

Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

Marija D. Stanišić

Imobilizacija hemijski modifikovanih i mutantnih
varijanti enzima peroksidaze iz rena (*Armoracia
rusticana*) i glukoza-oksidade iz gljive *Aspergillus
niger* sintezom biokompozitnih materijala

doktorska disertacija

Beograd, 2026. godine

University of Belgrade
Faculty of Chemistry

Marija D. Stanišić

Immobilization of chemically modified and mutants of the enzymes horseradish peroxidase (*Armoracia rusticana*) and glucose oxidase from *Aspergillus niger* through the synthesis of biocomposite materials

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Članovi komisije:

Dr Marija Gavrović - Jankulović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, predsednik Komisije

Dr Radivoje Prodanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, mentor

Dr Dalibor Stanković, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Dr Olivera Prodanović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Dr Milan Senćanski, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke “Vinča” – Univerzitet u Beogradu, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za biohemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, pod rukovodstvom prof. dr Radivoja Prodanovića, redovnog profesora. Budući da ona ne predstavlja samo moj lični uspeh, već zajednički uspeh svih koji su svojom podrškom, znanjem i pomoći doprineli njenom nastanku ovim putem želim da im se iskreno zahvalim.

Najpre, hvala dr Radivoju Prodanoviću, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta što je svih ovih godina bio čovek, mentor i profesor. Hvala za svo preneto znanje, savete i pomoć tokom izrade diplomskog i master rada, a na kraju i same doktorske disertacije. Ovaj dosadašnji naučni put nije bio nimalo lak, ali se uz lepu saradnju sve lakše savladalo. Mentore, hvala za sve!

Prof. dr Mariji Gavrović-Jankulović, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, iskreno se zahvaljujem na prenetom znanju tokom studija, kao i na tome što je prihvatila da bude član Komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem na korisnim savetima, konstruktivnim sugestijama i izdvojenom vremenu, koji su značajno doprineli unapređenju kvaliteta i konačnom obliku ove disertacije.

Dr Oliveri Prodanović, višem naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu – Instituta za multidisciplinarna istraživanja, upućujem posebnu zahvalnost na nesebičnoj pomoći i podršci naročito tokom eksperimentalnog dela ovog istraživanja, čime je značajno doprinela uspešnoj realizaciji i kvalitetu ove doktorske disertacije. Takođe, iskreno Vam se zahvaljujem što ste prihvatili poziv da budete član Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije i svojim savetima, sugestijama i komentarima doprineli njenom konačnom obliku.

Prof. dr Daliboru Stankoviću, vanrednom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, hvala što je prihvatio da bude član Komisije za ocenu i odbranu i što je svojim ispravkama, sugestijama i komentarima doprineo njenom sadašnjem izgledu.

Dr Milanu Senčanskom, naučnom savetniku Univerziteta u Beogradu – Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ hvala za pomoć u izradi ove doktorske disertacije, a posebno na tome što je prihvatio da bude član Komisije za ocenu i odbranu, i što je svojim komentarima, tumačenjima i objašnjenjima doprineo potpunijem izgledu ove doktorske disertacije.

Ovom prilikom želim da se, takođe, zahvalim svim profesorima, asistentima i tehničkim saradnicima Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta na prenetom znanju, savetima i podršci koju su mi pružili tokom svih nivoa studija.

Svim članovima laboratorije 434 neizmerno hvala na podršci, razmeni znanja i veština i ono najvažnije, lepo provedenom vremenu svih ovih godina i velikom broju lepih trenutaka. Posebno hvala Nini pod čijom supervizijom sam započela svoj rad u ovoj laboratoriji i čije znanje, pomoć i podrška su mi bili od velikog značaja, a posebno na lepom druženju svih ovih godina u laboratoriji i van nje. Veliku zahvalnost dugujem mojoj Milici, lab partneru, za timski rad, savete i motivaciju tokom svih ovih godina, ali i za iskreno prijateljstvo.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem i članovima laboratorije 429 na pomoći, podršci i lepo provedenom zajedničkom vremenu. Zahvalnost dugujem i dr Neveni Surudžić, iz laboratorije Instituta za multidisciplinarna istraživanja na pruženoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije. Hvala i dr Raluki Ostafe, profesoru na Purdue University, na pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije. Takođe, hvala i dr Tamari Todorović, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, na prilici za učešće na projektu, u okviru kog je urađen deo rezultata

ove doktorske disertacije. Zahvalnost dugujem i dr Maji Stojiljković, naučnom savetniku Univerziteta u Beogradu – Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, za priliku u učešću na projektu koji nije deo ove teze, ali je proširo moje znanje.

Veliku zahvalnost dugujem i svojim diplomcima Ani, Aleksandri, Uni i Neveni na pomoći i lepoj saradnji tokom izrade njihovih završnih radova, a koji su takođe deo ove doktorske disertacije.

Mojim drugarima iz gimnazije i sa studija hvala što su bili uz mene sve vreme, podržavali me, slušali i pomagali. Marko, Miloše, Bojane, Andrijana, Monika, Milice, Isidora, Filipe, Nemanja i Đorđe hvala vam za sve. Tebi, Andri, posebno hvala na lepim trenucima i iskrenom prijateljstvu tokom svih ovih godina i što si uvek bila tu za mene.

Posebno hvala mom najvećem prijatelju, Ani, što me je u svakom životnom koraku podržavala i bila uvek uz mene. Kažu da su prava prijateljstva ona koja traju više od deset godina, a ovo naše je odavno prešlo tu vremensku granicu. Neizmerno ti hvala što si me svaki put saslušala, pomogla i dala savet, a posebno hvala na svim lepo provedenim trenucima, kojih je bilo mnogo, a biće ih nadam se još više.

Mojoj široj porodici, svim babama i dedama, tetkama, strinama, ujnama, ujacima, stričevima i tečama hvala za svu ljubav i podršku. Pokazali ste da je biti najstariji od najmlađe generacije velika sreća. Hvala vam što ste svaki dosadašnji uspeh proslavljali i radovali mu se. Međutim, kako to obično biva kada ste na jednoj strani privilegovani na drugoj platite cenu. Pa tako hvala svim članovima šire porodice, koji ste se kasnije rodili i uvek bili slatki, radoznali, brižni i ponekad malo dosadni kad se trebalo odmoriti od svega.

Za podršku, razumevanje, pažnju i prelepe trenutke koji su umor pred kraj učinili lakšim, hvala jednoj posebnoj osobi. Kažu da je u ostvarivanju cilja veoma važan kraj, a kraj ovog cilja je bio posebno lep zahvaljujući tebi, Miloše.

Najveću zahvalnost i poštovanje dugujem svojoj porodici, mami, tati i Luki. Mama i tata, biti vaše dete je prava nagrada u životu. Za ovih trideset godina, svakom mom uspehu ste se radovali možda čak i više nego ja, a nijedan problem nije bio nerešiv zahvaljujući vama. A Luka, iako je dosta mlađi, ulogu brata obavlja na najbolji mogući način! Znam da znate koliko sam ponosna na nas što smo sve ovo zajedno uspeali. Hvala vam za svu ljubav, veru u mene i neizmernu podršku ceo život.

Nažalost, kraj ove doktorske disertacije, i priliku da oseti sreću nije dočekaao neko ko je meni u životu bio velika podrška, oslonac i neko sa kim sam mnogo vremena provela razgovarajući o svemu, moj deda. Moj dragi deda, nikada neću i ne mogu zaboraviti svu tvoju ljubav. Znam da si sada gore najponosniji deda na svetu. Za sve ove tri godine od kako nisi sa nama, nema ni dana ni događaja da te se ne setimo i da nam nedostaješ. Zauvek ću te voleti i o tebi sa najvećim ponosom pričati.

Tezu posvećujem svojoj porodici

Marija

Imobilizacija hemijski modifikovanih i mutantnih varijanti enzima peroksidaze iz rena (*Armoracia rusticana*) i glukoza-oksidade iz gljive *Aspergillus niger* sintezom biokompozitnih materijala

Sažetak

U ovoj doktorskoj disertaciji razvijeni su novi biokompozitni materijali peroksidaze iz rena (*Armoracia rusticana*, HRP) i glukoza-oksidade iz gljive *Aspergillus niger* (GOx), sa ciljem unapređenja aktivnosti, stabilnosti, efikasnosti imobilizacije i mogućnosti višestruke upotrebe enzima. Ispitivani su komercijalni, hemijski modifikovani i mutantni oblici enzima, dobijeni primenom proteinskog inženjeringa i bioinformatičke metode informacionog spektra (ISM).

GOx i HRP su hemijski modifikovane perjodatnom oksidacijom ugljenohidratne komponente, kao i dodatnom funkcionalizacijom GOx L-histidinom i L-aspartatom. Pokazano je da promene površinskog naelektrisanja i uvođenje funkcionalnih grupa značajno utiču na biomimetičku mineralizaciju, interakcije sa Zn^{2+} jonima i formiranje enzim@ZIF biokompozita. Dobijeni biokompoziti su okarakterisani fizičko-hemijskim, strukturnim i kinetičkim metodama.

Mutantne varijante GOx i HRP su pokazale značajna poboljšanja u katalitičkim parametrima, stabilnosti i pogodnosti za imobilizaciju. Kod GOx mutanata utvrđena je povezanost između amplituda karakterističnih ISM frekvencija i eksperimentalno određenih kinetičkih parametara, što potvrđuje upotrebljivost ISM metode za racionalni izbor mutacija.

GOx@ZIF i HRP@ZIF biokompoziti su pokazali poboljšanu specifičnu aktivnost, veću stabilnost u prisustvu SDS-a ili soli i bolju termostabilnost i stabilnost u organskim rastvaračima u odnosu na odgovarajuće rastvorne enzime. HRP@ZIF-8 sistemi su dodatno enkapsulirani u alginatne hidrogelove, čime su dobijeni hibridni biokompoziti sa poboljšanom mehaničkom stabilnošću, lakšim izdvajanjem iz reakcione smeše i potencijalom za višekratnu upotrebu.

Dobijeni rezultati doprinose boljem razumevanju odnosa između strukture enzima, hemijske modifikacije, mutageneze, biomimetičke mineralizacije i funkcionalnih osobina enzim@ZIF i enzim@ZIF@hidrogel biokompozita. Razvijeni sistemi predstavljaju perspektivne biokatalizatore za primenu u biokatalizi, biosenzorima i zaštiti životne sredine.

