom (*o*NP β DG)

Za određivanje aktivnosti rastvorne laktaze se u 0,9 mL rastvora supstrata doda 0,1 mL rastvora enzima, RS se promućka i na spektrofotometru se u kinetičkom modu prati promena apsorbance na 410 nm (A_{410}) na svakih 20 sekundi tokom ukupno 3 minuta¹⁷. Za određivanje hidrolitičke aktivnosti laktaze imobilizovane na HAP se u 2 mL rastvora supstrata doda 0,005 g vlažnog imobilizovanog preparata. RS se inkubira 3 minuta na ST na termobloku, sa intenzitetom mućkanja 650 tresaka/min. Nakon centrifugiranja RS i odbacivanja taloga u žuto obojenom SN se izmeri A_{410} . Ekstinkcioni koeficijent *p*NP u opisanim uslovima eseja je $1,36 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.¹⁷ Hidrolitička aktivnost rastvorne laktaze se izračunava iz izraza $C_e = A * 2,4 * R \text{ (U/mL rastvora)}$. Hidrolitička aktivnost imobilizovane laktaze se izračunava iz izraza $S_p = A * 98 \text{ (U/g imobilizovanog preparata)}$.

4.1.3.5 Određivanje kapaciteta hidroksiapatita za vezivanje glikozidaza

Svaka od glikozidaza, nabrojanih na početku eksperimentalnog dela, rastvori se u 0,01 M fosfatnom puferu pH 6 tako da finalna koncentracija preparata bude 30 mg/mL. Dobijeni rastvori se centrifugiraju i za dalji rad se koriste bistri SN. Koncentracija proteina izmerena u ovako pripremljenim rastvorima je iznosila oko 1 mg/mL. Za svaki od enzima se pripremi serija razblaženja u 0,01 M fosfatnom puferu pH 6. Po 1 mL svakog od ovih razblaženja se pomeša sa ekvilibrisanim matriksom, tako da za svaku glikozidazu opseg mase ponuđenih proteina po jedinici mase suvog nosača iznosi 0,4 – 50 mg (proteina)/g suvog HAP. Reakcije suspenzije se tretiraju kao što je opisano za lipaze. Po završetku imobilizacije, suspenzije se centrifugiraju, SN sa frakcijom enzima koji se nije vezao za HAP se odvoje, a talozi koji sadrže imobilizovani enzim se isperu tri puta sa po 1,5 mL 0,01 M fosfatnog pufera pH 6. Prinos imobilizacije izražen preko proteina i enzimske aktivnosti, kao i prinos aktivnosti za svaku testiranu glikozidazu su izračunati kao što je opisano za lipaze.

4.1.4 Imobilizacija laktaze iz *Aspergillus oryzae* na hidroksiapatit

U 5 mL 0,01 M fosfatnog pufera pH 6 se rastvori 0,050 g preparata AOL, tako da finalna koncentracija preparata iznosi 10 mg/mL. Rastvor se centrifugira 20 minuta na ST

pri brzini 4000 o/min u centrifugi i za dalji rad se koristi bistar SN. Ekvilibrisani HAP (0,125 g suve mase) se pomeša sa rastvorom enzima. U ovim uslovima se na HAP nanese 10 mg (proteina)/g suvog nosača, što je eksperimentalno određena optimalna vrednost. Suspenzija se inkubira u optimalnim uslovima: 30 minuta na ST, pri maksimalnoj brzini mućkanja (250 o/min). Po završetku reakcije, RS se centrifugira, SN se odbaci, a talog (imobilizovani preparat AOL na HAP) ispere tri puta sa po 10 mL 0,01 M fosfatnog pufera pH 6. Specifična aktivnost preparata AOL imobilizovane na HAP, je iznosila 0,1 U/mg vlažne mase imobilizata.

4.2 Proučavanje mehanizma interakcija između imobilizovanih enzima i hidroksiapatita

4.2.1 Morfološka analiza enzima imobilizovanih na hidroksiapatit skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Hidroksiapatit bez enzima, imobilizat CRL i imobilizat AOL su snimljeni skenirajućim elektronskim mikroskopom u cilju detaljnije morfološke analize. Neposredno pre snimanja SEM, sva tri uzorka su liofilizovani. Pojedinačni uzorci su naneti na metalne test-pločice pomoću dvostruko lepljive trake i zatim obloženi zlatom u BAL-TEC SCD 005 Sputter Coater uređaju za naparavanje uzorka slojem provodnika. Oblaganje uzoraka zlatom je trajalo 100 sekundi, na 30 mA. SEM mikrografije su snimljene na naponu od 15 mV, sa uveličanjem 10000 x.

4.2.2 Ispitivanje uslova elucije lipaza iz *Candida rugosa* sa hidroksiapatita

Za ispitivanje efekta Na^+ i Ca^{2+} na eluciju CRL sa HAP, pripremi se serija 0,01 M Tris pufera pH 7 sa opsegom $c(\text{Na}^+)$ i $c(\text{Ca}^{2+})$ od 0 – 2 M. Za ispitivanje uticaja fosfatnih jona na eluciju CRL sa HAP se koristi serija fosfatnih pufera sa opsegom jonske sile fosfata od 0,005 – 2 M. Po 0,05 g imobilizovanog preparata CRL na HAP se inkubira u 0,5 mL pripremljenih rastvora 30 minuta na ST na termobloku, pri intenzitetu mućkanja 1000 tresaka/min. Nakon toga se suspenzije centrifugiraju 10 minuta u minifugi na maksimalnoj brzini i SN se odvoji od taloga. U SN se odredi enzimsko aktivnost. Rezultati su izraženi kao relativni % elucije u odnosu na početnu aktivnost imobilizovanog preparata (uzeto je da iznosi 100 %).

4.2.3 Identifikacija funkcionalnih grupa uključenih u interakcije lipaza iz *Candida rugosa* i hidroksiapatita

4.2.3.1 Reduktivno metilovanje amino-grupa CRL sa NaBH₄ i form-aldehidom

U 10 mL 0,2 M natrijum-boratnog pufera pH 8,5 se rastvori (za 10 mL boratnog pufera je potrebno 0,76 g Na₂B₄O₇ * 10 H₂O) 0,1 g komercijalnog preparata CRL (c (preparata) u rastvoru je 10 mg/mL, što odgovara c (proteina) od 2 mg/mL, mereno Bredfordovim esejom). Ovaj rastvor se pre rada centrifugira i u daljem protokolu se koristi bistar SN. Form-aldehid i NaBH₄ se dodaju u ukupno 6 etapa da bi se smanjila mogućnost denaturacije proteina, nakon čega se protein inkubira na 0 °C. Tokom jedne etape na svaki mL rastvora proteina se dodaje 0,15 mL 1 M form-aldehida i 0,030 mL 1 M NaBH₄ uz intenzivno mešanje na magnetnoj mešalici na 0 °C. Nakon 10 minuta se doda još 0,015 mL 1 M NaBH₄ uz neprekidno mešanje. Rastvor se potom inkubira 20 minuta u ledenom kupatilu uz mešanje, a zatim se ciklus dodavanja modifikatora ponovi još 5 puta. Ukoliko tokom modifikacije rastvor počne da peni može se dodati nekoliko kapi oktanol zasićenog vodom. Nakon šeste etape u dodavanju modifikatora, rastvor proteina se inkubira 30 minuta na ledu i na kraju mu se doda 0,030 mL 1 M NaBH₄ po mL rastvora. Rastvor se inkubira još sat vremena na ledu, nakon čega se protein taloži dodatkom ukupno 5,23 g čvrstog AS²¹³. Talog koji sadrži modifikovani protein se odvoji od ostatka rastvora centrifugiranjem i resuspenduje se u 4 mL 0,01 M Tris pufera pH 7. AS se iz rastvora uklanja dijalizom naspram 0,01 M Tris pufera pH 7 preko noći na 4 °C. Nakon dijalize u rastvoru se proveriti enzimski aktivnost. Modifikovani enzim se imobilizuje na HAP kako bi se ispitao uticaj modifikacije na vezivanje CRL za nosač. Enzimski aktivnost SN nakon imobilizacije modifikovanog enzima se uporedi sa enzimskom aktivnošću u SN nakon imobilizacije nemođifikovane kontrole, pripremljene u istim uslovima i rezultati su predstavljeni kao relativni % enzimski aktivnosti koja se nije vezala za nosač.

4.2.3.2 Hemijska modifikacija amino-grupa lipaza iz *Candida rugosa* sa anhidridom maleinske kiseline

CRL se pripremi rastvaranjem u 0,1 M boratnom puferu pH 8 (za 10 mL pufera potrebno je 0,38 g Na₂B₄O₇ * 10 H₂O) isto kao što je opisano u prethodnom odeljku.

Modifikacija se odvija na ST uz postepeno dodavanje čvrstog anhidrida maleinske kiseline (ukupno 0,012 g modifikatora je raspoređeno u jednake porcije od po 0,004 g koje su dodavane rastvoru proteina na svakih 30 minuta, uz neprekidno mešanje na magnetnoj mešalici). Po potrebi se pH rastvora održava na 8 dodatkom 2 M NaOH. Po dodatku celokupne količine modifikatora, rastvor se inkubira sat vremena na ledu, a zatim dijalizuje preko noći naspram 0,010 M Tris pufera pH 7 ²¹⁴. Nakon dijalize, proveriti se enzimska aktivnost modifikovanog enzima, a efekat modifikacije na interakcije CRL sa HAP se ispituje imobilizacijom modifikovanog enzima pod optimalnim uslovima. Enzimska aktivnost SN nakon imobilizacije modifikovanog enzima se uporedi sa enzimskom aktivnošću u SN nakon imobilizacije nemodifikovane kontrole, pripremljene u istim uslovima. Rezultati su izraženi kao relativni % enzimске aktivnosti koja se nije vezala za nosač.

4.2.3.3 Uticaj egzogenih karboksilnih grupa na interakcije lipaza iz *Candida rugosa* i hidroksiapatita

CRL se rastvori u 0,01 M Tris puferu pH 7 koji sadrži 0,5 M citrat tako da c (preparata CRL) iznosi 5 mg/mL, što odgovara c (proteina) od 1 mg/mL ²¹⁵. Ovaj uzorak se potom imobilizuje na HAP. Nakon imobilizacije i centrifugiranja se u SN izmeri enzimska aktivnost. Enzimska aktivnost SN nakon imobilizacije modifikovanog enzima se uporedi sa enzimskom aktivnošću u SN nakon imobilizacije nemodifikovane kontrole, pripremljene u istim uslovima. Rezultati su izraženi kao relativni % enzimске aktivnosti koja se nije vezala za nosač.

4.2.3.4 Hemijska modifikacija karboksilnih grupa lipaza iz *Candida rugosa* sa 1-etil-(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimidom (EDAC)

U 10 mL 1 M etilen-diamina se rastvori 0,05 g komercijalnog preparata CRL (c (preparata) = 5 mg/mL; c (proteina) = 1 mg/mL). Rastvor se centrifugira i talog se odbaci, a pH u SN se podesi na 4,75. Nakon toga se u rastvor doda EDAC do finalne koncentracije 0,1 M. pH reakcione smeše se proveriti i po potrebi podesi na 4,75. RS se inkubira 90 minuta na ST uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici. Po završetku inkubiranja, rastvor se dijalizuje preko noći naspram 0,001 M fosfatnog pufera pH 7 na 4 °C. Modifikovani enzim se potom u optimalnim uslovima imobilizuje na HAP. Enzimska aktivnost SN nakon

imobilizacije modifikovanog enzima se uporedi sa enzimskom aktivnošću u SN nakon imobilizacije nemodifikovane kontrole, pripremljene u istim uslovima. Rezultati eksperimenta su izraženi kao relativni % enzimске aktivnosti koja se nije vezala za nosač.

4.2.4 Ispitivanje specifičnosti hidroksiapatita prema izoformama lipaza iz *Candida rugosa*

4.2.4.1 Denaturišuća natrijum dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Rastvori potrebni za SDS-PAGE su dati u tabelama 4.4 do 4.6 ²⁷⁴.

Tabela 4.4: Sastav rastvora monomera .

Reagens	Količina
<i>Akrilamid (AA)</i>	58,4 g
<i>bis-akrilamid (bis-AA)</i>	1,6 g
<i>Destilovana voda</i>	200 mL

Tabela 4.5: Sastav pufera za uzorke .

Reagens	V (mL) za 25 mL 5 x koncentrovanog rastvora
<i>0,5 M Tris pH 6,8</i>	3,00
<i>99 % (v/v) glicerol</i>	12,50
<i>10 % (w/v) SDS</i>	5,00
<i>1 % (w/v) brom fenol plavo (BFP)</i>	2,50
<i>β-merkptoetanol (β-ME)</i>	1,25
<i>Voda</i>	Do 25 mL

Tabela 4.6: Sastav pufera za elektroforezu.

Reagens	Količina potrebna za 10 x koncentrovani pufer
<i>Tris</i>	30 g
<i>Glicin (Gly)</i>	144 g
10 % (w/v) SDS	100 mL
<i>Destilovana voda</i>	Do 1 L

Elektroforetska razdvajanja, opisana u ovoj disertaciji su izvedena u diskontinualnom sistemu, sastavljenom od 12 % gela za razdvajanje i 4 % gela za koncentrovanje. Procedura za pripremanje i sastav korišćenih gelova su opisani u tabeli 4.7²⁷⁴.

Tabela 4.7: Priprema gelova za elektroforetsko razdvajanje.

Reagens	4 % gel za koncentrovanje	12 % gel za razdvajanje
<i>Rastvor monomera</i>	0,4 mL	4 mL
<i>Tris pH 8,8</i>	/	2,5 mL
<i>Tris pH 6,8</i>	0,75 mL	/
<i>Destilovana voda</i>	1,8 mL	3,33 mL
<i>TEMED</i>	8 µL	4 µL
10 % (w/v) SDS	30 µL	100 µL
<i>APS</i>	15 µL	75 µL
Ukupna zapremina (mL)	3	10

Elektroforeza se izvodi u vertikalnom sistemu za elektroforezu Hoeffer SE 600 Ruby, u skladu sa uputstvima proizvođača, a prema originalnoj proceduri koju je predložio Lemli²⁸². Između ploča se prvo sipa dezaerisani rastvor gela za razdvajanje, koji se nadsloji sa *n*-butanolom zasićenim vodom. Kada gel za razdvajanje polimerizuje, *n*-butanol se odlije i gel se dobro ispere destilovanom vodom. Nakon toga se višak vode ukloni filter-hartijom, nalije se gel za koncentrovanje i namesti se teflonski češalj. Prilikom postavljanja češlja mora se voditi računa da ne dođe do stvaranja mehurova. Kada i gel za koncentrovanje

polimerizuje češalj se ukloni, a formirani bunari se isperu destilovanom vodom i napune 1xPZE.

Uzorci za SDS-PAGE su pripremljeni mešanjem 5 x koncentrovanog PUZ i uzorka u zapreminskom odnosu 1:5 i inkubirani su 5 minuta na 95 °C bez mućkanja na termobloku. Nakon toga se pomoću mikrošprica nanose u bunare gela, pazeći da se bunari ne probuše vrhom igle. U rezervoar za pufer i kadu za elektroforezu se sipa 1 x PZE (dobija se kada se štok ovog pufera neposredno pre rada razblaži 10 x sa destilovanom vodom). Tokom kretanja uzoraka kroz gel za koncentrovanje, voltaža je održavana konstantnom na vrednosti od 80 V, a prilikom ulaska u gel za razdvajanje je pojačana na 150 V i na toj vrednosti održavana do kraja elektroforeze. Kada boja dođe do 1 cm od donje ivice gela, elektroforeza se prekida, a gel se dalje boji CBB-om.

Procedura za bojenje gelova CBB-om je prikazana u tabeli 4.8 ²⁷⁴.

Tabela 4.8: Redosled koraka tokom bojenja gelova CBB.		
Rastvor	Komponente rastvora	Trajanja inkubiranja (min)
<i>Destilovana voda</i>	/	1 min
<i>Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje</i>	50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina	20
<i>Rastvor boje</i>	0,1 % CBB, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina	20
<i>Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje</i>	50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina	20
<i>Rastvor za obezbojavanje</i>	5 % metanol, 7 % sirćetna kiselina	Preko noći

Odmah nakon bojenja gelovi se skeniraju pomoću CanoScan Lide 110 skenera, radi dalje obrade podataka i analize.

4.2.4.2 Elektroforeza na gradijentnom gelu

Priprema uzoraka je identična kao za SDS-PAGE. Za elektroforetsku analizu se koristi komercijalni Novex NuPage 4 – 12 %-ni gradijentni gel (debljine 1,5 mm; 8 x 8 cm). Kao

PZE se koristi MES. Elektroforetsko razdvajanje traje 50 minuta pri konstantnoj voltaži od 200 V ²⁸³. Gel se boji prema Invitrogen Colloidal Blue staining protokolu. Komponente rastvora u kome se gel fiksira i rastvora za bojenje su date u tabelama 4.9 i 4.10²⁸⁴.

Tabela 4.9: Sastav rastvora za fiksiranje.

Reagens	V (mL) za fiksiranje jednog gela
<i>Destilovana voda</i>	40
<i>Metanol</i>	50
<i>Sirćetna kiselina</i>	10

Tabela 4.10: Sastav rastvora boje.

Reagens	V (mL) za bojenje jednog gela
<i>Destilovana voda</i>	55
<i>Metanol</i>	20
<i>Rastvor B iz kita (sastav nije definisan)</i>	5
<i>Rastvor A iz kita (sadrži AS i H₃PO₄)</i>	20

Redosled koraka i trajanje inkubiranja gela u različitim rastvorima tokom bojenja su dati u tabeli 4.11.

Tabela 4.11: Redosled koraka tokom bojenja gradijentnog gela.

Reagens	Trajanje inkubiranja (min)
<i>Rastvor za fiksiranje (tabela 4.10)</i>	10
<i>Rastvor za bojenje bez komponente B (tabela 4.10)</i>	10
<i>Rastvor za bojenje sa dodatkom komponente B (tabela 4.10)</i>	3-12 sati
<i>Destilovana voda</i>	7 sati
<i>20 %-ni AS</i>	Za dugotrajno čuvanje gelova

4.2.4.3 Poređenje profila izoformi lipaza u komercijalnom i imobilizovanom preparatu lipaza iz *Candida rugosa* tehnikom LC-MS/MS

Preparat CRL se rastvori u 0,01 M Tris puferu pH 7 tako da je finalna koncentracija preparata 5 mg/mL. Odmah nakon imobilizacije, imobilizovani preparat CRL se inkubira preko noći na ST u 1 M HCl, radi hidrolize HAP. Dobijeni bistar rastvor se preko noći dijalizuje naspram destilovane vode na 4 °C. Uzorci se pripremaju za SDS-PAGE, kao što je opisano u odeljku 4.2.4.1. Nakon elektroforetskog razdvajanja i bojenja gelova po proceduri iz tabele 4.8, proteinske trake koje po molekularnoj masi odgovaraju CRL se iseku iz gela i usitne, a peptidni fragmenti za masenu analizu se dobijaju tripsinskom digestijom (tabela 4.12) ²⁸⁵. Ukoliko se ne analiziraju odmah, dobijeni peptidni fragmenti se do analize čuvaju na -20 °C.

Tabela 4.12: Tripsinska digestija uzoraka CRL za masenu analizu.

Reagens	Trajanje inkubiranja
25 mM NH₄HCO₃	Ispiranje
10 mM DTT	1 sat na 57 °C
50 mM jodacetamid	45 minuta na ST
25 mM NH₄HCO₃	Ispiranje
Tripsin	Preko noći na 37 °C

Za MS peptidnih fragmenata se koristi platforma za strukturnu biologiju i biopolimere na INRA institutu iz Nanta. Peptidi se razdvajaju i analiziraju u sistemu za kapilarnu tečnu hromatografiju u tandemu sa HR MS (LC-MS/MS) Dionex RSLC 3000 kuplovanim sa LTQ-Orbitrap VELOS masenim spektrometrom. Za hromatografsko razdvajanje peptida se koristi Dionex reverzno-fazna kolona za kapilarnu hromatografiju Acclaim Pepmap C18. Peptidi dobijeni tripsinskom digestijom se eluiraju sa kolone u linearnom gradijentu 4 – 50 % rastvarača B tokom 28 minuta. Za pretragu i analizu masa peptidnih fragmenata se koristi Xcalibur softver (verzija 2.1). Potpuni MS skenovi su dobijeni u visokoj rezoluciji (FWMH 30 000) u Orbitrap analizatoru sa opsegom odnosa masa/naelektrisanje (m/z) 400 – 2000. CID spektri su snimljeni za pet najintenzivnijih jona iz LTQ trapa. Rezultati u mgf formatu su analizirani u MASCOT serveru (verzija 2.2) (Matrix Science)²⁸⁶. MS i MS/MS

spektri su upoređeni sa UniProt bazom podataka (pretraga ograničena na taksonomiju gljiva u verziji od 01.09.2013.) i SwissProt bazom podataka (neograničena pretraga da se proverí eventualna kontaminacija uzorka keratinom i/ili tripsinom). Najbolja preklapanja iz dve baze podataka su dalje validirana. U obzir su uzimani proteini kod kojih su poklopljene sekvence minimalno dva peptida sa pojedinačnim MASCOT skorom 34 za komercijalni preparat CRL, odnosno 35 za imobilizovani preparat CRL. Peptidni skorovi za koje je $p < 0,05$ definisano MASCOT programom.

4.2.5 Identifikacija hidroksiapatit-vezujuće sekvence na izoformi 1 lipaze iz *Candida rugosa* molekulskim modelovanjem

Za molekulsko modelovanje interakcija CRL i HAP se koriste 3 D strukture izoforme 1 lipaze iz *C. rugosa* u otvorenoj i zatvorenoj konformaciji. Ove strukture su dobijene difrakcijom X-zraka i dostupne su preko *Protein Data Bank* (PDB) platforme. Oznaka izoforme 1 lipaze iz *C. rugosa* u otvorenoj konformaciji u PDB bazi je 1CRL, a oznaka istog enzima u zatvorenoj konformaciji u PDB bazi je 1 TRH^{219,220}. U programu VegaZZ (verzija 3.0.5) se obe strukture provere na eventualne propuštene aminokiseline (AK) (*eng.* missing residues) i uklone se molekuli vode²⁸⁷. Polja molekulskih interakcija (*eng.* Molecular Interaction Fields – MIF) su izračunata u GRID 22 b, korišćenjem Ca^{2+} probe^{222,288}. Na ovaj način je proverena celokupna površina proteina u obe konformacije, pri rezoluciji od 0,5 Å. Tokom proračuna se smatra da su bočni lanci proteina fleksibilni. Rezultati proračuna su predstavljeni u PyMol programu (verzija 1.7) ²⁸⁹. Strukture 1 CRL i 1TRH su poravnate i upoređene u Dali web serveru²⁹⁰.

4.2.6 Ispitivanje uslova elucije laktaze iz *Aspergillus oryzae* sa hidroksiapatita

Elucija AOL sa HAP je ispitana u prisustvu 1 M NaCl u 0,01 M fosfatnom puferu pH 6, 1 M $CaCl_2$ u 0,01 M fosfatnom puferu pH 6 i 1 M fosfatnom puferu pH 6. Po 0,050 g imobilizovanog preparata AOL na HAP (odeljak 4.1.5) se resuspenduje u 1 mL svakog od testiranih rastvora. Smeše se inkubiraju sat vremena na termobloku na ST pri intenzitetu mućkanja 650 tresaka/min. Nakon inkubiranja i centrifugiranja smeša, u dobijenim bistrim SN se izmeri koncentracija proteina i enzimaska aktivnost. Rezultati su predstavljeni kao

relativni stepen elucije u poređenju sa početnom enzimskom aktivnošću (uzeta kao 100 %).

4.2.7 Identifikacija hidroksiapatit-vezujuće sekvence na laktazi iz *Aspergillus oryzae*

Za identifikaciju HAP-vezujuće sekvence na laktazi iz *Aspergillus oryzae* korišćeni su podaci dobijeni iz UniProt i Protein Data Banka baza podataka. UniProt baza podataka je korišćena za informacije o primarnoj sekvenci proteina, pretragom preko pristupnog broja za laktazu iz *Aspergillus oryzae* B7VU80. Podaci o trodimenzionalnoj strukturi enzima dobijeni su iz Protein Data Bank, pretragom preko broja 4 IUG za pomenuti enzim. Protein Data Bank pristupni broj se odnosi na laktazu iz *Aspergillus oryzae*, rekombinantno proizvedenu u *Kluyveromyces lactis*. Trodimenzionalna struktura enzima je određena metodom rasejanja X-zraka, pri rezoluciji 2,6 Å (0,26 nm)⁸³.

4.3 Efekat imobilizacije na stabilnost enzima imobilizovanih na hidroksiapatit

4.3.1 Ispitivanje temperaturne stabilnosti lipaza iz *Candida rugosa* imobilizovanih na hidroksiapatitu

Imobilizovani preparat se resuspenduje u minimalnoj zapremini 0,01 M Tris pufera pH 7 i zatim se dva uzorka CRL paralelno inkubiraju na termobloku po tri sata na 60, 65 i 70 °C. Nakon 0, 5, 10, 30, 60, 120 i 180 minuta se uzimaju alikvoti od po 0,05mL iz uzorka rastvornog enzima, odnosno po 0,005 g iz uzorka imobilizovanog enzima. U alikvotima se izmeri hidrolitička aktivnost CRL. Rezultati su prikazani kao relativni % zadržane aktivnosti rastvorne, odnosno imobilizovane CRL u različitim vremenskim tačkama, u poređenju sa enzimskom aktivnošću u početku inkubiranja na određenoj temperaturi koja je uzeta kao 100 %.

4.3.2 Ispitivanje temperaturne stabilnosti laktaze iz *Aspergillus oryzae* imobilizovane na hidroksiapatitu

Po 1,5 mL rastvora komercijalnog preparata AOL (odeljak 4.1.5), odnosno 0,02 g imobilizovanog preparata AOL na HAP se inkubira ukupno tri sata na 40, 55 i 65 °C. Nakon

0, 10, 20, 30, 60, 120 i 180 minuta se uzmu alikvoti od po 0,05 mL rastvorne AOL, odnosno skloni se po 1 ependorf sa imobilizovanom AOL. Uzorci se do merenja enzimske aktivnosti čuvaju na ledu. Rezultati su predstavljeni kao relativni % zadržane hidrolitičke aktivnosti na određenoj temperaturi nakon određenog vremena inkubiranja u odnosu na aktivnost u početku inkubiranja (koja je uzeta kao 100 %).