Ključne reči: glukoza-oksida; peroksida iz rena; imobilizacija enzima; biokompozitni materijali; zeolitski imidazolatni okviri; ZIF-8; ZIF-zni; biomimetička mineralizacija; proteinski inženjering; metoda informacionog spektra

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Immobilization of chemically modified and mutants of the enzymes horseradish peroxidase (*Armoracia rusticana*) and glucose oxidase from *Aspergillus niger* through the synthesis of biocomposite materials

Abstract

In this doctoral dissertation, new biocomposite materials based on horseradish peroxidase (*Armoracia rusticana*, HRP) and glucose oxidase from the fungus *Aspergillus niger* (GOx) were developed to improve enzyme activity, stability, immobilization efficiency, and reusability. Commercial, chemically modified, and mutant enzyme forms were investigated, including variants obtained through protein engineering and bioinformatic analysis using the Informational Spectrum Method (ISM).

GOx and HRP were chemically modified by periodate oxidation of their carbohydrate components, while GOx was additionally functionalized with L-histidine and L-aspartate. It was shown that changes in surface charge and the introduction of functional groups significantly affect biomimetic mineralization, interactions with Zn^{2+} ions, and the formation of enzyme@ZIF biocomposites. The obtained biocomposites were characterized using physicochemical, structural, and kinetic methods.

Mutant variants of GOx and HRP exhibited significant improvements in catalytic parameters, stability, and suitability for immobilization. In the case of GOx mutants, a relationship was established between the amplitudes of characteristic ISM frequencies and experimentally determined kinetic parameters, confirming the applicability of the ISM method for the rational selection of mutations.

GOx@ZIF and HRP@ZIF biocomposites exhibited improved specific activity, greater stability in the presence of SDS or salts, and enhanced thermostability and stability in organic solvents compared with their soluble counterparts. HRP@ZIF-8 systems were further encapsulated in alginate hydrogels, yielding hybrid biocomposites with improved mechanical stability, easier separation from the reaction mixture, and potential for repeated use.

The results obtained contribute to a better understanding of the relationships among enzyme structure, chemical modification, mutagenesis, biomimetic mineralization, and the functional properties of enzyme@ZIF and enzyme@ZIF@hydrogel biocomposites. The developed systems represent promising biocatalysts for applications in biocatalysis, biosensors, and environmental protection.

Keywords: glucose oxidase; horseradish peroxidase; enzyme immobilization; biocomposite materials; zeolitic imidazolate frameworks; ZIF-8; ZIF-zni; biomimetic mineralization; protein engineering; Informational Spectrum Method

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Lista skraćenica

- ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzotiazol-6-sulfonska kiselina)
- BCG – eng. *buffered glycerol-complex*
- BET analiza – Brunauer–Emmett–Teller analiza
- BMG – eng. *buffered minimal glycerol*
- BMM- eng. *buffered minimal methanol*
- CBB – eng. *Comasie Brilliant Blue*
- DEAE – dietilaminoetil
- DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
- DTT – ditiotritol
- EDTA – etilendiamin-tetrasirćetna kiselina
- FAD – flavin-adenin-dinukleotid
- FESEM – skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja
- G – α -D-guluronska kiselina
- GOx – glukoza - oksidaza
- HR- MOF – visoko porozni metal-organski okviri odnosno visoko porozne metal-organske umrežene strukture
- HRP – peroksidaza iz rena (*Armoracia rusticana*)
- IRMOF – izoretikularni metal-organski okviri odnosno izoretikularne metal-organske umrežene strukture
- ISM – eng. *informational spectrum method*
- LB – Luria - Bertani
- M – α -D-manuronska kiselina
- MIL – materijali sintetisani u *Materials Institute Lavoisier (Institut Lavoisier de Versailles)*
- MOF – metal-organski okviri odnosno metal-organske umrežene strukture
- NMR – nuklearna magnetna rezonancija
- PBS – puferisani fiziološki rastvor (eng. *phosphate buffered saline*)
- PXRD – rendgenska strukturna analiza uzoraka prahova
- SDS – natrijum-dodecil-sulfat
- SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija
- SOC – super optimalni tečni medijum

TBE – tris-borat-edta

TLL – lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*

UV – ultraljubičasta spektroskopija eng. *ultraviolet spectroscopy*

YPD – eng. *yeast peptone dextrose*

ZIF – zeolitski imidazolatni okviri (eng. *Zeolitic Imidazolate Frameworks*)

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	OPŠTI DEO.....	2
2.1.	Glukoza-oksidaža	2
2.1.1.	Strukturni i kinetički parametri glukoza-oksidaže.....	2
2.1.2.	Katalitički mehanizam glukoza-oksidaže	4
2.2.	Peroksidaža iz rena	4
2.2.1.	Strukturni i kinetički parametri peroksidaže iz rena	5
2.2.2.	Katalitički mehanizam peroksidaže iz rena	6
2.3.	Hemijske modifikacije enzima.....	7
2.3.1.	Hemijska modifikacija glikoproteina perjodatom.....	8
2.4.	Proteinski inženjering.....	9
2.4.1.	Bioinformatičke metode.....	10
2.4.2.	Orijentisana imobilizacija	13
2.4.3.	Ekspresioni sistemi	15
2.5.	Imobilizacija enzima	16
2.5.1.	Metode imobilizacije enzima	17
2.5.2.	Imobilizacija enzima u metal-organskim okvirima	18
2.5.3.	Alginat.....	21
3.	CILJ	25
4.	EKSPERIMENTALNI DEO.....	26
4.1.	Mikrobiološke metode	26
4.1.1.	Podloge za rast bakterija	26
4.1.2.	Podloge za rast kvasaca	26
4.1.3.	Pripremanje kompetentnih ćelija	28
4.2.	Molekularno-biološke metode	28
4.2.4.	Transformacija kompetentnih <i>E.coli</i> ćelija.....	28
4.2.5.	Izolovanje plazmida iz bakterija	28
4.3.	Eksperimenti i prečišćavanje enzima (glukoza oksidaža i peroksidaža iz rena)	29
4.3.1.	Transformacija <i>P. pastoris</i> KM71H.....	29
4.3.2.	Eksperimenti enzima u <i>P. pastoris</i> KM71H	29
4.3.3.	Prečišćavanje eksprimiranih proteina metodom jonoizmenjivačke hromatografije.....	30
4.5.	Analitičke metode.....	30
4.5.1.	Određivanje koncentracije proteina spektroskopskom metodom.....	30
4.5.2.	Agarozna DNK elektroforeza	30
4.5.3.	SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	31

4.5.4.	Nativna elektroforeza	31
4.5.5.	Detekcija aktivnosti enzima u nativnom gelu (zimogram)	32
4.5.6.	Dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (2D PAGE).....	32
4.6.	Fizičko-hemijske metode za karakterizaciju materijala	33
4.6.1.	Određivanje zeta potencijala uzoraka	33
4.6.2.	Rendgenska strukturna analiza uzoraka prahova (PXRD).....	33
4.6.3.	Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja (FESEM)	33
4.7.	Hemijske modifikacije enzima.....	33
4.7.1.	Izolovanje HRP-C1A izoforme	33
4.7.2.	Perjodatna oksidacija enzima (HRP i GOx).....	34
4.7.3.	Hemijske modifikacije GOx L-aspartatom i L-histidinom.....	34
4.8.	Imobilizacija enzima (GOx i HRP) u različitim ZIF-ovima metodom biomimetičke mineralizacija.....	34
4.8.1.	Imobilizacija GOx u ZIF-8 metodom biomimetičke biomineralizacije	34
4.8.2.	Imobilizacija HRP u ZIF-8 metodom biomimetičke biomineralizacije	35
4.8.3.	Biomimetička mineralizacija GOx u ZIFzni.....	35
4.8.4.	Sinteza hibridnih HRP@ZIF-8@hidrogel biokompozita	35
4.9.	Karakterizacija enzima	36
4.9.1.	Određivanje aktivnosti enzima.....	36
4.9.2.	Određivanje kinetičkih parametara enzima	36
4.9.3.	Određivanje temperaturne stabilnosti enzima.....	36
4.9.4.	Određivanje pH optimuma enzima	37
4.9.5.	Određivanje supstratne specifičnosti glukoza-oksidade.....	37
4.10.	Karakterizacija biokompozita	37
4.10.1.	Određivanje specifične aktivnosti biokompozita.....	37
4.10.2.	Stabilnost biokompozita u organskom rastvaraču.....	37
4.10.3.	Temperaturna stabilnost biokompozita	37
4.10.4.	Višekratno korišćenje biokompozita (ciklusi).....	38
4.10.5.	Određivanje aktivnosti hibridnih HRP@ZIF-8@ALG biokompozita	38
4.10.6.	Određivanje pH optimuma hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG	38
4.10.7.	Određivanje stabilnosti hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG u dioksanu	38
4.10.8.	Dekolorizacija boje <i>Evans Blue</i> i <i>Methyl Orange</i> pomoću HRP@ZIF-8@ALG	38
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	40
5.1.	Imobilizacija perjodarno oksidovane GOx u ZIF-8	40
5.1.1.	Perjodatna oksidacija glukoza-oksidade.....	40
5.1.2.	Biomineralizacija komercijalne native i perjodarno oksidovane glukoza-oksidade u ZIF-8	42

5.1.3.	Kinetički parametri imobilizacije native i oksidovane glukoza-oksidge u ZIF-8	44
5.1.4.	Termostabilnost kompozita GOx@ZIF-8 i oxGOx@ZIF-8	45
5.2.	Imobilizacija HRP-C izoforme u ZIF-8.....	46
5.2.1.	Prečišćavanje i perjodatna oksidacija peroksidaze iz rena	46
5.2.2.	Biominalizacija native i perjodarno oksidovane peroksidaze iz rena.....	50
5.2.3.	Kinetički parametri imobilizacije native i oksidovane peroksidaze iz rena u ZIF-8	52
5.2.4.	Termostabilnost kompozita HRP@ZIF-8 i oxHRP@ZIF-8	53
5.3.	Imobilizacija L-histidinom i L-aspartatom modifikovane GOx u ZIF-8	54
5.3.1.	Hemijaska modifikacija glukoza-oksidge perjodatom oksidacijom i L-histidinom i L-aspartatom.....	54
5.3.2.	Biominalizacija hemijski modifikovane GOx	56
5.3.3.	Kinetički parametri imobilizacije hemijski modifikovane glukoza-oksidge u ZIF-8	57
5.3.4.	pH optimumi rastvornih oblika komercijalne native i hemijski modifikovane glukoza-oksidge i enzim@ZIF-8 biokompozita	60
5.3.5.	Temperaturna stabilnost cGOx@ZIF-8, D-GOx@ZIF-8 i H-GOx@ZIF-8 biokompozita ..	62
5.3.6.	Operativna stabilnost H-GOx@ZIF-8 biokompozita.....	63
5.4.	Uticaj vrste i koncentracije imidazolatnog liganda na imobilizaciju GOx u ZIF	64
5.4.1.	Uticaj koncentracije liganda na fizičko-hemijske osobine GOx@ZIF-zni biokompozita	64
5.4.2.	Kinetički parametri GOx@ZIF-zni biokompozita	66
5.4.3.	Termostabilnost biokompozita GOx@ZIF-zni	69
5.5.	Ekspresija i karakterizacija mutanata glukoza-oksidge u <i>Pichia pastoris</i> KM71H	71
5.5.1.	Bioinformatička analiza GOx i predviđanje mutanata GOx ISM metodom	71
5.5.2.	Izolovanje plazmida odgovarajućih mutanata i linearizacija plazmida	72
5.5.3.	Ekspresija i prečišćavanje K152D mutanta glukoza-oksidge	73
5.5.4.	Ekspresija i prečišćavanje K152C mutanta GOx.....	76
5.5.5.	Ekspresija i prečišćavanje D180E mutanta GOx.....	79
5.5.6.	Ekspresija i prečišćavanje D180L mutanta GOx.....	82
5.5.7.	Ekspresija i prečišćavanje F484N mutanta GOx.....	84
5.5.8.	Ekspresija i prečišćavanje F484H mutanta GOx.....	87
5.5.9.	Uredni pregled kinetičkih parametara za mutante GOx	89
5.5.10.	Korelacija kinetičkih parametara mutanata GOx sa ISM metodom	90
5.5.11.	Imobilizacija mutanata glukoza-oksidge u ZIF-8 metodom biomimetičke mineralizacije	92
5.6.	Ekspresija i karakterizacija <i>wild type</i> i mutanata peroksidaze iz rena	94
5.6.1.	Kinetička karakterizacija mutanata HRP	98
5.6.2.	Određivanje pH optimuma mutanata HRP	98
5.6.3.	Imobilizacija <i>wild type</i> i mutanata HRP u ZIF-8	99
5.7.	Imobilizacija HRP u hibridnim biokompozitima u ZIF-8 i alginatu.....	100

5.7.1.	Optimizacija koncentracije HRP u HRP@ZIF-8 biokompozitima	101
5.7.2.	Optimizacija koncentracije HRP@ZIF-8 u alginatnim mikrokuglicama	101
5.7.1.	Karakterizacija hibridnih HRP@ZIF-8@ALG biokompozita	102
5.7.2.	Obezbojavanje sintetičkih boja hibridnim HRP@ZIF-8@Alginat biokompozitima.....	104
6.	Zaključak.....	107
7.	Literatura	109

1. UVOD

Enzimi predstavljaju visoko selektivne i efikasne biokatalizatore koji imaju značajnu primenu u industriji, biotehnologiji, medicini i zaštiti životne sredine. Njihova sposobnost da katalizuju složene hemijske reakcije pod blagim uslovima čini ih izuzetno atraktivnim za primenu u savremenim biotehnološkim procesima. Međutim, šira industrijska primena enzima često je ograničena njihovom nedovoljnom stabilnošću pri povišenoj temperaturi, u prisustvu organskih rastvarača, pri neoptimalnim pH vrednostima i u uslovima oksidativnog stresa. Pored toga, rastvorni enzimi se teško izdvajaju iz reakcione smeše i imaju ograničenu mogućnost višestruke upotrebe, što povećava troškove procesa i smanjuje ekonomsku isplativost njihove primene.

Jedna od najefikasnijih strategija za prevazilaženje ovih ograničenja jeste imobilizacija enzima na čvrstim nosačima. Imobilizacijom se mogu poboljšati stabilnost, aktivnost i operativne performanse enzima, uz omogućavanje njihovog lakšeg odvajanja iz reakcione smeše i ponovne upotrebe. U poslednjih nekoliko godina značajnu pažnju privukli su metal-organski okviri (MOF-ovi), a posebno zeolitski imidazolatni okviri (ZIF-ovi), zbog svoje poroznosti, strukturne organizovanosti, hemijske stabilnosti i mogućnosti kontrolisane sinteze. Posebno se izdvaja ZIF-8, zeolitski imidazolatni okvir na bazi Zn(II) jona i 2-metilimidazola, koji pokazuje veoma dobre karakteristike kao nosač za imobilizaciju enzima procesom biomimetičke mineralizacije.

Pored izbora odgovarajućeg nosača, važan faktor koji utiče na efikasnost imobilizacije predstavljaju i osobine samog enzima. Hemijska modifikacija aminokiselinskih ostataka ili ugljenohidratne komponente na površini enzima može dovesti do promena površinskog naelektrisanja i poboljšanja interakcija između enzima i nosača. Takođe, primena metoda proteinskog inženjeringa omogućava dobijanje mutančnih varijanti enzima sa povećanom aktivnošću, stabilnošću i unapređenim osobinama pogodnim za imobilizaciju.

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćena su dva industrijski značajna enzima: peroksidaza iz rena (*Armoracia rusticana*) i glukoza-oksidadza iz gljive *Aspergillus niger*. Peroksidaza iz rena ima značajnu primenu u organskoj sintezi, biodegradaciji fenolnih jedinjenja i tretmanu otpadnih voda, dok se glukoza-oksidadza široko koristi u biosenzorima, prehrambenoj industriji i sistemima za kontrolisano generisanje vodonik-peroksida. Zbog široke primene ovih enzima, razvoj stabilnijih i efikasnijih imobilisanih sistema predstavlja značajan naučni i praktični izazov.

U okviru ove disertacije istraživani su kombinovani pristupi koji obuhvataju hemijsku modifikaciju i proteinski inženjering enzima, njihovu imobilizaciju u ZIF-8 i ZIF-zni biokompozitima procesom biomimetičke mineralizacije, kao i dodatnu enkapsulaciju odabranih biokompozita u alginatnim hidrogelovima radi dobijanja hibridnih biokompozitnih sistema. Posebna pažnja posvećena je optimizaciji uslova sinteze, fizičko-hemijskoj, strukturnoj i kinetičkoj karakterizaciji dobijenih materijala, kao i ispitivanju njihovih operativnih performansi u uslovima relevantnim za biotehnološku i industrijsku primenu.

Rezultati ove doktorske disertacije doprinose boljem razumevanju interakcija između enzima i čvrstih nosača tokom procesa biomimetičke mineralizacije u ZIF strukturama, kao i razvoju novih stabilnih i efikasnih biokatalitičkih sistema pogodnih za primenu u različitim oblastima biotehnologije, industrije i zaštite životne sredine.

2. OPŠTI DEO

2.1. Glukoza-oksidadza

Glukoza-oksidadza (GOx, β -D-glukoza: kiseonik 1-oksidoreduktaza, EC 1.1.3.4) predstavlja jedan od najznačajnijih flavoproteina koji pripada grupi glukoza-metanol-holin oksidoreduktaza. Ovaj enzim je pronađen u mnogim izvorima u prirodi, ali su samo neki od njih strukturno i kinetički okarakterisani. Naime, GOx je pronađena u insektima, algama i voću. [1, 2, 3] Ipak, glukoza-oksidadza se u najvećem procentu izoluje iz gljiva i to: *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *A. flavus*, *A. terreus*, kao i različitih vrsta roda *Penicillium* poput *P. sp.*, *P. pinophilum*, *P. amagasakiense*, *P. chrysogenum*, *P. notatum* i dr., pri čemu su glukoza-oksidadze iz *A. niger* i *P. amagasakiense* najbolje proučavane i okarakterisane. [4] Aktivnost ovog enzima je prvi put detektovana 1928. godine od strane Müller, nakon što je izolovana iz *Aspergillus niger* i *Penicillium glaucum*. Müller je pokazao da ovaj enzim može katalizovati oksidaciju glukoze do glukonske kiseline u prisustvu molekulskog kiseonika, dok u znatno manjoj meri može oksidovati manozu i galaktozu. [5] Deset godina kasnije je izolovan čistiji oblik glukoza-oksidadze, koji je pokazao približno 80 puta veću aktivnost u odnosu na enzim koji je prethodno opisan. [6]

Dostupni podaci iz literature koji se odnose na raspodelu glukoza-oksidadze iz *Aspergillus niger* su kontradiktorni, kako u pogledu distribucije između ekstra- i intracelularne lokacije, tako i u slučaju intracelularne lokalizacije, što podrazumeva određivanje tačnog mesta unutar ćelije. Budući da se ranije smatralo da je glukoza-oksidadza intracelularni enzim, uglavnom su sva istraživanja bila usmerena na određivanje njene precizne intracelularne lokacije. [7] Kasnije su Van Dijken i Veenhuis koristeći citohemijsko obeležavanje utvrdili da se glukoza-oksidadza nalazi u peroksizomima. [8] Međutim, Witteveen je sa saradnicima 1992. godine utvrdio da je najveći deo enzima vezan za ćelijski zid, što je potvrđeno imunocitohemijskim obeležavanjem. [9] Ova činjenica je dodatno potvrdila hipotezu da je glukoza-oksidadza isključivo ekstracelularni enzim i da se pojavljuje u ekstracelularnom medijumu kao posledica aktivne sekrecije enzima. Budući da se glukoza-oksidadza nalazi u periplazmi micelijuma *Aspergillus niger*, zbog prisustva signalne sekvence, ovaj enzim se izoluje razaranjem ćelija što je praćeno isoljavanjem kao i jonoizmenjivačkom hromatografijom. [10] Stvaranje nusproizvoda kao što su katalaze, celulaze i amilaze predstavljaju veliki problem u proizvodnji glukoza-oksidadze. Osim toga, niska efikasnost proizvodnje, otežana separacija i prečišćavanje takođe predstavljaju probleme u proizvodnji glukoza-oksidadze, što je delimično rešeno korišćenjem heterologne ekspresije za proizvodnju ovog enzima. [11]