4.3.3 Uticaj organskih rastvarača na stabilnost i aktivnost lipaza iz *Candida rugosa* imobilizovanih na hidroksiapatitu

Stabilnost i aktivnost preparata CRL su testirani u organskim rastvaračima (OR) različite strukture i polarnosti. Od polarnih OR korišćeni su aceton, acetonitril, metanol, etanol i 2-propanol. Od nepolarnih OR korišćeni su *n*-heksan, metilen-hlorid, hloroform, ugljen-tetrahlorid, petrol-etar.

4.3.3.1 Stabilnost lipaza iz *Candida rugosa* u organskim rastvaračima

Za ispitivanje stabilnosti po 0,05mL rastvora CRL ili 0,05 g imobilizovanog preparata CRL na HAP se pomeša sa 0,95mL svakog od testiranih OR. Koncentracija OR u ovako pripremljenim reakcionim smešama je 950 mL/L¹⁹. Reakcione smeše se inkubiraju na ST na termošejkeru ukupno 3 sata, pri intenzitetu mućkanja 650 tresaka/min. Kako bi se ispitala kinetika inaktivacije enzima u svakom od testiranih OR, alikvoti RS su uzeti nakon 0, 30 i 180 minuta inkubiranja i u njima je određena enzimska aktivnost. Rezultati su predstavljeni kao relativni % zadržane aktivnosti rastvorne ili imobilizovane CRL nakon različitih vremena inkubiranja u poređenju sa aktivnošću u početku inkubiranja koja je uzeta kao 100 %.

4.3.3.2 Aktivnost lipaza iz *Candida rugosa* u organskim rastvaračima

Aktivnost preparata CRL je ispitana u istim OR kao u prethodnom odeljku. U svakom od testiranih OR se rastvori supstrat za CRL (*p*NPP), tako da mu je finalna koncentracija u rastvoru 0,0042 M¹⁹. U 0,95mL rastvora supstrata u OR se doda po 0,1mL rastvorne CRL, odnosno 0,05 g imobilizovanog preparata CRL i RS se inkubiraju ukupno 3 sata na ST. Po završetku inkubiranja odvoje se organski faze i rastvarač se upari do suva (sat vremena na 45 °C) na *speed vac*-u. Suvi ostatak se resuspenduje u 0,95mL 0,1M Tris pufera pH 8,2 i enzimska aktivnost se izmeri na način opisan u odeljku 4.1.2.2.1. Rezultati su izraženi kao

specifična aktivnost preparata CRL (U/mg proteina) za svaki od testiranih organskih rastvarača.

4.3.4 Stabilnost lipaza iz *Candida rugosa* imobilizovanih na hidroksiapatitu tokom kontinuirane hidrolize *p*-nitrofenil-palmitata

Tokom jednog reakcionog ciklusa se pomeša 0,05 g imobilizovanog preparata CRL na HAP sa 0,5 mL rastvora *p*NPP i 0,5 mL 0,1 M Tris pufera pH 8,2. RS se inkubira 3 minuta na ST na termobloku pri intenzitetu mućkanja 650 tresaka/min. RS se potom centrifugira na minifugi 10 sekundi. Žuto obojeni SN se odvoji i ostavi na ledu do merenja A_{410} , a talog se ispere tri puta sa po 1,5 mL 0,01 M Tris pufera pH 7 i doda mu se nova porcija supstrata. Ukupno je urađeno 10 uzastopnih ciklusa hidrolize *p*NPP sa istom šaržom imobilizata. Rezultati su izraženi kao relativni % zadržane hidrolitičke aktivnosti u odnosu na aktivnost izmerenu u prvom ciklusu koja je uzeta kao 100 %.

4.3.5 Uticaj acetilovanja na stabilnost lipaza iz *Candida rugosa*

4.3.5.1 Acetilovanje lipaza iz *Candida rugosa* sa anhidridom sirćetne kiseline

Komercijalni preparat CRL se rastvori u 3 mL 0,5 M NH_4HCO_3 pufera pH 7 (za 10 mL pufera je potrebno 0,4 g NH_4HCO_3), tako da finalna c (preparata) iznosi 10 mg/mL, što odgovara c (proteina) od 2 mg/mL prema Bredfordovom eseju. Modifikacija se odvija na ST dodatkom ukupno 1 mL anhidrida sirćetne kiseline u jednakim porcijama na svakih 5 minuta tokom ukupno 30 minuta uz neprestano mešanje rastvora na magnetnoj mešalici²⁹¹. Višak modifikatora je uklonjen dijalizovanjem rastvora CRL naspram 0,01 M NH_4HCO_3 preko noći na 4 °C. Efekat acetilovanja CRL je ispitan imobilizacijom modifikovanog enzima na HAP u optimalnim uslovima. Paralelno sa imobilizacijom modifikovanog enzima je na HAP imobilizovana i nemođifikovana CRL kao kontrola. Rezultati su predstavljeni kao prinos imobilizacije po proteinima i enzimskoj aktivnosti i prinos aktivnosti imobilizovane CRL u odnosu na nemođifikovanu kontrolu.

4.3.5.2 Uticaj acetilovanja na temperaturnu stabilnost lipaza iz *Candida rugosa*

Efekat acetilovanja je ispitan i za rastvoran i za imobilizovan enzim, inkubacijom ovih preparata i odgovarajućih kontrola na 60 °C. Rezultati su predstavljeni kao % zadržane

aktivnosti modifikovanih uzoraka u poređenju sa odgovarajućim kontrolama na ispitanoj reakcionoj temperaturi.

4.3.5.3 Uticaj acetilovanja na stabilnost lipaza iz *Candida rugosa* imobilizovanih na hidroksiapatitu tokom kontinuirane hidrolize *p*-nitrofenil-palmitata

Rastvorni i imobilizovani preparati nemodifikovane kontrole i modifikovanih uzoraka CRL su testirani u identičnim uslovima iz odeljka 4.3.4. Ista šarža svakog od uzoraka je testirana u ukupno 10 reakcionih ciklusa hidrolize *p*NPP. Rezultati ovog eksperimenta su predstavljeni kao % zadržane aktivnosti modifikovanih uzoraka i odgovarajućih kontrola u odnosu na aktivnost iz prvog reakcionog ciklusa, koja je uzeta kao 100 %.

4.4 Primena enzima imobilizovanih na hidroksiapatitu u nevodnim reakcionim sistemima

4.4.1 Primena lipaza iz *Candida rugosa* u sintezi kapsinoida

4.4.1.1 Ispitivanje supstratne specifičnosti lipaza iz *Candida rugosa* prema masnim kiselinama tokom esterifikacije vanilil-alkohola

Vanilil-alkohol je pripremljen redukcijom vanilina sa NaBH₄. U 150 mL metanola se rastvori 6,4 g vanilina (finalna koncentracija 0,0423 M). U ovaj rastvor se u manjim porcijama doda ukupno 3,2 g NaBH₄ (finalna koncentracija 0,0846 M). Nakon sat vremena reakcija se ubrzava razblaživanjem reakcione smeše sa etil-acetatom. Nastali proizvod se ispere sa zasićenim rastvorom amonijum-hlorida, osuši se i upari²⁹².

Za ispitivanje supstratne specifičnosti preparata CRL tokom esterifikacije vanilil-alkohola, korišćene su zasićene masne kiseline različite dužine lanca: kaprilna (C8:0), kaprinska (C10:0), laurinska (C12:0), miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0). U 1 mL *n*-heksana se rastvore VA i svaka od nabrojanih MK, tako da finalna koncentracija oba supstrata u RS bude 0,025 M. Ovako pripremljeni rastvori se inkubiraju 30 minuta na 45 °C, a zatim se reakcija inicira dodatkom 0,005 g komercijalnog preparata CRL ili 0,040 g liofilizovanog CRL-HAP. RS se inkubiraju 48 sati na termobloku na 45 °C pri intenzitetu mućkanja od 650 tresaka/min. Paralelno sa RS se inkubira i SP (bez dodatog

enzima). Po završetku reakcije, uzorci se centrifugiraju u minifugi 10 minuta na maksimalnoj brzini. Iz svake RS i SP se odvoji 0,1 mL bistrog SN koji se upari do suva na *speed vac*-u sat vremena na 45 °C. Dobijeni suvi ostatak se resuspenduje u 0,1 mL metanola HPLC čistoće. Rezultati eksperimenta su izraženi kao % konverzije VA u sintezi svakog od nastalih estara.

4.4.1.1.1 Praćenje toka esterifikacije vanilil-alkohola HPLC metodom

Uzorci za određivanje supstratne specifičnosti CRL tokom esterifikacije VA (odjeljak 4.4.1.1) i optimizaciju glavnih reakcionih parametara za sintezu vanilil-laurata (odjeljak 4.4.1.2) su analizirani na Dionex Ultimate 3000 HPLC sistemu u uslovima reverzno-fazne hromatografije (RPC). Za hromatografsku analizu je korišćena Symmetry C18 analitička kolona (dimenzije kolone: 150 x 4,6mm; dijametar čestica 5 µm; dimenzije pora: 100 Å). Tokom analize estara VA i MK sa 8 i 10 C-atoma se kolona i hromatografski sistem ekvilibrišu sa 10 mL mobilne faze (85 % metanola HPLC čistoće i 0,1 % FA). Na kolonu se pomoću mikrošprica nanese 0,01 mL uzorka na ST, pri protoku 1 mL/min. Komponente RS se razdvajaju izokratski u mobilnoj fazi kojom je sistem ekvilibrisan. Za analizu estara VA i MK sa preko 10 C-atoma, kao mobilna faza se koristi 100 % metanol HPLC čistoće sa 0,1 % FA, a ostali parametri hromatografskog razdvajanja ostaju isti. Elucioni profili uzoraka se prate preko promene apsorbance na 235 nm (A_{235}) tokom petominutnog *run*-a. Stepen konverzije VA (%) se izračunava iz odnosa površina pikova alkohola i estera na 235 nm primenom Chromeleon softvera (verzija 7.0).

4.4.1.2 **Optimizovanje reakcionih uslova za sintezu vanilil-laurata**

Osnovni reakcioni parametri, koji su optimizovani tokom sinteze vanilil-laurata su: dužina inkubacije reakcione smeše, temperatura na kojoj se reakcija odvija i molarni odnos supstrata. Prilikom optimizacije **dužine inkubacije** reakciona temperatura je bila fiksirana na 50 °C, a finalne koncentracije vanilil-alkohola i laurinske kiseline su bile identične kao u odeljku 4.4.1.2. Na početku inkubacije, kao i nakon 3, 6, 9, 24, 30, 48 i 72 sata od početka inkubiranja su iz RS uzeti alikvoti od 0,1 mL. Rezultati eksperimenta su izraženi kao % konverzije VA u svakoj od vremenskih tačaka.

Tokom određivanja optimalne **temperature** za sintezu vanilil-laurata, RS su inkubirane ukupno 48 sati na 25, 35, 45, 50 i 60 °C. Po završetku reakcije se iz svake RS odvoji alikvot od 0,1 mL za HPLC analizu. Rezultati su izraženi kao relativni % konverzije VA za svaku od testiranih temperatura.

Tokom optimizacije **molarnog odnosa alkohola i kiseline** u RS za sintezu vanilil-laurata je koncentracija VA bila fiksna (0,025 M), a koncentracija laurinske kiseline je varirala u opsegu 0,0025 – 0,5 M. Reakcione smeše su inkubirane u prethodno određenom optimalnom vremenu od 48 sati i na optimalnoj temperaturi od 45 °C. Na kraju reakcije su iz svake RS izdvojeni alikvoti od po 0,1 mL za HPLC analizu.

U svim slučajevima alikvoti su za HPLC analizu pripremljeni na identičan način kao u odeljku 4.4.1.2. Rezultati sva tri eksperimenta su izraženi kao zavisnost % konverzije VA u zavisnosti od vremena inkubacije, reakcione temperature ili koncentracije laurinske kiseline u RS.

4.4.1.3 Strukturna analiza vanilil-laurata

4.4.1.3.1 Prečišćavanje vanilil-laurata preparativnom HPLC

Vanilil-laurat je enzimski sintetizovan na deset puta većoj skali na način opisan u odeljku 4.4.1.2. Za njegovo prečišćavanje je korišćena preparativna RPC kolona Hypersil gold C18 (dimenzije kolone: 250 x 10mm; dijametar čestica: 5 µm; dimenzija pora: 175 Å) priključena na Dionex Ultimate 3000 HPLC sistem. Kolona i hromatografski sistem se ekvilibrišu u 40 mL mobilne faze (100 % metanol HPLC čistoće sa 0,1 % FA). Tokom svakog *run*-a na kolonu se nanese po 1 mL RS. Komponente RS se razdvajaju u izokratskim uslovima u navedenoj mobilnoj fazi pri protoku od 2 mL/min na ST. Frakcije su, zavisno od intenziteta A_{235} , prikupljane u zapremini od 3 mL ili 0,5 mL. Frakcije, koje po položaju pika odgovaraju vanilil-lauratu, spojene su i nakon prečišćavanja analizirane u uslovima iz odeljka 4.4.1.4.

4.4.1.3.2 Strukturna karakterizacija vanilil-laurata NMR metodom

Za spektralnu analizu se u $CDCl_3$ rastvore prečišćeni, enzimski sintetizovan vanilil-laurat i standard istog jedinjenja dobijenog hemijskom sintezom ²⁹³. Finalna koncentracija

oba uzorka u korišćenom rastvaraču je 20 mg/mL. NMR spektri ovih uzoraka su snimljeni na uređaju Varian Gemini 2000. ^1H NMR spektar je snimljen na 200 MHz, a ^{13}C NMR spektar na 50 MHz. Spektri vanilil-laurata, sintetizovanog različitim metodama su upoređeni i predložena je struktura dobijenog jedinjenja.

4.4.1.4 Obogaćivanje kokosovog ulja kapsinoidima

U 1 mL *n*-heksana se rastvori 0,004 g VA i 0,003 g kokosovog ulja (molski odnos alkohol:kiselina = 1,5:1)²⁴². Reakcija je započeta dodatkom 0,005 g komercijalnog preparata CRL ili 0,040 g CRL-HAP u rastvor supstrata i RS je inkubirana u uslovima opisanim u odeljku 4.4.1.1. U istim uslovima je inkubirana i SP (RS bez dodatog enzima). Po završetku reakcije, RS je centrifugirana 10 minuta na ST u minifugi pri maksimalnoj brzini. Alikvot od 0,1 mL SN je odvojen za HPLC analizu i neposredno pre analize je razblažen 10 puta sa metanolom HPLC čistoće.

4.4.1.4.1 Praćenje toka reakcije HPLC metodom

Reverzno-fazna hromatografija uzorka RS je urađena na Dionex Ultimate 3000 HPLC sistemu. Komponente reakcione smeše su razdvojene na preparativnoj koloni Hypersil gold C18 (dimenzije kolone: 150 x 4,5 mm; dimenzije čestica: 5 μm). Na prethodno ekvilibrisanu kolonu se nanese 0,03 mL uzorka pri protoku 1 mL/min, pritisku od 46 bar i temperaturi od 30 °C. Hromatografsko razdvajanje komponenti uzorka je izvedeno u izokratskim uslovima: tokom prvih 15 minuta sa rastvorom A (85 % metanol HPLC čistoće), a 30 minuta sa rastvorom B (100 % 2-propanol HPLC čistoće sa 0,1 % FA). Razdvajanje je praćeno promenom apsorbance na 210 nm (A_{210}). Pojedinačni pikovi su identifikovani pomoću standarda estara vanilil-alkohola za tri najdominantnije masne kiseline u kokosovom ulju: kaprilnu, kaprinsku i laurinsku. Rezultati su kvantifikovani kao % konverzije VA, dobijen iz odnosa površina pikova VA i svakog od nastalih estara.

4.4.2 Primena lipaza iz *Candida rugosa* u sintezi kratkolančanih metil-estara

4.4.2.1 Ispitivanje supstratne specifičnosti preparata CRL prema karboksilnim kiselinama

Supstratna specifičnost preparata CRL tokom sinteze metil-estara je testirana sa etanskom (sirćetnom), butanskom i heksanskom (kapronskom) kiselinom kao acil-donorima. U 1 mL *n*-heksana se rastvore metanol i karboksilna kiselina do finalne koncentracije od 0,25 M. Pripremljeni rastvori se inkubiraju 30 minuta na 45 °C, a zatim se reakcija započinje dodatkom 0,005 g komercijalnog preparata CRL (specifična aktivnost 23,7 U/g preparata), odnosno 0,0382 g liofilizovanog imobilizovanog preparata CRL na HAP (specifična aktivnost je 3,1 U/g liofilizovanog imobilizata). RS su inkubirane 50 sati na 45 °C pri intenzitetu mućkanja 650 tresaka/min. Paralelno sa reakcionim smešama je inkubirana i SP (bez dodatog enzima). Nakon isteka zadatog vremena inkubacije, reakcije su zaustavljene centrifugiranjem RS u minifugi 10 minuta pri maksimalnoj brzini. Dobijeni bistri supernatanti su analizirani GC/MS metodom.

4.4.2.1.1 Praćenje toka reakcije i detekcija nastalih proizvoda metodom GC/MS

GC/MS analiza je urađena na gasnom hromatografu Agilent 7890A, koji je opremljen split/splitless injektorom, plameno jonizacionim detektorom i masenim selektivnim detektorom sa kvadrupolnim analizatorom (Agilent 5975C inert XL EI/CI MSD). Komponente RS su razdvojene na HP-INNOWax polietilenglikolnoj koloni (dimenzije kolone: 30 m x 0,32 mm; debljina filma: 0,25 µm). Tokom razdvajanja kao noseći gas je korišćen helijum pri konstantnom protoku 1,46 mL/min. Temperatura kolone se za vreme analize linearno povećava u opsegu 40 – 250 °C, pri brzini od 10 °C/min, dok se temperatura injektora i detektora se održavaju na 250 °C. Maseni spektri su snimljeni tehnikom elektronske jonizacije (energija 70 eV, opseg snimanja 18-100 *m/z*). Pre uzoraka snimljen je *n*-heksan kao slepa proba, u istim eksperimentalnim uslovima u kojima su analizirani i uzorci, a potom je na kolonu injektovano 0,001 mL uzoraka reakcionih smeša sa različitim metil-estrima. se na kolonu nanese 0,001 mL svakog od uzoraka u *n*-heksanu. Maseni odnos jedinjenja u smeši (%) je izračunat iz odnosa površina pikova kiseline i odgovarajućeg estra iz GC-FID hromatograma.

4.4.3 Primena laktaze iz *Aspergillus oryzae* u sintezi vanilil-galaktozida

U 0,01 M fosfatnom puferu se rastvori laktoza, tako da je njena finalna koncentracija 400 mg/mL. Tokom pripreme ovog supstrata potrebno je da se rastvor laktoze zagreva u mikrotalasnoj rerni u intervalima od po 10 sekundi tokom ukupno 1 minuta dok ne postane bistar. U 3 mL rastvora laktoze, ohlađenog na ST, rastvori se VA do finalne koncentracije 0,025 M. Reakcija se započinje dodatkom 0,003 g komercijalnog preparata AOL (specifična aktivnost je 1,11 U/mg preparata), odnosno 0,030 g imobilizovanog preparata AOL na HAP (specifična aktivnost je 0,11 U/mg preparata). Reakcione smeše se inkubiraju 80 minuta na termobloku na 30 °C pri intenzitetu mućkanja 650 tresaka/min. Istovremeno se sa reakcionim smešama inkubira i SP (bez dodatog enzima). Po završetku reakcije, uzorci se centrifugiraju 10 minuta u minifugi pri maksimalnoj brzini. Alikvot od 0,3 mL supernatanta se razblaži 2 puta sa acetonom, promućka 10 sekundi na vorteksu, a zatim se aceton ukloni zagrevanjem uzorka 15 minuta na 95 °C. Ovako pripremljen uzorak je analiziran na HPLC.

4.4.3.1 Strukturna analiza vanilil-galaktozida

4.4.3.1.1 Praćenje toka galaktozilacije HPLC metodom

U cilju razdvajanja komponenti RS i identifikacije nastalog proizvoda, korišćena je analitička kolona za reverzno-faznu hromatografiju Symmetry C18 (dimenzije kolone: 150 x 4,6 mm; dijametar čestica: 5 µm; dimenzije pora 100 Å), povezana sa Äkta purifier 10 sistemom za HPLC. Kolona i sistem za hromatografiju se pre rada ekvilibrišu sa 10 mL mobilne faze (30 % metanol HPLC čistoće sa 0,1 % FA). Na ekvilibrisanu kolonu se pomoću mikrošprica nanosi 0,01 mL uzorka RS nakon sinteze vanilil-galaktozida pri protoku 0,75 mL/min na ST. Komponente reakcione smeše se razdvajaju izokratski u 30 % metanolu sa 0,1 % FA tokom desetominutnog *run*-a. Hromatografsko razdvajanje se prati promenom A_{235} . Rezultati su izraženi kao % konverzije VA, izračunat iz odnosa površina pikova vanilil-alkohola i vanilil-galaktozida (Va-Gal) pomoću UniCorn softvera (verzija 5.31).

4.4.3.1.2 Prečišćavanje proizvoda reakcije preparativnom HPLC metodom

Kao i na primeru vanilil-laurata, i vanilil-galaktozid je pre preparativne HPLC pripremljen na 10 puta većoj skali, u uslovima iz odeljka 4.4.3. Za prečišćavanje ovog

jedinjenja je korišćena preparativna reverzno-fazna kolona Hypersil gold C18 (dimenzije kolone: 250 x 10 mm; dijametar čestica: 5 μm ; dimenzije pora: 175 Å), priključena na Akta 10 sistem za HPLC. Pre rada su kolona i hromatografski sistem ekvilibrisani sa 40 mL mobilne faze (30 % metanol HPLC čistoće sa 0,1 % FA). Na ekvilibrisanu kolonu se pri protoku od 1,5 mL/min nanosi po 1 mL RS tokom jednog četrdesetominutnog *run*-a. Prečišćavanje se odvija izokratski na ST i prati se preko promene A_{235} . Zavisno od intenziteta pikova, pomoću frakcionog kolektora se prikupljaju frakcije od 3 mL ili 0,5 mL. Sve frakcije koje pripadaju piku Va-Gal se spoje i analiziraju u uslovima iz odeljka 4.4.3.1.1. Prečišćeni Va-Gal se upari do suva na „*speed vac*“-u za dalju strukturnu karakterizaciju.

4.4.3.1.3 Strukturna karakterizacija vanilil-alkohola NMR metodom

Za NMR spektroskopska merenja korišćen je Brukerov spektrometar ADVANCE III radne frekvencije od 500 MHz i probom širokog propusnog opsega (BBO -Brod bend) sa gradijentom po Z osi sa prečnikom kiveta od 5mm. Kao rastvarač za priremu uzoraka za NMR je korišćen MeOD (Sigma Aldrich 99,9%) sa TMS kao internim standardom. Za snimanje i obradu spektara korišćen je Brukerov softver TopSpin verzije 3.2 i 3.5.

Spektralna širina ^1H NMR spektra je 16 ppm, vreme relaksacije 2s (d1) sa pomerajem frekvencije transmitera za 7 ppm. Spektralna širina ^{13}C NMR spektra je 230 ppm sa pomerajem frekvencije transmitera za 110 ppm. Protonski spektar je sniman sa 32, a spektar ugljenika sa 1000 skanova. Kao referentni signal je korišćen signal internog standarda.

Svi 2D eksperimenti su snimani sa rezolucijom od 1024 po F2 frekventnoj osi, odnosno 256 po F1 osi. COSY eksperiment je sniman sa 4 skana, a NOESY i HSQC eksperimenti sa 16 skanova.

4.4.3.2 Ispitivanje mogućnosti kontinuirane upotreba laktaze iz *Aspergillus oryzae* imobilizovane na hidroksiapatitu u sintezi vanilil-galaktozida

U 1,5 mL rastvora supstrata se doda 0,015 g imobilizovanog preparata AOL na HAP i RS se inkubira u uslovima iz odeljka 4.4.3. Po završetku jednog reakcionog ciklusa, RS se centrifugira 10 minuta u minifugi na maksimalnoj brzini, odvoji se alikvot SN od 0,3 mL u

kome se enzim inaktivira na način opisan u odeljku 4.4.3, a imobilizat se ispere 3 puta sa po 2 mL 0,01 M fosfatnog pufera pH 6. Nakon toga se imobilizat resuspenduje u novoj količini svežeg supstrata. Ista šarža imobilizovanog preparata AOL na HAP je testirana u ukupno 10 uzastopnih reakcionih ciklusa. Rezultati su izraženi kao relativni % zadržane aktivnosti imobilizovanog preparata AOL na HAP u poređenju sa aktivnošću imobilizovanog preparata u prvom ciklusu (za koju je uzeto da iznosi 100 %).

4.4.4 Primena laktaze iz *Aspergillus oryzae* u sintezi galakto-oligosaharida

U 3 mL rastvora laktoze ($c = 400 \text{ mg/mL}$, odeljak 4.5.1) se doda 0,020 g vlažnog imobilizovanog preparata AOL na HAP. RS se inkubira 90 minuta na $55 \text{ }^\circ\text{C}$, nakon čega se centrifugira 10 minuta u minifugi pri maksimalnoj brzini ¹⁷. Alikvot SN od 0,3 mL se odvoji i u njemu se enzim inaktivira kao što je opisano u odeljku 4.4.3 i do HPLC analize se čuva u zamrzivaču.

4.4.4.1 Praćenje toka reakcije i identifikacija nastalih proizvoda HPLC metodom

Uzorak RS za sintezu GOS se, neposredno pre analize, razblaži 10 puta u mobilnoj fazi (dejonizovana voda) i centrifugira u minifugi 10 minuta pri maksimalnoj brzini. Dobijeni SN se procedi kroz $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ filter. Za razdvajanje komponenti RS je korišćena kolona za šećere Hyper REZ XP Carbohydrate Ca^{2+} (dimenzije kolone: $300 \times 7,7 \text{ mm}$; dijametar čestica: $8 \text{ }\mu\text{m}$), povezana sa Dionex Ultimate 3000 HPLC sistemom. Kolona i hromatografski sistem se ekvilibrišu sa mobilnom fazom, a zatim se pri protoku od $0,6 \text{ mL/min}$ na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ uzorak nanosi na kolonu. Hromatografsko razdvajanje je izokratsko, a za detekciju pojedinačnih komponenti RS se koristi RefractoMax 520 detektor, preko koga se prati promena indeksa prelamanja na $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Pojedinačne komponente smeše su kvantifikovane preko standarda glukoze, galaktoze, laktoze, maltotrioze i maltotetraoze ¹⁷.