2.1.1. Strukturni i kinetički parametri glukoza-oksidadze

Strukturne karakteristike glukoza-oksidadze iz *Aspergillus niger* i *Penicillium* su dobro proučene. Iz literature je od ranije poznato da se glukoza-oksidadza sastoji od dve identične subjedinice, pri čemu se svaki monomer sastoji od dva odvojena domena: jedan koji je uglavnom izgrađen od β -pločica, koje su čvrsto ali nekovalentno vezane za FAD, i drugi koji je izgrađen od četiri α -heliksa i antiparalelnih β pločica za koji se vezuje supstrat. [12] Ranija istraživanja koja se odnose na kompleks II pokazuju da kovalentna veza koju FAD ostvaruje ima najveću ulogu u strukturnoj stabilizaciji enzima i preciznom pozicioniranju izoaloksazinskog prstena. Sličan princip važi i za primer glukoza-oksidadze gde je primećeno da proteinsko okruženje kontroliše orijentaciju FAD-a, organizaciju vodoničnih veza i dostupnost vode u aktivnom centru. Ovakva strukturna kontrola direktno utiče na efikasnost redoks reakcija, što potvrđuje da je aktivnost enzima koji imaju FAD kao

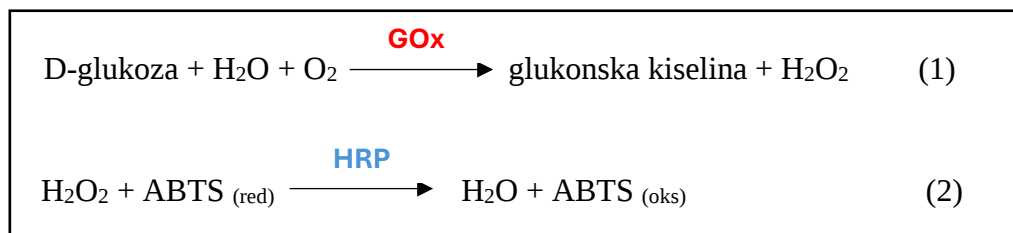
kofaktor primarno određena arhitekturom aktivnog mesta, a ne samim kofaktorom. [13] Molekulska masa u najvećoj meri zavisi od stepena glikozilacije i kreće se u rasponu od 130 do 175 kDa. [14] Glukoza-oksidadza poreklom iz *Aspergillus niger* je homodimerni flavoprotein koji sadrži N- i O-glikozilovane šećere, najčešće manozu (10-16%). Dostupni podaci pokazuju da uklanjanje oko 95% ugljenohidratne komponente ima uticaj na aktivnost enzima i njegovu stabilnost na niskom pH, ali nema uticaja na temperaturnu stabilnost i pH optimum ovog enzima. [15, 16] Takođe, glukoza-oksidadza poreklom iz *Penicillium amagasakiense* je glikozilovana najčešće manoznim ugljenohidratnim komponentama, pri čemu se pokazalo da uklanjanje ovih ugljenohidratnih komponenti nema efekta na strukturu, aktivnost ili stabilnost enzima. [3]



Slika 1. Trodimenzionalna struktura glukoza-oksidadze iz *Aspergillus niger* (PDB broj 1CF3)

Michaelisova konstanta (K_m) i maksimalna brzina (V_{max}) za glukoza-oksidadzu variraju u zavisnosti od izvora iz kog se izoluju. K_m za glukoza-oksidadzu iz *A. niger* iznosi oko 33 mM, dok niže vrednosti imaju drugi organizmi (3,3-10, 9 mM) kod različitih gljiva. V_{max} se kreće u opsegu približno 450-1000 U/mg, pri čemu je vrednost za *Aspergillus niger* oko 458 U/mg. Rekombinantno proizvedena glukoza-oksidadza iz *Aspergillus niger* dostiže optimalnu katalitičku aktivnost pri pH 5,5 i temperaturi 37 °C. [17]

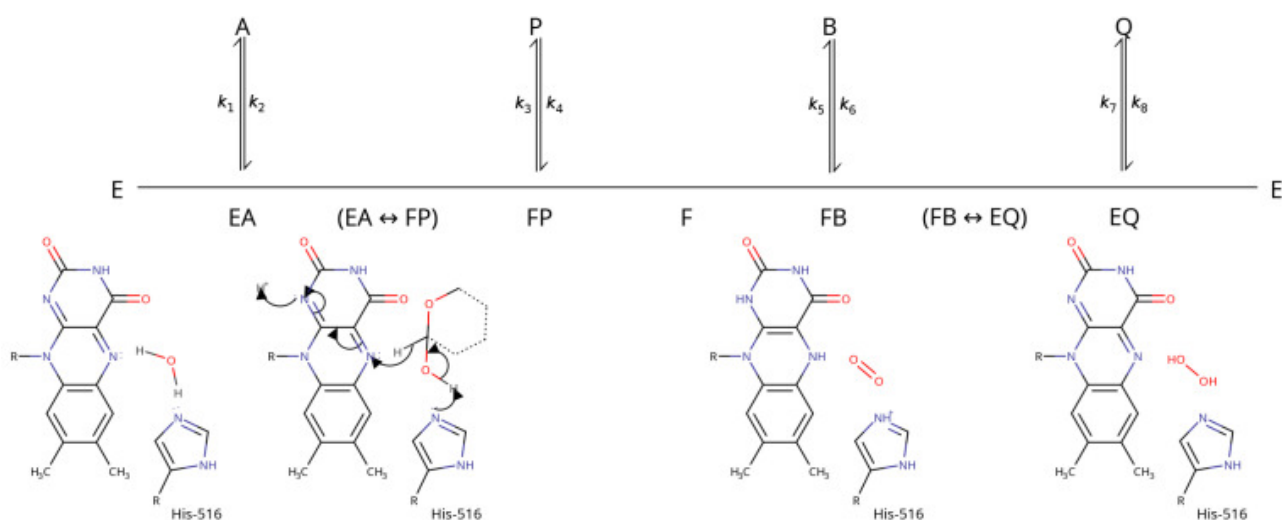
Za određivanje aktivnosti glukoza-oksidadze se najčešće koristi kolorimetrijski ABTS esej koji se odvija u dve odvojene reakcije (reakcije 1 i 2). Vodonik peroksid koji se dobija u reakciji oksidacije D-glukoze do glukonske kiseline predstavlja proizvod sa kojim reaguje ABTS u reakciji koja je katalizovana peroksidazom iz rena. Promena oksidativnog stanja ABTS se prati snimanjem apsorbanace na 415 nm. [18]



2.1.2. Katalitički mehanizam glukoza-oksidade

Katalitički mehanizam glukoza-oksidade proučavan je uglavnom kinetičkim metodama, koje su u kombinaciji sa strukturnim podacima omogućile identifikaciju ključnih ostataka u aktivnom mestu i opis reakcije. Enzim funkcioniše po Ping-Pong Bi-Bi mehanizmu, pri čemu se oksidacija β -D-glukoze i redukcija O_2 odvijaju u dva odvojena koraka.

Najverovatniji mehanizam uključuje bazno katalizovan prenos hidrida sa C1 atoma glukoze na N5 atom FAD-a, uz istovremeni prenos protona na His-516. Ovaj koncertovani korak predstavlja brzinski ograničavajuću fazu reduktivne polureakcije. Nakon toga, redukovani FAD reaguje sa molekulskim kiseonikom kroz dva uzastopna jednelektronska transfera, pri čemu nastaju radikalni intermedijeri i konačno H_2O_2 . [16]



Slika 2. Šematski prikaz mehanizma reakcije glukoza-oksidade (A-glukoza; P-glukono- δ -lakton, B- O_2 ; Q- H_2O_2 ; E- oksidovani oblik GOx vezan za FAD; F-redukovani oblik GOx vezan za $FADH_2$) [16](10.3390/biom12030472)

2.2. Peroksidaza iz rena

Peroksidaza iz rena (HRP, EC 1.11.1.7) je enzim koji pripada klasi III peroksidaza koje sadrže hem (H_2O_2 , oksidoreduktaze) i prvi put je u literaturi pomenut pre 200 godina, nakon čega je postao predmet naučnih istraživanja koja traju i danas. [19] Sa razvojem molekulske dijagnostike, krajem 1980-ih i početkom 1990-ih interesovanje za ovaj enzim je naglo poraslo, što je kao rezultat imalo objavljivanje prvog gena za HRP. [20, 21] Literaturno dostupni podaci o ovom enzimu se uglavnom odnose na enzimsku karakterizaciju, rekombinantnu produkciju u različitim ekspresionim sistemima kao i na primenu. [21] Peroksidaza se najčešće izoluje iz rena (*Armoracia rusticana*), pri čemu je utvrđeno da u korenu rena postoji 28 različitih sekvenci koje kodiraju različite izoforme ovog enzima, a da je najzastupljenija izoforma HRP C1A i najčešće se koristi. [22, 19] Međutim, na osnovu detaljne karakterizacije, sve izoforme se mogu podeliti na kisele, bazne i neutralne, u zavisnosti od njihove pI vrednosti. [23] Pomenuta HRP C1A izoforma je klasifikovana u grupu neutralnih izoformi.

Kako je ustanovljeno ranije, kvalitet i sastav smeše različitih izoformi koje se dobijaju izolovanjem peroksidaze iz prirodnih izvora varira u značajnoj meri u zavisnosti od teško predvidivih i slabo kontrolisanih uslova sredine. Kako bi se izbegao ovaj problem, kao i zahtevan postupak razdvajanja

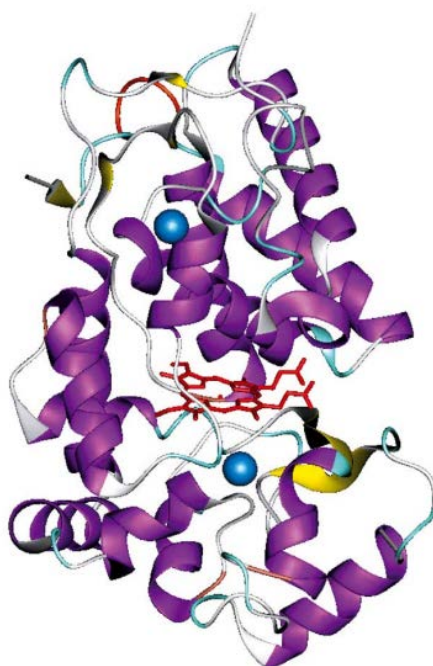
različitih izoformi, razvijeni su različiti sistemi za rekombinantnu proizvodnju HRP-a. [21]. Prvi pokušaji rekombinantne ekspresije HRP-a su započeli, kako je već ranije spomenuto, krajem 1980-ih kada je gen za HRP C1A izoformu kloniran u vektor i nakon transformacije *E. coli* ćelija uspešno eksprimiran u proteinskoj formi. Nakon toga su razvijani različiti protokoli za intracelularnu ekspresiju i *refolding* proteina iz inkluzionih tela, što se najčešće i danas koristi. Ipak, glavni nedostaci ovog načina ekspresije u poređenju sa proteinom dobijenim iz prirodnih izvora je nizak prinos aktivnog enzima koji se izoluje. *E. coli* se ipak najčešće koristi kao sistem za uvođenje novih mutacija u sekvencu enzima, kako bi se poboljšala stabilnost ili aktivnost enzima, a i kako bi se omogućila efikasnija imobilizacija. [21]

Imajući u vidu značajan stepen glikozilacije kao i prisustvo disulfidnih mostova nativnog HRP-a, brojna istraživanja su usmerena na proizvodnju rekombinantnog HRP-a u eukariotskim ekspresionim sistemima. Pored *Saccharomyces cerevisiae* koji je korišćen za rekombinantnu proizvodnju HRP-a, često se koristi i metilotrofni kvasac *Pichia pastoris*. Rekombinantna proizvodnja HRP-a u *P. pastoris* je bila usmerena na proizvodnju HRP C1A izoforme sa povećanom enzimskom aktivnošću i termostabilnošću. [24, 25, 26] Literaturno dostupni podaci pokazuju da broj N-glikozilacionih mesta utiče na faktor prečišćavanja i prinos, budući da hipermanozilacija karakteristična za ekspresiju u kvascima smanjuje interakciju sa hromatografskim smolama i olakšava prečišćavanje. Očigledno je da sekretorni put predstavlja usko grlo u proizvodnji HRP-a, budući da je pokazano da se upotrebom delecionog mutanta signalnog peptida α -faktora, proizvodnja u *P. pastoris* je povećana za 60 %. [27] U jednoj studiji je pokazano da je HRP C1A izoforma uspešno eksprimirana u *P. pastoris* pri čemu je specifična aktivnost izolovanog proteina mnogostruko povećana, kombinovanjem različitih tehnika i strogim kontrolisanjem uslova proizvodnje u bioreaktoru. [28] Iako rekombinantna proizvodnja HRP-a predstavlja veliki izazov, razvoj i unapređenje kvašćevih ekspresionih sistema čini da ovaj cilj deluje sve više ostvariv u bliskoj budućnosti.

Primena peroksidaze iz rena je višestruka pa se tako koristi kao reagens u organskim sintezama i biotransformacijama kao što su kuplovani enzimski eseji, hemiluminescentni eseji, i imunoeseji. [29] Budući da se u poslednje vreme sve više razvijaju elektrohemijski biosenzorni sistemi, većina istraživanja se odnosi na primenu HRP u živim sistemima naročito za degradaciju sintetičkih boja kao i za uklanjanje fenolnih kontaminanata iz otpadnih voda. [30, 31] Takođe, peroksidaza iz rena se može koristiti za sintezu hidrogelova nekih polimera kao što je to slučaj sa fenolnim derivatima hitozana i polivinil alkohola. [32]

2.2.1. Strukturni i kinetički parametri peroksidaze iz rena

HRP iz *A. rusticana* je glikoprotein čija je molekulska masa oko 40-45 kDa i molekularni radijus od oko 30 Å. [33] Izoforma C1A ovog enzima se sastoji od jednog polipeptidnog lanca od 308 aminokiselina, čija je sekvenca potvrđena od strane *Welinder* 1976. godine. Postoje četiri interlančane disulfidne veze između cisteinskih ostataka 11-91, 44-49, 97-301, 177-209, kao i jedna intralančana između Asp99 i Arg123. [29] U primarnoj sekvenci postoji devet potencijalnih mesta za N-glikozilaciju, definisanih motivom Asn-X-Ser/Thr, pri čemu X predstavlja bilo koji aminokiselinski ostatak. [29, 34] Strukturno gledajući, HRP C1A izoforma sadrži dva različita tipa metalnih centara: gvožđe (III) protoporfirin IX (hem grupa) i dva atoma kalcijuma (Slika 3).



Slika 3. 3D prikaz kristalne strukture izoenzima C (crveno-hem; plavo-jon kalcijuma)[29]

Kako se vidi sa prikazane slike hem grupa je vezana za enzim preko His170 (proksimalni histidinski ostatak), koordinacionom vezom između Nε2 atoma bočnog lanca histidina i atoma gvožđa u hemu. Drugo aksijalno koordinaciono mesto u enzimu je dostupno za vodonik peroksid tokom katalitičkog ciklusa. Dva mesta za vezivanje kalcijuma se nalaze distalno i proksimalno u odnosu na ravan hema, pri čemu je svako mesto sedmokoordinisano, sa kiseoničnim ligandima iz karboksilnih grupa (Asp) hidroksilnim grupama (Ser, Thr), karbonilnim grupama a peptidne kičme i jednog molekula vode. [29] Pokazano je da gubitak kalcijuma dovodi do smanjenja enzimске aktivnosti i termostabilnosti. [35]

Vrednost za *Michaelis-Menten* konstante (K_m) *Armoracia rusticana* HRP za 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzotiazol-6-sulfonska kiselina (ABTS) kao supstrat je 0,18 mM (25 °C, pH 5). [36] Za razliku od peroksidaza iz ostalih izvora, peroksidaza iz rena ima maksimalnu aktivnost na pH vrednosti 4,5. [37] U više različitih istraživanja je potvrđeno da je temperaturni optimum ovog enzima 30-40 °C. [38]

2.2.2. Katalitički mehanizam peroksidaze iz rena

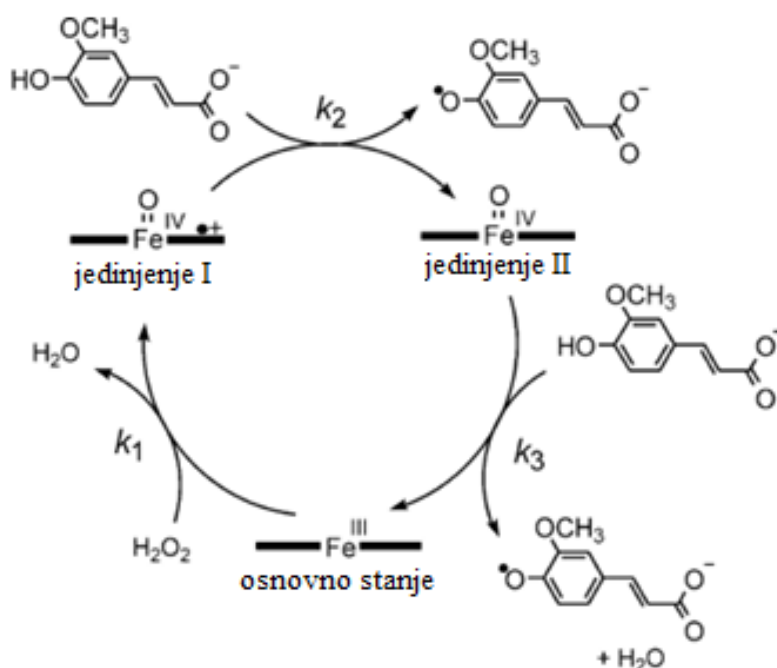
Većina reakcija koja je katalizovana HRP C1A izoformom ili drugim izoformama peroksidaze iz rena se može predstaviti jednačinom 3 gde AH_2 i $AH\cdot$ predstavljaju redukujući supstrat i njegov radikalski proizvod.



Najčešće su redukujući supstrati aromatični fenoli, fenolne kiseline, indoli, amini i sulfonati. Pokazalo se da HRP ima primenu i u živim sistemima jer formiranje radikalskih proizvoda u

reakcijama koje katalizuje HRP imaju ulogu u procesima umrežavanja u biljkama, uključujući stvaranje diferulatih i ditirozinskih veza, kao i učestvovanje u biosintezi lignina i suberina. Budući da ove reakcije doprinose formiranju zaštitnih polimernih barijera pokazalo se da u tom slučaju biljke imaju ograničen gubitak vode i prodor patogena. [29] Takođe je pokazano da se oštećenjem biljnog tkiva povećava aktivnost peroksidaze, kao odgovor na spoljašnje stresove. [39]

Mehanizam katalize peroksidazom iz rena je opisan još devedesetih godina. [29] Nekoliko ključnih koraka reakcije katalizovano peroksidazom iz rena je prikazano na Slici 4, pri čemu je kao supstrat korišćena ferulična kiselina.



Slika 4. Katalitički ciklus HRP C izoforme sa feruličnom kiselinom kao supstratom. [29]

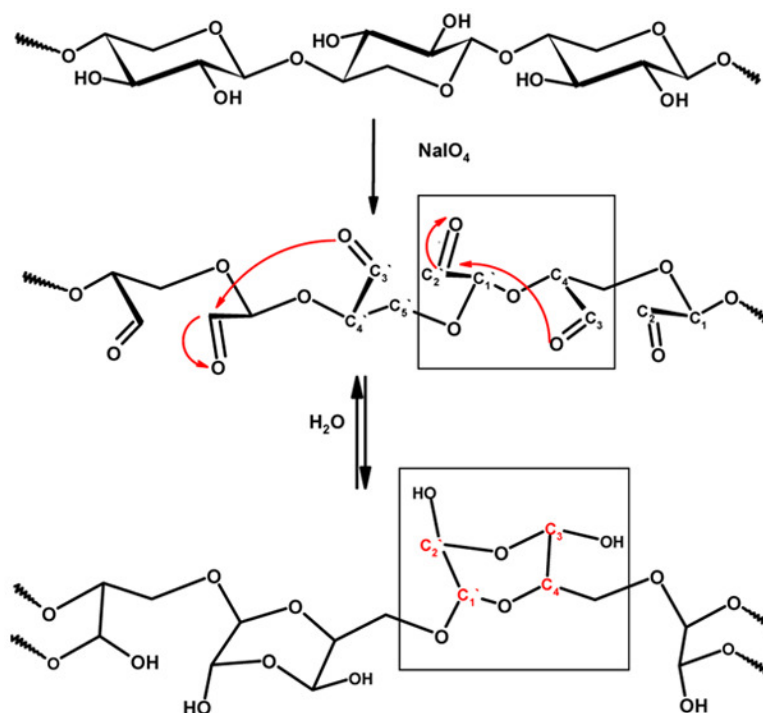
Kao što se sa prikazane slike vidi, prvi korak u katalitičkom ciklusu predstavlja reakciju H_2O_2 i enzima u njegovom osnovnom Fe(III) stanju. Kao proizvod ove reakcije nastaje jedinjenje I koje je veoma reaktivno budući da predstavlja visoko oksidovano intermedijarno stanje. Sastoji se od Fe(IV) oksoferilnog centra i porfirinskog katjonskog radikala. Takođe, pri niskim temperaturama je uspešno detektovano i jedinjenje 0, intermedijer, koje se formira pre jedinjenja 1 i nastaje u reakciji H_2O_2 i HRP C1A i opisano je kao Fe(III)-hidroperoksi kompleks. Jedinjenje I ima dva oksidaciona ekvivalenta više u odnosu na osnovno stanje enzima. U prvom jedoelektronskom redukcionom koraku, u prisustvu redukujućeg supstrata, formira se jedinjenje II, koje se nalazi za jedan oksidacioni ekvivalent iznad osnovnog stanja enzima. I jedinjenje I i jedinjenje II imaju jako oksidaciona svojstva i vrednosti redoks potencijala od oko +1 V. U drugom redukcionom koraku, jedinjenje II se vraća u osnovno stanje enzima. U prisustvu viška H_2O_2 može se formirati jedinjenje III, koje predstavlja rezonantni hibrid gvožđe(III)-superoksida i gvožđe(II)-dioksigen kompleksa. Detaljnim razmatranjem katalitičkog ciklusa potvrđena je uloga ostataka Arg38 i His42 u distalnom džepu hema i pokazano je da imaju ključnu ulogu u katalizi i stabilizaciji intermedijera. [29]