4.4.4.2 Ispitivanje mogućnosti kontinuirane upotrebe laktaze iz *Aspergillus oryzae* imobilizovane na hidroksiapatitu u sintezi galakto-oligosaharida

Tokom jednog reakcionog ciklusa se u 2 mL rastvora laktoze doda 0,014 g vlažnog imobilizovanog preparata AOL na HAP i RS se inkubira u uslovima opisanim u odeljku 4.4.4. Nakon centrifugiranja RS i odvajanja alikvota SN od 0,3 mL, eventualno zaostali enzim u

aliquotu se inaktivira na način opisan u odeljku 4.4.3. Imobilizat se ispere 3 puta sa po 2 mL 0,01 M fosfatnog pufera pH 6 i zatim se resuspenduje u svežoj količini supstrata. Ista šarža supstrata je upotrebljena u ukupno 10 reakcionih ciklusa. Rezultati su predstavljeni kao relativni % zadržane aktivnosti u odnosu na prvi ciklus (koji je uzet kao 100 %).

5. LITERATURA

1. Anastas, P. T. *et al. Applied Catalysis A: General* **2001**, 221, 3.
2. Loncar, N. Doktorska disertacija, Beograd, **2012**.
3. Krishna, S. H. *Biotechnology Advances* **2002**, 20, 239.
4. Milosavic, N. Doktorska disertacija, Beograd, **2007**.
5. Hagen, J. *Industrial catalysis: A practical approach*; 2 ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2006**.
6. Choi, J. M. *et al. Biotechnology Advances* **2015**, 33, 1443.
7. Reetz, M. T. *Chemical Record* **2016**, 16, 2449.
8. Abdul Rehman, M. M. In *Textile learner*; Kiron, M. I., Ed.
9. Li, S. *et al. Computational and Structural Biotechnology Journal* **2012**, 2.
10. <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/lipase-market-205981206.html>.
11. Hasan, F. *et al. Enzyme and Microbial Technology* **2006**, 39, 235.
12. DiCosimo, R. *et al. Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 6437.
13. Akoh, C. C. *et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, 8995.
14. Fernandes, P. *Enzyme Research* **2010**, 19.
15. Vujcic, Z. *et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 11896.
16. Lorenzoni, A. S. G. *et al. Carbohydrate Polymers* **2014**, 103, 193.
17. Carevic, M. *et al. International Dairy Journal* **2016**, 54, 50.
18. Thakur, S. *International Journal of Scientific & Engineering Research* **2012**, 3, 1.
19. Dimitrijevic, A. *et al. Journal of the Serbian Chemical Society* **2011**, 76, 1081.
20. Yang, X. H. *et al. Process Biochemistry* **2005**, 40, 2095.
21. Nardini, M. *et al. Current Opinion in Structural Biology* **1999**, 9, 732.
22. Benjamin, S. *et al. Yeast* **1998**, 14, 1069.
23. Rua, M. L. *et al. Biochimica et Biophysica Acta* **1993**, 1156, 181.
24. Fadiloglu, S. *et al. Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences* **2002**, 26, 249.
25. Trbojevic, J. N. *et al. Hemijska Industrija* **2013**, 67, 703.
26. Pleiss, J. *et al. Chemistry and Physics of Lipids* **1998**, 93, 67.
27. Schmitt, J. *et al. Protein Engineering* **2002**, 15, 595.
28. Stauch, B. *et al. Journal of Lipid Research* **2015**, 56, 2348.
29. Kirk, O. *et al. Organic Process Research & Development* **2002**, 6, 446.
30. Zisis, T. *et al. Biochemistry* **2015**, 54, 5969.
31. Guiesse, D. *et al. Tetrahedron-Asymmetry* **2003**, 14, 1807.
32. Mendes, A. A. *et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, 78, 119.
33. Basak, A. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11, 305.
34. Gurung, N. *et al. BioMed Research International* **2013**, 2013, Article ID 329121.
35. Kirk, O. *et al. Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13, 345.
36. No, D. S. *et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61, 8934.
37. Rustoy, E. M. *et al. Arkivoc* **2005**, 175.
38. Carlquist, M. *et al. Yeast* **2015**, 32, 123.
39. Corovic, M. *et al. Bioprocess and Biosystems Engineering* **2017**, 40, 23.
40. Grey, A. *et al. Jama Internal Medicine* **2014**, 174, 460.
41. Macho, A. *et al. European Journal of Nutrition* **2003**, 42, 2.
42. Kumar, S. P. *et al. Archives of Biochemistry and Biophysics* **2008**, 478, 85.
43. Ognjanovic, N. *et al. Bioresource Technology* **2009**, 100, 5146.
44. Ferreira-Dias, S. *et al. Electronic Journal of Biotechnology* **2013**, 16.
45. Criado, M. *et al. European Journal of Lipid Science and Technology* **2008**, 110, 714.
46. Maugard, T. *et al. Biotechnology Progress* **2000**, 16, 358.

47. Bezbradica, D.*et al. Biochemical Engineering Journal* **2013**, 71, 89.
48. Torres, P.*et al. Process Biochemistry* **2008**, 43, 145.
49. Jakovetic, S. M.*et al. Industrial & Engineering Chemistry Research* **2013**, 52, 16689.
50. Gumel, A. M.*et al. Process Biochemistry* **2011**, 46, 2079.
51. Kobata, K.*et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61, 11127.
52. Luo, X. J.*et al. European Journal of Pharmacology* **2011**, 666, 211.
53. Zhang, L.*et al. Food and Function* **2013**, 4, 738.
54. Anderson, M.*et al. Advanced Synthesis & Catalysis* **2014**, 356, 2113.
55. Trbojević Ivić, J.*et al. Food Chemistry* **2017**, 218, 505.
56. Ishihara, K.*et al. World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2010**, 26, 1337.
57. Torres, S.*et al. Food Research International* **2009**, 42, 454.
58. Molinari, F.*et al. Applied and Microbial Biotechnology* **1995**, 43, 967.
59. Macedo, G. A.*et al. Journal of Food Agriculture & Environment* **2003**, 1, 59.
60. Romero, M. D.*et al. Enzyme and Microbial Technology* **2005**, 37, 42.
61. Lotti, M.*et al. Biotechnology Journal* **2015**, 10, 22.
62. <https://jameskennedymonash.files.wordpress.com/2013/12/table-of-esters-and-their-smells.jpg>.
63. Velickovic, D. Doktorska disertacija, Beograd, **2011**.
64. van Rantwijk, F.*et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1999**, 6, 511.
65. Divakar, S. In *Enzymatic Transformation*; Divakar, S., Ed.; Springer: New York, **2013**.
66. Carevic, M.*et al. Hemijska Industrija* **2015**, 69, 305.
67. Lee, Y. M.*et al. Bioresources* **2014**, 9, 4358.
68. Anbu, P.*et al. BioMed Research International* **2015**, 2015, Article ID 816419.
69. Singh, G.*et al. 3Biotech* **2016**, 6, Article ID 328.
70. Kren, V.*et al. Current Medicinal Chemistry* **2001**, 8, 1303.
71. Velickovic, D.*et al. Bioprocess and Biosystems Engineering* **2012**, 35, 1107.
72. Milosavic, N. B.*et al. Tetrahedron Letters* **2007**, 48, 7222.
73. Pavlovic, M.*et al. Russian Journal of Physical Chemistry A* **2013**, 87, 2285.
74. Prodanovic, R.*et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2005**, 35, 142.
75. Velickovic, D.*et al. Process Biochemistry* **2011**, 46, 1698.
76. Miguel, A. S. M.*et al. In Food Industry*; Muzzalupo, I., Ed.; InTech: **2013**, p 287.
77. Tabata, S.*et al. Biochimica et Biophysica Acta* **1984**, 797, 231.
78. Kimura, A. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2000**, 12, 373.
79. Yamamoto, K.*et al. European Journal of Biochemistry* **2004**, 271, 3414.
80. Grover, A. K.*et al. Biochimica et Biophysica Acta* **1977**, 482, 98.
81. Terwisscha van Scheltinga, A. C.*et al. Structure* **1994**, 2, 1181.
82. Kurashima, K.*et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, 26, 87.
83. Maksimainen, M. M.*et al. International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, 60, 109.
84. Sainz-Polo, M. A.*et al. Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288, 9755.
85. Andjelkovic, U.*et al. Food Chemistry* **2010**, 120, 799.
86. Davies, G.*et al. Structure* **1995**, 3, 853.
87. Bras, N. F.*et al. In Carbohydrates - Comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology*; Chang, C. F., Ed.; InTech Open: **2012**.
88. Burmeister, W. P.*et al. Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 39385.
89. Kuhad, R. C.*et al. Enzyme Research* **2011**, 2011, Article ID 280696.
90. Cobucci-Ponzano, B.*et al. In Extremophiles Handbook*; Horikoshi, K., Ed.; Springer: Tokyo, Japan, **2011**, p 427.
91. Ravindran, V. *Journal of Applied Poultry Research* **2013**, 22, 628.

92. Plou, F. J.*et al.* In *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*; Polaina, J., MacCabe, A. P., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, **2007**, p 141.
93. Katusumi, K.*et al.* *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *52*, 270.
94. Velickovic, D. V.*et al.* *Russian Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *85*, 2317.
95. Lopez-Munguia, A.*et al.* *Plos One* **2011**, *6*.
96. Hofmann, R. W.*et al.* *Annals of Botany* **2000**, *86*, 527.
97. de Roode, B. M.*et al.* *Biotechnology Progress* **2003**, *19*, 1391.
98. Ong, E. S.*et al.* *Journal of Separation Science* **2007**, *30*, 2130.
99. Bridiau, N.*et al.* *Biotechnology Progress* **2006**, *22*, 326.
100. Lundquist, J. J.*et al.* *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 555.
101. Cardelle-Cobas, A.*et al.* *International Journal of Food Microbiology* **2011**, *149*, 81.
102. Gosling, A.*et al.* *Food Chemistry* **2010**, *121*, 307.
103. Carevic, M. Doktorska disertacija, Beograd, **2016**.
104. Jovanovic-Malinovska, R.*et al.* *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2012**, *168*, 1197.
105. Castillo, B.*et al.* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2005**, *35*, 147.
106. Khmel'nitsky, Y. L.*et al.* *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, *3*, 47.
107. Wang, S. H.*et al.* *Catalysts* **2016**, *6*.
108. Stepankova, V.*et al.* In *Industrial Biocatalysis*; Grunwald, P., Ed.; Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.: **2015**, p 583.
109. Hudson, E. P.*et al.* *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *16*, 637.
110. Docherty, K. M.*et al.* *Green Chemistry* **2005**, *7*, 185.
111. Matsuda, T.*et al.* *Chemical Communications* **2004**, *20*, 2286.
112. Carvalho, C. M. L.*et al.* *Biochimie* **2000**, *82*, 1063.
113. Bezbradica, D.*et al.* *Journal of the Serbian Chemical Society* **2006**, *71*, 31.
114. Stojanovic, M.*et al.* *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2015**, *62*, 458.
115. Vulfson, E. N.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **1990**, *12*, 950.
116. Sivakumar, R.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **2009**, *44*, 33.
117. Manohar, B. *Journal of Food Science and Technology* **2010**, *47*, 469.
118. Beecher, J. E.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **1990**, *12*, 955.
119. Manohar, B.*et al.* *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2009**, *30*, 1760.
120. Zarena, A.*et al.* *Journal of Food Science and Technology* **2015**, *52*, 6547.
121. Manohar, B.*et al.* *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2009**, *30*, 1760.
122. Wanga, S.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **2014**, *57*, 42.
123. Kuptsova, O. S.*et al.* *Bioorganicheskaia Khiimia* **2001**, *27*, 429.
124. Mladenoska, I. *Food Technology and Biotechnology* **2012**, *50*, 420.
125. Lundblad, R. L.; Third ed.; Lundblad, R. L., Ed.; CRC Press: London, **2005**.
126. Diaz-Rodriguez, A.*et al.* *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*, 211.
127. Glebe, U.*et al.* In *Bio-Synthetic Hybrid Materials and Bionanoparticles: A Biological Chemical Approach Towards Material Science*; Boker, A., van Rijn, P., Eds.; The Royal Society of Chemistry: **2015**, p 1.
128. Koops, B. C.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, *25*, 622.
129. Gomez, L.*et al.* *Biotechnology Letters* **2000**, *22*, 1191.
130. Jaeger, K. E.*et al.* *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 68.
131. Liszewski, K. *Genetic Engineering & Biotechnology News* **2015**, *35*, 1.
132. Shaikh, F. A.*et al.* *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* **2008**, *86*, 169.
133. Mohamad, N. R.*et al.* *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2015**, *29*, 205.
134. Hanefeld, U.*et al.* *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 453.
135. Subramanian, A.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, *24*, 26.