2.3. Hemijske modifikacije enzima

Iako je razvoj genetičkog inženjeringa doveo do toga da se genetska modifikacija danas češće koristi u radu sa enzimima, hemijska modifikacija enzima nije izgubila na značaju. Hemijska modifikacija enzima predstavlja efikasan metod za povećanje stabilnosti proteina, posebno što se hemijska modifikacija radi sa već funkcionalnim proteinima. [40] U poređenju sa genetskom modifikacijom, hemijska modifikacija ima određene nedostatke. Naime, kada se neki enzim hemijski modifikuje reakcija se mora svaki put izvoditi pre upotrebe samog enzima, što nije slučaj sa genetskom modifikacijom, budući da se jednom dizajnirani gen koristi za sve dalje eksperimente, bez ponovne genetske manipulacije. Osim toga, nedostatak hemijske modifikacije je što najčešće nije usmerena na tačno određeno mesto, osim u slučaju ako se ciljano modifikuje jedna specifična funkcionalna grupa. [41] Prednosti hemijske modifikacije u koje spadaju reakcije acilovanja, fosforilacije ili glikozilacije, se ogledaju u mogućnosti uvođenja novih funkcionalnih grupa čime se mogu pojačati međumolekulske interakcije. [42] Takođe, niska cena, kratko reakciono vreme, jednostavna kontrola stepena reakcije i široka primena su još neke od prednosti hemijske modifikacije enzima. [43] Hemijskim modifikacijama enzima se mogu poboljšati brojne karakteristike enzima kao što su stabilnost, termostabilnost, pH optimum, pH stabilnost, i rezistencija na proteolitičku razgradnju. Na ovaj način se uspešno prevazilaze ograničenja prirodnih enzima i omogućava njihova šira primena u pogledu dostave lekova, industrijske biokatalize i razvoja funkcionalnih biomaterijala. [44]

2.3.1. Hemijska modifikacija glikoproteina perjodatom

Budući da glikoproteini na svojoj površini imaju veliki broj šećernih komponenti, najčešće se radi ciljana hemijska modifikacija hidroksilnih grupa. [41] Za oksidaciju hidroksilnih grupa do aldehidnih se može koristiti metoda perjodatne oksidacije. Dobijeni rezultati pokazuju da ovakav način hemijske modifikacije smanjuje mogućnost inaktivacije enzima zbog hemijske modifikacije aktivnog mesta. [45] Formirane aldehidne grupe nakon perjodatne oksidacije predstavljaju reaktivna mesta pogodna za dalje hemijske reakcije, kao što su konjugacija sa hidrazidima ili aminima, čime se omogućava kontrolisana funkcionalizacija enzima. Na ovaj način se može ostvariti kovalentno vezivanje enzima za različite nosače, pri čemu se često zadržava visoka katalitička aktivnost. Dodatno, selektivna modifikacija ugljenohidratnog dela omogućava očuvanje proteinske strukture i aktivnog mesta enzima, što je od posebnog značaja za primenu u biokatalizi i biosenzorskim sistemima.



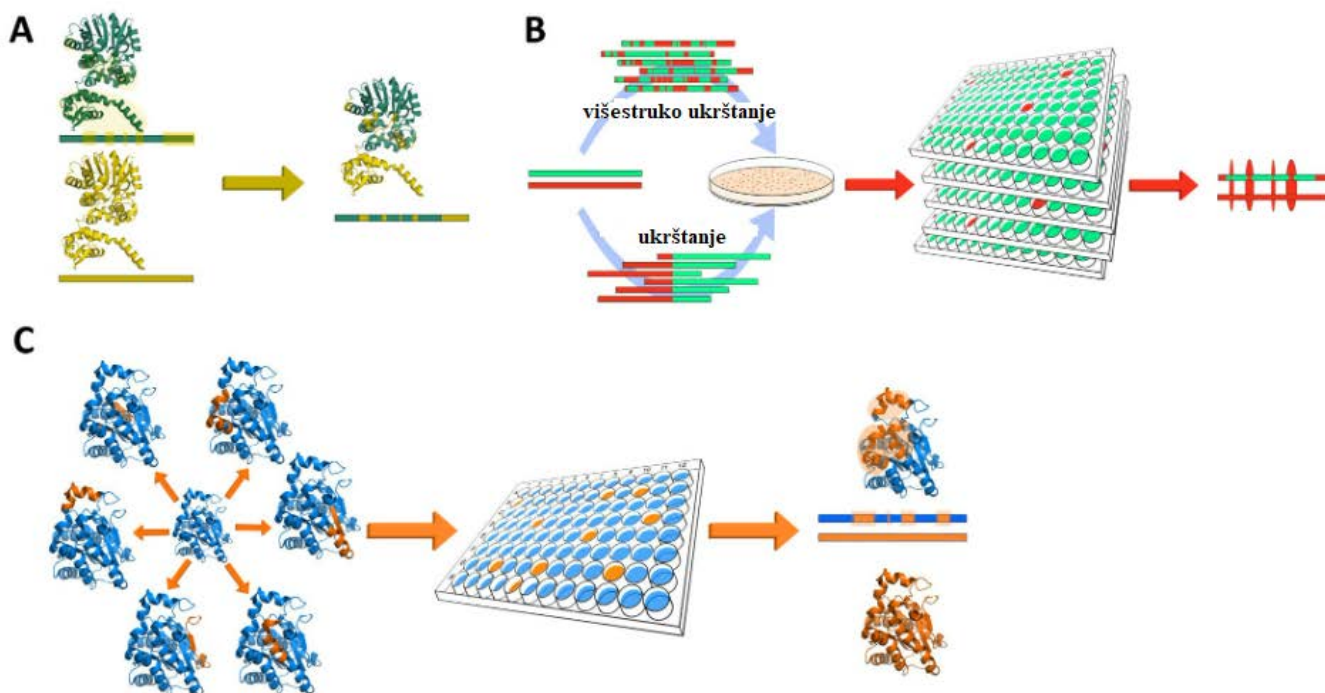
Slika 5. Pretpostavljen mehanizam perjodatne oksidacije šećernih komponenti na površini glikoproteina [46]

Perjodatna oksidacija se takođe koristi za imobilizaciju enzima, pri čemu se vicinalne hidroksilne grupe oksiduju do aldehidnih funkcionalnih grupa. Nastali aldehidi zatim reaguju sa hidrazinima ili aminima, pri čemu se formiraju Šifove baze ili hidrazonske veze. Pošto se Šifove baze nestabilne u kiselim uslovima, one se obično redukuju do sekundarnih amina upotrebom NaBH_4 ili NaBH_3CN čime se stabilizuje imobilizovani glikoprotein. [47]

2.4. Proteinski inženjering

Proteinski inženjering podrazumeva izmenu sekvenci proteina na molekulskom nivou sa ciljem promene njihovih funkcionalnih osobina. Budući da se proteinski inženjering odnosi na modifikaciju ili mutaciju proteina za razumevanje ove oblasti neophodna su znanja genetičkog inženjeringa, biohemije, enzimologije, kao i različitih tehnika ekspresije i prečišćavanja proteina. [48] Metodama proteinskog inženjeringa moguće je nakon identifikovanja funkcionalnih aminokiselina odgovarajućih proteina unaprediti njegove osobine, pri čemu su predmet istraživanja najčešće industrijski važni enzimi kao što su lipaze, amilaze i proteaze. [49, 50, 51] Primena proteinskog inženjeringa je naročito važna u razvoju enzima koji mogu da funkcionišu u ekstremnim uslovima pH, temperature i saliniteta, čime se povećava efikasnost i smanjuju troškovi industrijskih procesa. Za industrijske potrebe se najčešće optimizuju osobine enzima kao što su termostabilnost, aktivnost, specifičnost i stabilnost u prisustvu inhibitora. [48]

Metode proteinskog inženjeringa se mogu podeliti u tri osnovne kategorije: racionalni dizajn, semi-racionalni dizajn, i dirigovana evolucija.



Slika 6. Različite tehnike proteinskog inženjeringa, A: racionalni dizajn; B: dirigovana evolucija; C: semi-racionalni dizajn (preuzeto sa sajta <https://abelab.utu.fi/protein-engineering/>)

Osim pomenutih metoda koriste se i druge metode kao što su nasumična mutageneza, molekulska dinamika i homologno modelovanje, protočna citometrija, kao i *de novo* inženjering enzima. [52] Takođe, za proteinski inženjering se koriste i bioinformatičke metode gde se mogu svrstati: ProSAR, SCHEMA, kao i metoda informacionog spektra (ISM).

2.4.1. Bioinformatičke metode

Imajući u vidu da se primenom bioinformatičkih metoda može proučavati struktura proteina, modelovati njihova struktura i analizirati odnosi između strukture i funkcije, bioinformatika predstavlja interdisciplinarnu oblast koja objedinjuje znanja iz molekularne biologije, biohemije i računarskih nauka. Njena primena ogleda se u razvoju novih vakcina i lekova, unapređenju funkcionalnosti proteina u ishrani i razumevanju interakcija proteina. [53, 54]

Za predviđanje strukture i izradu trodimenzionalnih modela bioinformatika se služi različitim računarskim metodama i algoritmima za analizu proteina. Takođe, korišćenjem ovih metoda je omogućeno modelovanje interakcija između proteina, kao i razumevanje složenih bioloških procesa. [55] Identifikacijom i anotacijom funkcionalnih regiona, ovi alati doprinose boljem razumevanju veze između strukture i funkcije proteina, uz integraciju podataka iz genomike i proteomike. Bioinformatika ima značajnu primenu i u razvoju lekova, jer omogućava sprovođenje virtuelnog skrininga i optimizaciju potencijalnih terapijskih kandidata. [56]

Uloga bioinformatike u analizi proteina zasniva se na njenoj sposobnosti da efikasno obradi i interpretira velike količine bioloških podataka. Primenom različitih metoda omogućeno je sistematizovanje, čuvanje i povezivanje informacija o sekvencama, strukturama i interakcijama proteina, čime se olakšava njihova dalja obrada i analiza. [57, 58]

Bioinformatičke metode imaju važnu ulogu u otkrivanju i razvoju lekova, jer omogućavaju primenu simulacija molekulske dinamike, *docking* analiza liganada i virtuelnog skrininga, čime se olakšava identifikacija i unapređenje potencijalnih terapijskih jedinjenja. [59] Poseban značaj ima predikcija strukture proteina, s obzirom na to da je njihova trodimenzionalna organizacija usko povezana sa funkcijom. [60] Na osnovu ovih predikcija moguće je identifikovati aktivna mesta, funkcionalne domene i vezivna mesta, koja imaju ključnu ulogu u interakcijama sa supstratima i drugim molekulima [61, 62]

Pomenute metode imaju značajnu ulogu u proučavanju uticaja mutacija na funkciju proteina i razvoj bolesti, kao i u racionalnom dizajnu proteina sa unapređenim osobinama za biotehnološke i medicinske primene. [63] Takođe, precizna predikcija strukture omogućava modelovanje interakcija između proteina, što je od suštinskog značaja za razumevanje signalnih puteva i formiranje proteinskih kompleksa. [64]

Eksperimentalne tehnike za određivanje strukture proteina, poput rendgenske kristalografije i NMR spektroskopije, često su vremenski zahtevne i skupe, zbog čega bioinformatički pristupi predstavljaju značajnu podršku i doprinose ubrzanju ovih istraživanja. Pored toga, predikcija strukture omogućava povezivanje genetičkih sekvenci sa njihovim funkcijama, što je naročito važno u uslovima velike količine genomskih podataka. [65]

Imajući u vidu sve napred navedeno, bioinformatika je postala nezaobilazan alat u savremenoj biohemiji, jer omogućava sveobuhvatnu analizu strukture, funkcije i interakcija proteina, olakšava razvoj novih lekova i doprinosi napretku proteinskog inženjeringa, kao i boljem razumevanju bioloških procesa na molekulskom nivou. [66]

2.4.1.1. Metoda informacionog spektra – ISM

U savremenoj enzimologiji i proteinskom inženjerstvu, racionalni dizajn mutanata sa poboljšanim katalitičkim svojstvima ili povećanom stabilnošću često je ograničen velikim brojem mogućih aminokiselinskih supstitucija. Kako bi se smanjio broj skupih i dugotrajnih *in vitro* eksperimenata, sve više se primenjuju računarske (*in silico*) metode za skrining i predviđanje funkcionalno značajnih mutacija. Među ovim pristupima posebno mesto zauzima metoda informacionog spektra (ISM, engl. *Informational Spectrum Method*), bioinformatička metoda zasnovana na fizičko-hemijskim parametrima biomolekula i tehnikama digitalne obrade signala. [67]

Osnovna pretpostavka ISM metode jeste da između primarne strukture proteina, odnosno aminokiselinske sekvence, i njegove biološke funkcije postoji veza koja se može analizirati matematičkim metodama. Za razliku od tradicionalnih bioinformatičkih pristupa koji se u velikoj meri zasnivaju na poravnanju sekvenci i stepenu homologije, ISM posmatra proteinsku sekvencu kao diskretni numerički signal.

Proces analize sekvenci pomoću ISM metode odvija se kroz nekoliko osnovnih koraka.

1. Prvi korak predstavlja prevođenje aminokiselinske sekvence u numerički signal. Svaka aminokiselina u primarnoj sekvenci proteina zamenjuje se odgovarajućom numeričkom vrednošću potencijala elektron–jon interakcije (EIIP, engl. *Electron-Ion Interaction Potential*). EIIP vrednosti izračunavaju se u okviru teorije pseudopotencijala i predstavljaju prosečnu energiju valentnih elektrona u aminokiselinskom ostatku u sekvenci proteina. Na

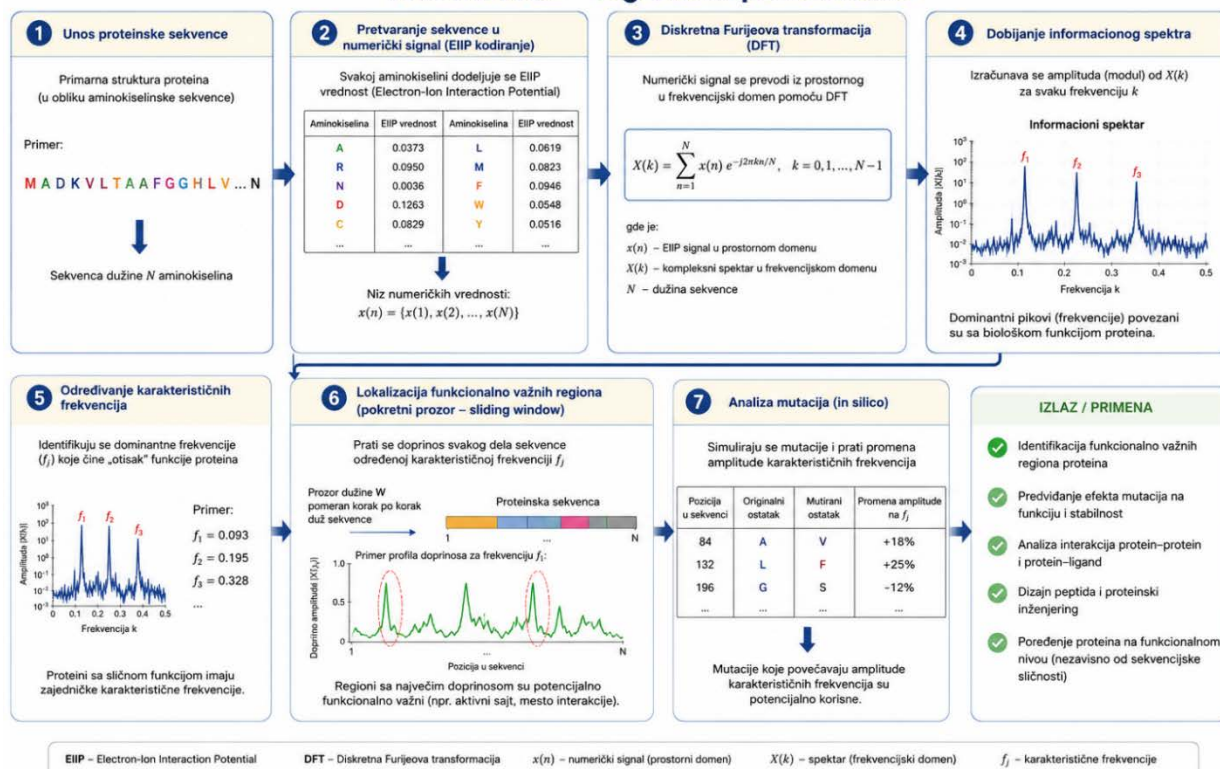
ovaj način linearni niz aminokiselina prevodi se u diskretni numerički signal koji odražava raspodelu elektronskih osobina duž proteinske sekvence.

Tabela 1. EIIP vrednosti za 20 standardnih aminokiselina

Aminokiselina (ime)	Troslovna oznaka	Jednoslovna oznaka	EIIP vrednost	Aminokiselina (ime)	Troslovna oznaka	Jednoslovna oznaka	EIIP vrednost
Alanin	Ala	A	0,0373	Metionin	Met	M	0,0823
Cistein	Cys	C	0,0829	Asparagin	Asn	N	0,0036
Aspartat	Asp	D	0,1263	Prolin	Pro	P	0,0198
Glutamat	Glu	E	0,0058	Glutamin	Gln	Q	0,0761
Fenilalanin	Phe	F	0,0946	Arginin	Arg	R	0,0955
Glicin	Gly	G	0,0050	Serin	Ser	S	0,0821
Histidin	His	H	0,0242	Treonin	Thr	T	0,0942
Izoleucin	Ile	I	0,0000	Valin	Val	V	0,0056
Lizin	Lys	K	0,0371	Triptofan	Trp	W	0,0548
Leucin	Leu	L	0,0000	Tirozin	Tyr	Y	0,0516

- U drugom koraku na dobijeni numerički signal primenjuje se diskretna Furijeova transformacija (DFT), čime se informacija iz domena sekvence prevodi u frekvencijski domen. Dobijeni informacioni spektar predstavlja raspodelu amplituda u funkciji frekvencije u opsegu od 0 do 0,5. Na taj način moguće je identifikovati frekvencijske komponente koje odgovaraju periodičnosti raspodele EIIP vrednosti duž proteinske sekvence.
- Treći korak obuhvata identifikaciju dominantnih frekvencija u informacionom spektru. Dominantni pikovi ukazuju na frekvencije koje mogu biti povezane sa biološkom funkcijom proteina, intermolekulskim prepoznavanjem ili specifičnim funkcionalnim osobinama. Prema ISM pristupu, proteini sa sličnom biološkom funkcijom ili sličnim interakcionim svojstvima mogu imati zajedničke karakteristične frekvencije, čak i kada ne pokazuju visok stepen sekvencijske homologije.

ISM metoda – algoritam po koracima



Slika 7. Koraci metode informacionog spektra (ISM)

Poseban značaj ISM metode ogleda se u mogućnosti određivanja funkcionalno važnih regiona proteina analizom pokretnog prozora (eng. *sliding window analysis*). Ovom analizom prati se doprinos pojedinih delova sekvence amplitudi određene karakteristične frekvencije. Regioni koji daju najveći doprinos dominantnim frekvencijama smatraju se potencijalno važnim za biološku funkciju, interakcije sa ligandima, stabilnost proteina ili katalitička svojstva enzima.