136. Jozef, B. Doktorska disertacija, Beograd, **2019**.
137. Datta, S.*et al.* *3 Biotech* **2013**, 3, 1.
138. Roig, M. G.*et al.* *Biochemical Education* **1986**, 14, 180.
139. Ahmed, H. In *Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization*; Ahmed, H., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, **2005**, p 133.
140. Sheldon, R. A.*et al.* *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 6223.
141. Sheldon, R. A. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2007**, 349, 1289.
142. Tischer, W.*et al.* *Biocatalysis - from Discovery to Application* **1999**, 200, 95.
143. Godoy, C. A. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, 18.
144. Liu, Y.*et al.* *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2016**, 31, 553.
145. Hung, T. C.*et al.* *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2003**, 26, 69.
146. Prlainovic, N. Z.*et al.* *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2011**, 34, 803.
147. Ahmed, K. S. O. H.*et al.* *Journal of the Serbian Chemical Society* **2007**, 72, 1255.
148. Bayraktar, H.*et al.* *International Journal of Biological Macromolecules* **2011**, 49, 855.
149. Zuza, M. G.*et al.* *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **2007**, 13, 206.
150. Mihailovic, M.*et al.* *Process Biochemistry* **2014**, 49, 637.
151. Cazaban, D.*et al.* *Current Organic Chemistry* **2017**, 21, 96.
152. Jesionowski, T.*et al.* *Adsorption-Journal of the International Adsorption Society* **2014**, 20, 801.
153. Abdel-Naby, M. A.*et al.* *Microbiological Research* **1999**, 153, 319.
154. Takac, S.*et al.* *Process Biochemistry* **2007**, 42, 1021.
155. Adlercreutz, P. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 6406.
156. Zehani, N.*et al.* *Frontiers in Chemistry* **2014**, 2.
157. Jeong, C. Y.*et al.* *Journal of Biotechnology* **2014**, 175, 7.
158. Carvalho, A. C. L. D.*et al.* *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, 16, 29682.
159. Tan, T. W.*et al.* *Biotechnology Advances* **2010**, 28, 937.
160. Lalonde, J.*et al.* *Journal of American Chemical Society* **1995**, 117, 6845.
161. Rather, M.*et al.* *Sustainable Chemical Processes* **2013**, 1, 1.
162. Nagatomo, H.*et al.* *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2005**, 69, 128.
163. Milosavic, N.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, 40, 1422.
164. Garcia-Galan, C.*et al.* *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, 353, 2885.
165. Palomo, J. M.*et al.* *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2002**, 19, 279.
166. Mateo, C.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, 40, 1451.
167. Lopez-Gallego, F.*et al.* *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, 14, 174.
168. El-Zahab, B.*et al.* *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, 87, 178.
169. Dimitrijevic, A.*et al.* *Carbohydrate Polymers* **2011**, 83, 1397.
170. Ben-Nissan, B. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2003**, 7, 283.
171. Fadrosh, D. W.*et al.* *JOVE-Journal of Visualized Experiments* **2011**, Article ID 3146.
172. Freitag, R.*et al.* *Biotechnology Journal* **2012**, 7, 90.
173. Mamone, G.*et al.* *Proteomics* **2010**, 10, 380.
174. Niimi, M.*et al.* *Sensors and Actuators B-Chemical* **2014**, 201, 185.
175. Gagnon, P. *Validated Biosystems Quarterly Resource Guide for Downstream Processing* **1998**, 1.
176. Wyckoff, R. W. G. *Crystal structures*; 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: New York, **1963**.
177. <https://www.stolaf.edu/people/hansonr/mo/apatite/mo.htm>.
178. Kandori, K.*et al.* *Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, 2, 2015.
179. Makrodimitris, K.*et al.* *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 13713.
180. Hou, Y.*et al.* *Analytical Chemistry* **2011**, 83, 3709.
181. Gorbunoff, M. J. *Analytical Biochemistry* **1984**, 136, 425.

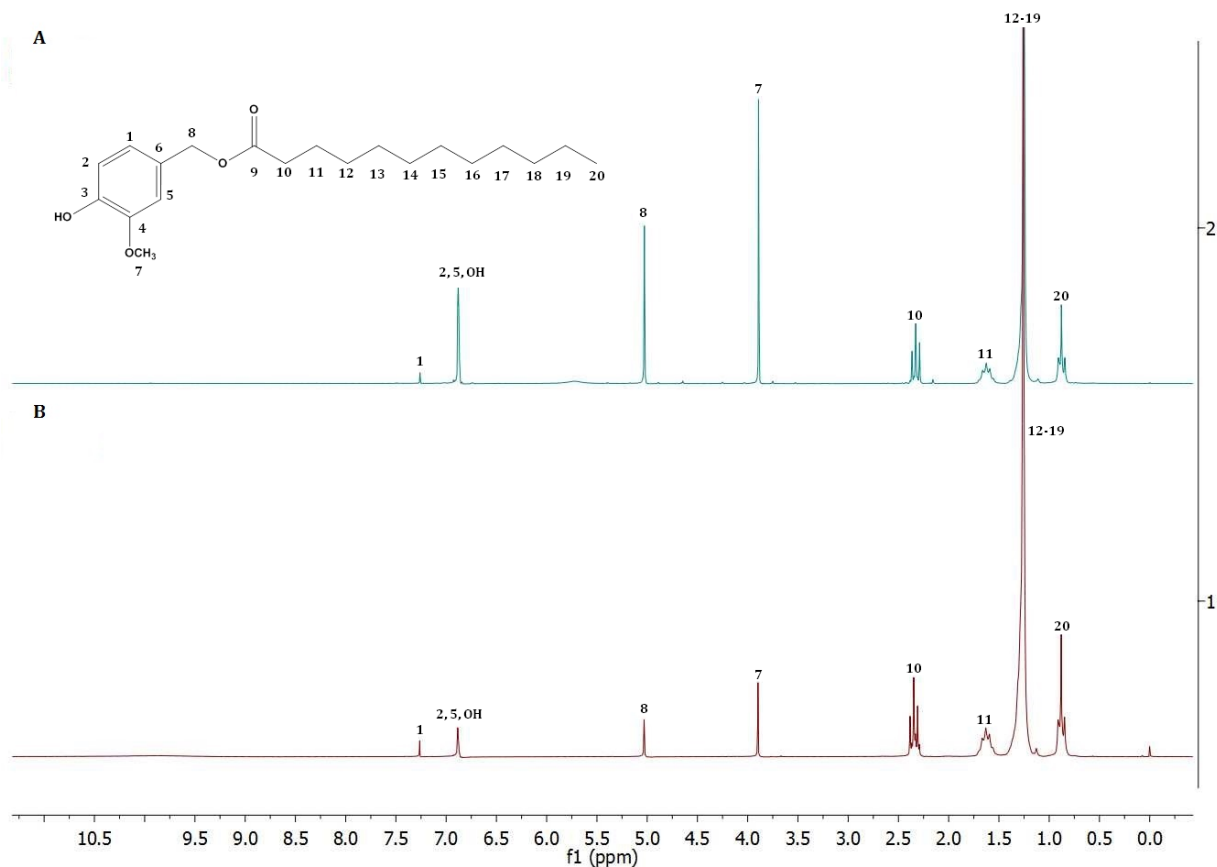
182. Gorbunoff, M. J. *Analytical Biochemistry* **1984**, 136, 433.
183. Gagnon, P. *et al. Technical Bulletin: CHT Cermaic hydroxyapatite - a new dimension in chromatography of biological molecules*, 2009.
184. Gorbunoff, M. J. *et al. Analytical Biochemistry* **1984**, 136, 440.
185. Ng, P. *et al. Technical note: How CHT ceramic hydroxyapatite works*, 2008.
186. Marzadori, C. *et al. Soil Biology & Biochemistry* **1998**, 30, 1485.
187. Jang, K. H. *et al. Bioprocess Engineering* **2000**, 23, 89.
188. Bronshteyn, M. *et al. Letters in Applied Microbiology* **2002**, 34, 205.
189. Salman, S. *et al. Talanta* **2008**, 77, 490.
190. Li, C. Y. *et al. Analyst* **2011**, 136, 1116.
191. Liu, Q. Q. *et al. Journal of the Science of Food and Agriculture* **2013**, 93, 1953.
192. Gibriel, A. Y. *et al. International Journal of Current Microbiology and Applied Science* **2014**, 3, 1114.
193. Srinivas, N. *et al. International Journal of ChemTech Research* **2015**, 7, 2117.
194. Zdarta, J. *et al. Physicochemical Problems of Mineral Processing* **2015**, 51, 633.
195. Cabuk, B. *et al. Journal of Nutritional Health & Food Engineering* **2014**, 1, 1.
196. Mohy Eldin, M. S. *et al. Current Biotechnology* **2014**, 3, 207.
197. Dimitrijevic, A. *et al. Bioresource Technology* **2012**, 107, 358.
198. Trbojevic Ivic, J. *et al. Journal of the Science of Food and Agriculture* **2016**, 96, 4281.
199. Zivkovic, L. T. I. *et al. Biochemical Engineering Journal* **2015**, 93, 73.
200. Pereira, E. B. *et al. Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2003**, 20, 343.
201. Ghiaci, M. *et al. Applied Clay Science* **2009**, 43, 289.
202. Izrael Zivkovic, L. T. *et al. Journal of Serbian Chemical Society* **2015**, 80, 1113.
203. Castro, H. F. *et al. Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2000**, 17, 849.
204. Bodalo, A. *et al. Biotechnology Techniques* **1991**, 5, 393.
205. Woudenberg-van Oosterom, M. *et al. Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* **1998**, 134, 267.
206. Gurdas, S. *et al. Food and Bioprocess Technology* **2012**, 5, 904.
207. Husain, Q. *et al. International Journal of Biological Macromolecules* **2011**, 49, 37.
208. Albayrak, N. *et al. Enzyme and Microbial Technology* **2002**, 31, 371.
209. Carpio, C. *et al. Food Chemistry* **2000**, 68, 403.
210. Tanriseven, A. *et al. Process Biochemistry* **2002**, 38, 27.
211. Santos, M. H. *et al. Materials Research* **2004**, 7, 625.
212. Guo, T. L. *et al. Molecules* **2014**, 19, 149.
213. Rayment, I. *Macromolecular Crystallography, Pt A* **1997**, 276, 171.
214. Habibi, A. E. *et al. Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **2004**, 37, 642.
215. Trbojevic Ivic, J. *et al. Rsc Advances* **2016**, 6, 34818.
216. Benjamin, S. *et al. Journal of Scientific & Industrial research* **1998**, 1, 1.
217. Ishihama, Y. *et al. Molecular & Cellular Proteomics* **2005**, 4, 1265.
218. Stan Tsai, C. In *An introduction to computational biochemistry*; Stan Tsai, C., Ed.; Wiley-Liss, Inc.: **2002**, p 315.
219. Groschulski, P. *et al. Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 12843
220. Grochulski, P. *et al. Protein Science* **1994**, 3, 82.
221. [http://www.uniprot.org/blast/?about=P20261\[16-549\]&key=Chain&id=PRO_0000008619](http://www.uniprot.org/blast/?about=P20261[16-549]&key=Chain&id=PRO_0000008619).
222. Drakulic, B. J. *et al. Research Trends in Contemporary Materials Science* **2007**, 555, 435.
223. Pestana, C. R. *et al. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **2009**, 1787, 176.
224. Petersen, L. C. *et al. Protein Science* **2000**, 9, 859.
225. <http://www.uniprot.org/uniprot/P32947>.

226. Akoh, C. C.*et al.* *Lipids* **2004**, 39, 513.
227. <http://www.uniprot.org/uniprot/P32946>.
228. Tanaka, Y.*et al.* *Biochemistry* **1975**, 77, 241.
229. <http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=5856EA7000001B9D5B793019&wait=20>.
230. Kleina, M. P.*et al.* *Carbohydrate Polymers* **2013**, 95, 465.
231. Gaur, R.*et al.* *Food Chemistry* **2006**, 97, 426.
232. Hirata, H.*et al.* *Journal of Biotechnology* **1990**, 14, 157.
233. Sharma, S.*et al.* *Scientific World Journal* **2014**.
234. Wang, C. F.*et al.* *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2014**, 45, 261.
235. Meyer, V. M. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*; 4th ed.; John Wiley & Sons Ltd: Weinheim, **2004**.
236. Bala, T.*et al.* *Journal of Physical Chemistry A* **2007**, 111, 6183.
237. Nimmermark, A.*et al.* *Zeitschrift Fur Kristallographie* **2013**, 228, 311.
238. Sangeetha, K.*et al.* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2006**, 38, 171.
239. Khajeh, K.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, 28, 543.
240. <http://www.uniprot.org/uniprot/P20261>.
241. Kobata, K.*et al.* *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2002**, 66, 319.
242. Mbatia, B.*et al.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59, 7021.
243. Benjamin, S.*et al.* *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2001**, 44, 213.
244. Janssen, A. E. M.*et al.* *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, 18, 340.
245. Roby, M. H.*et al.* *Food Chemistry* **2015**, 171, 397.
246. Bezbradica, D.*et al.* *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2006**, 38, 11.
247. Bhandarkar, S. V.*et al.* *Electronic Journal of Biotechnology* **2000**, 3, 195.
248. Milasinovic, N.*et al.* *Scientific World Journal* **2014**.
249. Dahlan, I.*et al.* *International Journal of Engineering* **2004**, 18, 153.
250. Raghavendra, T.*et al.* *BioMed Research International* **2014**.
251. Kumar, A.*et al.* *Biological Procedures Online* **2016**, 18.
252. Zaidi, A.*et al.* *Journal of Biotechnology* **2002**, 93, 209.
253. He, G. J.*et al.* *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44, 3345.
254. Boyd, R. W.*et al.* *Organic chemistry*; Prentice Hall: Englewood Cliffs, **1992**.
255. Yang, D.*et al.* *Biomaterials* **2009**, 30, 6035.
256. Dayrit, F. M. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2015**, 92, 1.
257. Lappano, R.*et al.* *Cell Death Discovery* **2017**, 3, 1.
258. Liu, J. Y.*et al.* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, 89, 41.
259. Kanmani, P.*et al.* *Electronic Journal of Biotechnology* **2015**, 18, 20.
260. Peedikayil, F. C.*et al.* *Nigerian Medical Journal* **2015**, 56, 143.
261. <http://www.chempro.in/fattyacid.htm>.
262. Cheung, H.*et al.* In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, **2002**.
263. Fogler, H. S. *Elements of Chemical Reaction Engineering*; Prentice-Hall: India, **2002**.
264. Sinnott, M. L. *Chemical Reviews* **1990**, 90, 1171.
265. Carevic, M.*et al.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2016**, 64, 3609.
266. Urrutia, P.*et al.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61, 1081.
267. Tokosova, S.*et al.* *Acta Chimica Slovaca* **2015**, 8, 101.
268. Neri, D. F. M.*et al.* *Food Chemistry* **2009**, 115, 92.
269. Vera, C.*et al.* *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2016**, 32.
270. Warmerdam, A.*et al.* *Springerplus* **2013**, 2.

271. Feng, Y. M.*et al. Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* **2010**, 38, 43.
272. Pan, C. L.*et al. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2009**, 61, 208.
273. Depeint, F.*et al. American Journal of Clinical Nutrition* **2008**, 87, 785.
274. Vujcic, Z., Rantec, **2002**.
275. Prodanovic, R. M.*et al. Journal of Serbian Chemical Society* **2003**, 68, 819
276. Atkinson, A. *et al. Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **1973**, 23, 517.
277. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/lipoprotein_lipase.pdf.
278. Prodanović, R. Doktorska disertacija, Beograd, **2006**.
279. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/alpha_glucosidase_sed.pdf.
280. http://www.toyobo-global.com/seihin/xr/enzyme/pdf_files/129_132BGH_201.pdf.
281. Timerman, A. P. In *Protein purification*; Rhizwan, A., Ed.; InTech Open: Rijeka, **2012**, p 29.
282. Laemli, U. K. *Nature* **1970**, 227, 680.
283. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0007891_NuPAGE_BisTris_MiniGels.pdf.
284. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/colloidalstain_man.pdf.
285. Konozy, E. H. E.*et al. Journal of Plant Research* **2013**, 126, 251.
286. Perkins, D. N.*et al. Electrophoresis* **1999**, 20, 3551.
287. Pedretti, A.*et al. Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2004**, 18, 167.
288. Goodford, P. J. *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, 28, 849.
289. <http://www.pymol.org>.
290. Holm, L.*et al. Bioinformatics* **2000**, 16, 566.
291. Suckau, D.*et al. Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **1992**, 89, 5630
292. Lu, Z. Y.*et al. Organic Letters* **2010**, 12, 480.
293. Appendino, G.*et al. Organic Letters* **2002**, 4, 3839.

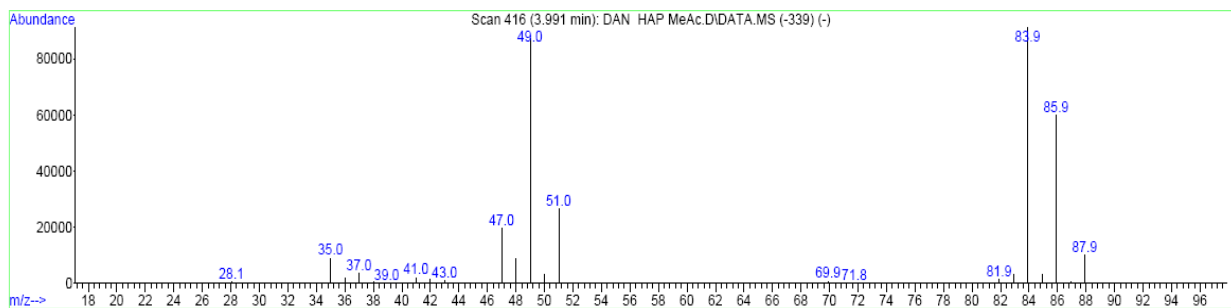
6. PRILOZI

6.1 Strukturna karakterizacija vanilil-laurata



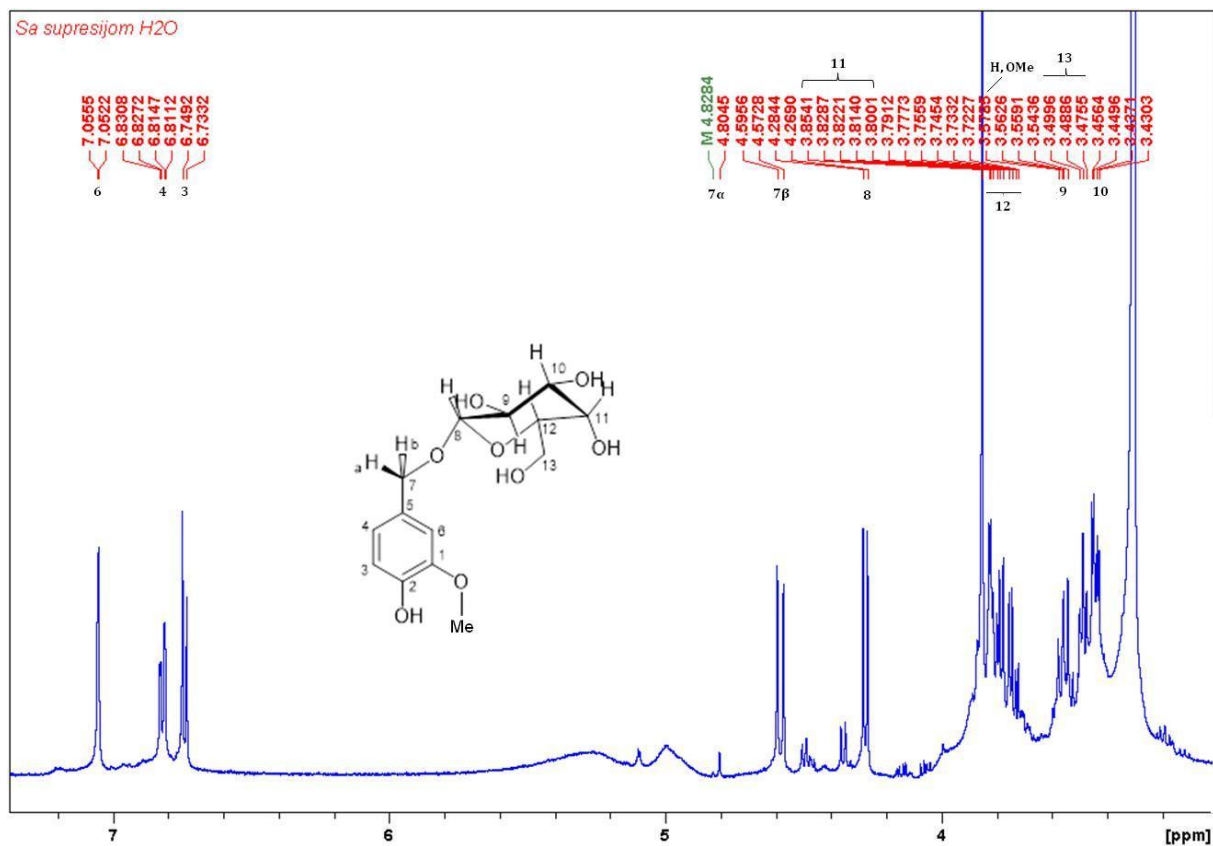
Prilog 1: Identifikacija vanilil-laurata ^1H NMR spektroskopijom (200 MHz; CDCl_3). **A)** ^1H NMR spektar hemijski sintetizovanog standarda vanilil-laurata; **B)** ^1H NMR spektar vanilil-laurata dobijenog esterifikacijom vanilil-alkohola, katalizovanom sa CRL.

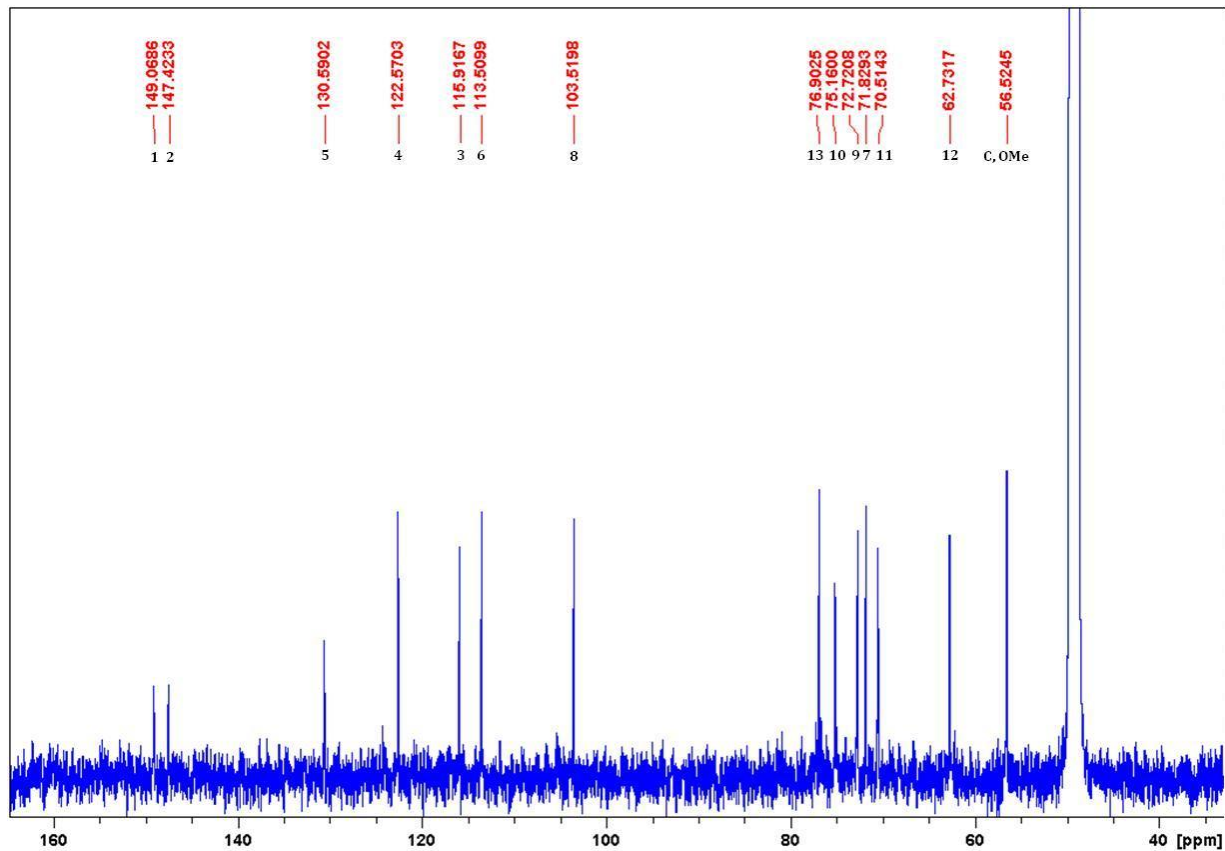
6.2 Potvrda strukture metil-etanoata



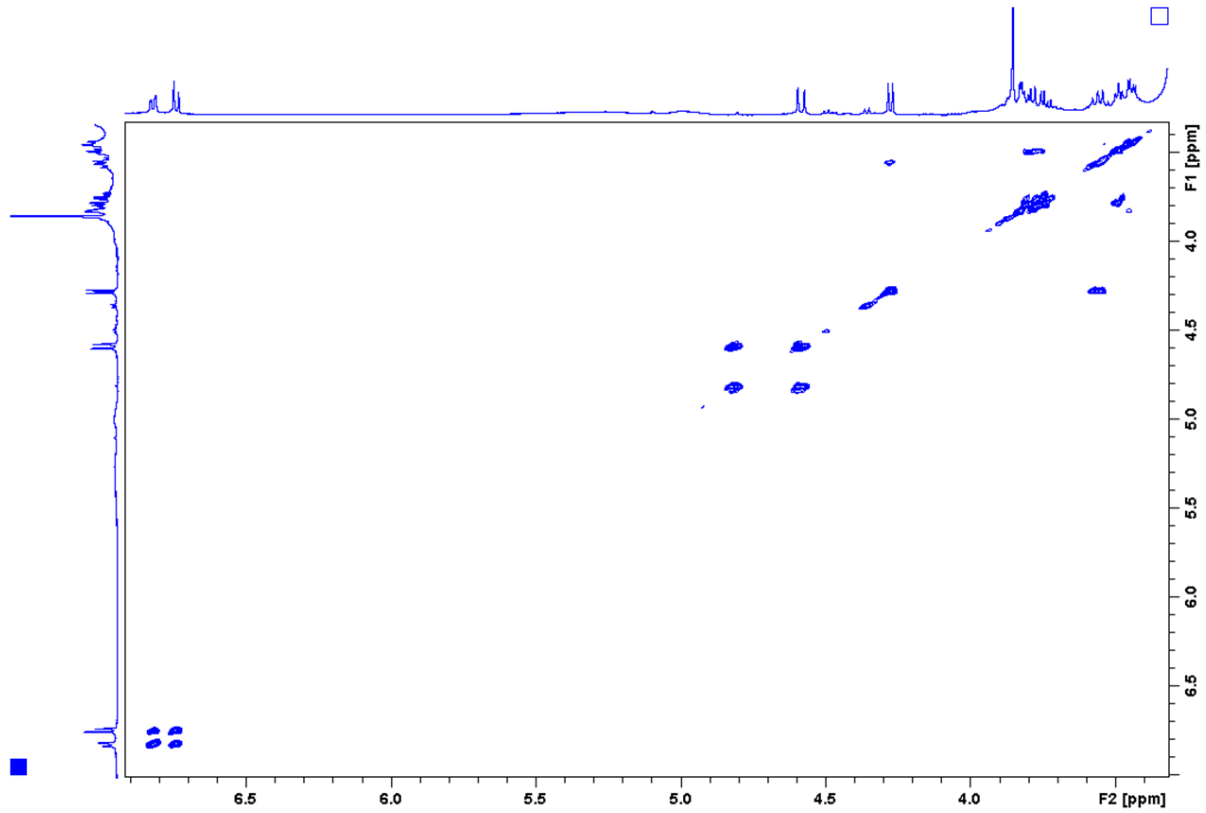
Prilog 2: Maseni spektar metil-etanoata, sintetisanog katalitičkim dejstvom imobilizata lipaze iz Candida rugosa na hidroksiapatitu.

6.3 Strukturna karakterizacija vanilil-galaktozida

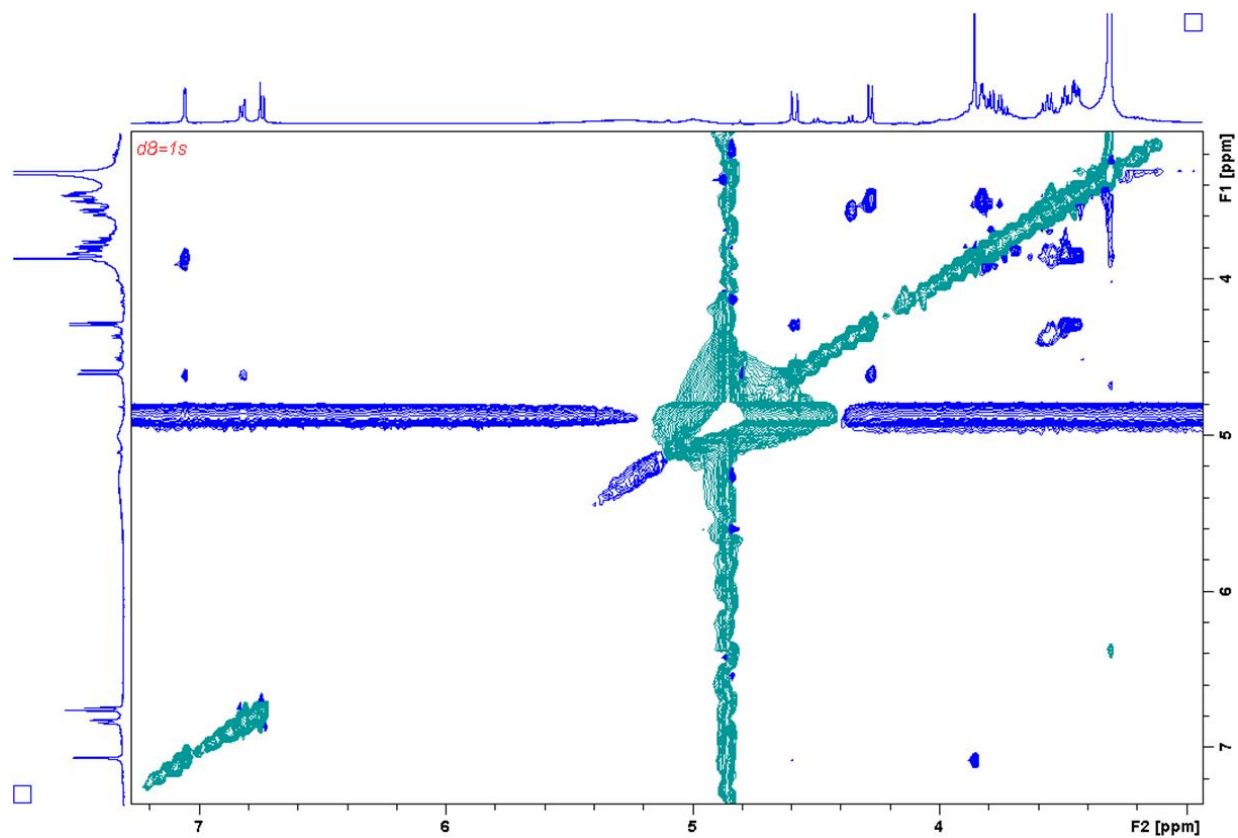




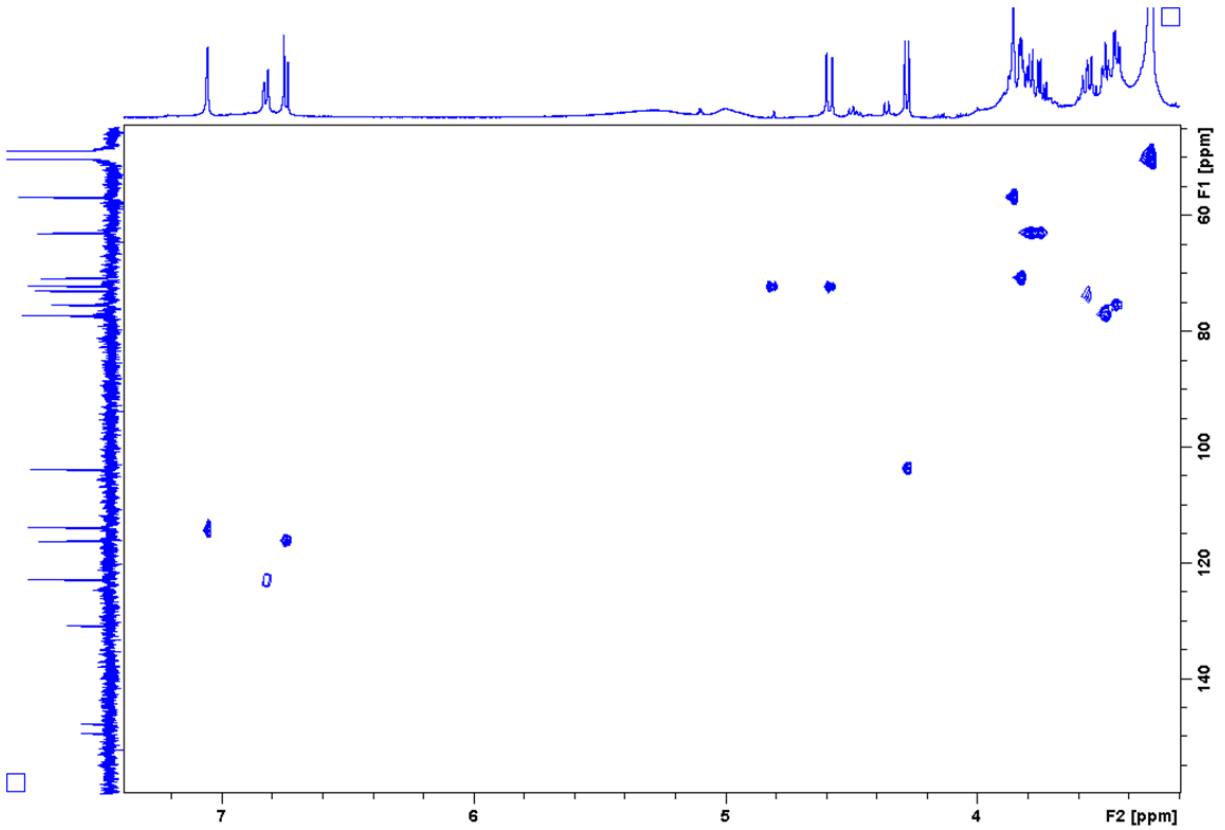
Prilog 4: ^{13}C NMR spektar vanilil-galaktozida.



Prilog 5: COSY spektar vanilil-galaktozida.



Prilog 6: NOESY spektar vanilil-galaktozida.



Prilog 7: HSQC spektar vanilil-galaktozida.

BIOGRAFIJA

Jovana (Jovan) Trbojević Ivić je rođena 25.07.1988. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovne akademske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijski program *biohemija*) je upisala 2007. godine, a završila 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,77 i ocenom 10 na odbrani završnog rada. Master akademske studije na istom fakultetu i studijskom programu je upisala 2012. godine, a završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,80 i ocenom 10 na odbrani master rada. Doktorske akademske studije na studijskom programu *biohemija* je upisala 2014. godine.

Na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije je bila angažovana u dva navrata. U periodu od 2012. do 2013. godine je bila zaposlena na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u zvanju *istraživač-pripravnik* (projekat: 451-03-2372-IP). Od 2015. godine je angažovana na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u okviru tekućeg projekta (oznaka: IO172049), prvo u zvanju *istraživač-pripravnik*, a od 14.02.2019. godine u zvanju *istraživač-saradnik*.

Glavna oblast naučnog interesovanja doktoranda je enzimologija, tačnije ispitivanje uticaja različitih tehnika i nosača za imobilizaciju na stabilnost i aktivnost industrijski značajnih lipaza i glikozidaza, u cilju proširenja primene ovih enzima na biotehnološku proizvodnju jedinjenja od značaja za prehrambenu, kozmetičku i farmaceutsku industriju u nevedenim reakcionim sistemima.

Jezici koje koristi: srpski (maternji), engleski, nemački i španski. Udata je, majka jednog deteta.

BIBLIOGRAFIJA

Doktorand, Jovana Trbojević Ivić, je do sada objavila ukupno sedam naučnih radova i osam saopštenja na skupovima međunarodnog (**M33**) i nacionalnog značaja (**M64**), štampanih u

celini ili u izvodu. Iz ove doktorske disertacije proistekla su ukupno tri naučna rada (dva iz kategorije **M21a**, jedan iz kategorije **M21**), kao i tri saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (kategorija **M64**).

Radovi iz doktorske disertacije kandidata objavljeni u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a):

1. Trbojevic Ivic J, Milosavic N, Dimitrijevic A, Gavrovic Jankulovic M, Bezbradica D, Kolarski D, Velickovic D. Synthesis of medium-chain length capsinoids from coconut oil catalyzed by *Candida rugosa* lipases. Food Chemistry, 2017; 218: 505.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616314340?via%3Dihub>
2. Trbojevic Ivic J, Velickovic D, Dimitrijevic A, Bezbradica D, Dragacevic V, Gavrovic Jankulovic M, Milosavic N. Design of biocompatible immobilized *Candida rugosa* lipase with potential application in food industry. Journal of the Science of Food and agriculture, 2016; 96 (12): 4281.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.7641>

Rad iz doktorske disertacije kandidata objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21):

1. Trbojevic Ivic J, Dimitrijevic A, Milosavic N, Bezbradica D, Drakulic BJ, Gavrovic Jankulovic M, Pavlovic M, Rogniaux H, Velickovic D. Assessment of the interacting mechanism between *Candida rugosa* lipases and and hydroxyapatite and identification of hydroxyapatite-binding sequence through proteomics and molecular modelling. RSC Advances, 2016; 6: 34818.
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/RA/C6RA07521E#!divAbstract>

Rezultati iz doktorske disertacije kandidata saopšteni na skupovima nacionalnog značaja i štampani u izvodu (M64):

1. Dragacevic V, Trbojevic Ivic J, Mutic J, Bezbradica D. Optimizacija proizvodnje i analitika biodizela iz dobijenog katalitičkom aktivnošću lipaze B *Candidae*

- antarcticae*. III Konferencija mladih hemičara Srbije. Beograd, 24. Oktobar 2015. BBP09, Zbornik radova, str. 68.
2. Trbojevic Ivic J, Dragacevic V, Dimitrijevic A, Gavrovic Jankulovic M. Lipaze iz *Candida rugosa* imobilizovane na hidroksiapatitu: stabilan biokatalizator sa velikim industrijskim potencijalom. III Konferencija mladih hemičara Srbije. Beograd, 24. Oktobar 2015. BBP09, Zbornik radova, str. 69.
3. Trbojevic Ivic J, Velickovic D, Dimitrijevic A, Bezbradica D, Gavrovic Jankulovic M, Milosavic N. Stabilizacija lipaza iz *Candida rugosa* jednostavnom i efikasnom imobilizacijom na hidroksiapatitu. 52. Savetovanje Srpskog hemijskog društva. Novi Sad, 29.-30. maj 2015. BTO2, Zbornik radova, str. 99.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Јована Ј. Трбојевић Ивић _____

Број индекса _____ ДБ06/2014 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Нови аспекти употребе хидроксиапатита као носача за имобилизацију индустријски значајних липаза и гликозидаза – дизајн, испитивање механизма везивања, стабилност, примена и значај“

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

Потпис аутора

Јована Трбојевић Ивић

У Београду, 28.11.2019.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Јована Ј. Трбојевић Ивић

Број уписа _____ ДБ06/2014

Студијски програм _____ Биохемија

Наслов рада

„Нови аспекти употребе хидроксиапатита као носача за имобилизацију индустријски значајних липаза и гликозидаза – дизајн, испитивање механизма везивања, стабилност, примена и значај“

Ментор _____ проф. др Марија Гавровић Јанкуловић

Потписани _____ Јована Ј. Трбојевић Ивић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

Јована Трбојевић Ивић

У Београду, 28.11.2019.

Изјава о коришћењу

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

„Нови аспекти употребе хидроксиапатита као носача за имобилизацију индустријски значајних липаза и гликозидаза – дизајн, испитивање механизма везивања, стабилност, примена и значај“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда



У Београду, 28.11.2019.