Metoda informacionog spektra korišćena je u brojnim istraživanjima za analizu proteina virusa, predviđanje interakcija protein-receptor, identifikaciju funkcionalnih motiva, dizajn peptida i racionalni proteinski inženjering. Posebno je značajna njena primena u predviđanju efekata mutacija, jer omogućava praćenje promena amplituda karakterističnih frekvencija nakon *in silico* zamene aminokiselinskih ostataka. Na taj način ISM može poslužiti kao alat za izbor pozicija za mutagenezu i usmereni dizajn mutantnih enzima sa potencijalno unapređenim funkcionalnim osobinama. [68]

2.4.2. Orijentisana imobilizacija

Najčešća primena enzima peroksidaze iz rena i glukoza-oksidaze jeste u biosenzorima i biočipovima. Međutim, za ovakav način njihove primene najčešće je neophodno da budu imobilizovani na nekom čvrstom nosaču. Proces imobilizacije podrazumeva složene interakcije između površine nosača i samih enzima koji se imobilizuju. Budući da se na površini enzima nalaze različite funkcionalne grupe kao što su karboksilne, amino, hidroksilne i sulfhidrilne grupe, imobilizacija se najčešće postiže ostvarivanjem interakcija između funkcionalnih grupa na površini enzima i čvrstog nosača koji se koristi za imobilizaciju. Jedan od ključnih faktora koji utiče na uspešnost imobilizaciju jeste očuvanje strukture aktivnog mesta enzima. Naime, aktivno mesto kao region u kome dolazi do vezivanja

supstrata i odvijanja hemijske reakcije, mora zadržati odgovarajuću konformaciju i biti dostupno ciljnim molekulima. Imobilizacija proteina u nasumičnoj orijentaciji na čvrstom nosaču može dovesti do denaturacije i blokiranja aktivnog mesta, čime se zbog steričnih smetnji i promene konformacije uzrokuje delimičan ili potpun gubitak aktivnosti. Do sada se za imobilizaciju enzima najčešće koristila metoda fizičke adsorpcije, koja je zasnovana na hidrofobnim interakcijama kao i/ili elektrostatičkim interakcijama. Iako je ovaj postupak imobilizacije veoma jednostavan, njegovo veliko ograničenje jeste što je relativno nestabilna i teško kontrolisana, a nespecifična adsorpcija vrlo često dovodi do rezultata koji ne odgovaraju stvarnim vrednostima i dolazi do velikih grešaka u merenju. Osim opisanog načina imobilizacije, postoji i kovalentna imobilizacija, koja se izvodi tako što se uspostavlja interakcije između funkcionalnih grupa enzima i odgovarajućih funkcionalnih grupa nosača, što je najčešće efikasan i ireverzibilan proces.

Međutim, obe opisane metode imobilizacije imaju nedostatak da pogrešno imobilizovan enzim u smislu nasumično raspoređenih funkcionalnih grupa dovodi do neorijentisane imobilizacije, što može izazvati strukturne promene i smanjenje dostupnosti aktivnih mesta. Iz tog razloga, novija istraživanja su uglavnom orijentisana u pravcu mesto-specifične imobilizacije proteina. Ovom metodom se obezbeđuje uniforma orijentacija i očuvanje biološke aktivnosti budući da se veze ostvaruju preko nefunkcionalnih regiona. Trenutno postoji nekoliko načina orijentisane imobilizacije, koje se mogu podeliti na (bio)hemijski posredovane afinitetne metode, kovalentne hemijske metode kao i tehnike zasnovane na molekulskom otisku. Kao najveća prednost ovih metoda se navodi bolja kontrola orijentacije proteina i unapređenje performansi biosenzorskih i bioanalitičkih sistema. [69]

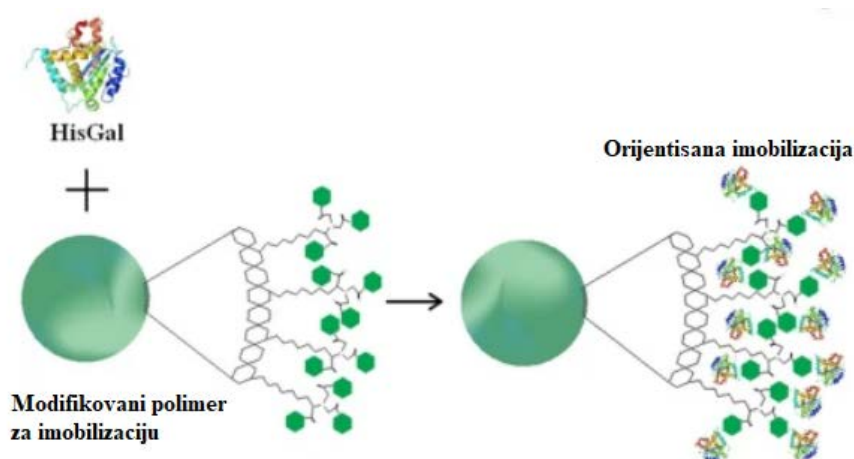
Osim navedenih prednosti orijentisane imobilizacije, redoks enzimi često zahtevaju da njihovo aktivno mesto bude u neposrednom kontaktu sa površinom nosača kako bi se omogućio efikasan prenos elektrona ka ili sa nosača. [70] Orijetisani imobilizovani sistemi nastaju kada reaguju funkcionalne grupe na površini enzima sa funkcionalnim grupama nosača. Ove funkcionalne grupe su već prisutne ili se mogu uvoditi primenom različitih metoda proteinskog inženjeringa u aminokiselinsku sekvencu proteina. Kao primer enzima koji mogu da se imobilizuju na ovaj način se mogu navesti glikozilovani enzimi koji poseduju kovalentno vezane oligosaharidne jedinice na svojoj površini. Kako je već ranije u literaturi opisano ovi ugljenohidratni ostaci ukoliko su lako dostupni na površini ne učestvuju u kataličkoj aktivnosti enzima, ali mogu učestvovati u reakcijama reverzibilne kovalentne imobilizacije. [71] Jedan od primera ovakvog načina imobilizacije jeste imobilizacija peroksidaze iz rena, koja kako je već ranije navedeno pripada grupi glikoproteina. Elektrode zlata, kao nosači za imobilizaciju, su u ovom slučaju modifikovane uvođenjem novih funkcionalnih grupa borne kiseline, čime je omogućena brza i kontrolisana reakcija između enzima i epoksidnih grupa nosača, a time i postignuta adsorpcija proteina na površinu elektrode.

Kasnije je primećeno da se ovakav način imobilizacije može iskoristiti i za druge proteine iz grupe glikoproteina. Pokazalo se da je moguće uvesti specifična mesta glikozilacije primenom različitih metoda proteinskog inženjeringa i hemijske modifikacije ili specifičnom glikozilacijom C-terminalnog aminokiselinskog ostatka. Zbog toga, mogućnost korišćenja šećera na površini enzima kao vezujućih motiva predstavlja bolji način imobilizacije enzima u poređenju sa onim metodama koji utiču na aminokiselinske ostatke. [72] Perjodatna oksidacija predstavlja jedan od najjednostavnijih načina za transformaciju cis-diola u šećernim ostacima u reaktivne aldehidne grupe, koje mogu reagovati sa aminima ali i hidrazidnim grupama pri blagim reakcionim uslovima. [73]

Međutim, iako se orijentisana imobilizacija zasnovana na oksidaciji šećernih ostataka pokazala kao dobar metod imobilizacije i dalje postoje nedostaci, kao što su neželjeno umrežavanje proteina šifovim bazama. Naime, budući da su proteini heterogeni molekuli koji sadrže različite funkcionalne grupe, uključujući amino, karboksilne, tiolne i hidroksilne grupe, aldehidne grupe nastale

oksidacijom mogu reagovati sa njima i time odvesti do umrežavanja i agregacije. Kao rezultat toga, može doći do smanjene efikasnosti imobilizacije, a i smanjenje katalitičke aktivnosti imobilizovanih sistema. [47]

Drugi načini orijentisane imobilizacije enzima se zasnivaju na prisustvu jedinstvenih aminokiselinskih ostataka u sekvenci enzima. Kao primer za ovakav način imobilizacije se može navesti pepsin koji sadrži jedan ostatak fosfoserina u svojoj sekvenci, koji je iskorišćen za selektivnu imobilizaciju ovog enzima na aluminijum-oksidu. [47]



Slika 8. Primer orijentisane imobilizacije modifikacijom nosača za imobilizaciju [74]

2.4.3. Ekspresioni sistemi

Jedan od osnovnih ciljeva savremenih biohemjskih nauka i industrije je efikasna rekombinantna proizvodnja proteina u različitim prokariotskim i eukariotskim sistemima. Pojava genetičkog inženjeringa 1970-ih čime je omogućena rekombinantna proizvodnja proteina je u velikoj meri imala uticaja na dalji razvoj bioindustrije. [75] Danas su razvijeni različiti prokariotski i eukariotski sistemi koji se koriste za rekombinantnu proizvodnju enzima. [76] Jedan od glavnih ciljeva industrijske proizvodnje rekombinantnih proteina je usmeren ka postizanju visokog prinosa proteina od interesa, pri čemu je neophodno da proizvedeni protein ispunjava određene norme u pogledu kvaliteta dobijenog proteina. [77] Najčešći korišćen prokariotski sistem za rekombinantnu proizvodnju je *E. coli*, za šta se koristi već skoro 40 godina. [78] Međutim, za proizvodnju proteina u višegramskim količinama se najčešće koriste kvasci. Ovi eukariotski sistemi ispunjavaju značajne bezbedonosne zakone kao što su ti da ne sadrže patogene, viruse niti pirogene supstance. Takođe, to su veoma razvijeni sistemi sa jednostavnim uslovima fermentacije koji omogućava relativno brz rast ćelija na jednostavnim podlogama. Pored toga, njihova velika prednost se ogleda i u činjenici što su sposobni da sekretuju rekombinantne proteine i da ih posttranslaciono modifikuju po uzoru na više eukariote. [79, 80] Da bi se neki ekspresioni sistem smatrao odgovarajućim on mora da zadovolji dva kriterijuma. Prvi od njih je da omogućava postizanje visoke vrednosti ćelijske gustine i drugi da ima specifičnu produktivnost koja podrazumeva dostizanje visokog prinosa proizvoda po jediničnoj ćeliji i drugi, zapreminsku produktivnost što je definisano kao visok prinos proizvoda koji se odnosi na jedinicu zapremine medijuma. Specifična produktivnost u kvascima određena je, između ostalog, jačinom promotora, brojem kopija gena kao i prisustvom lider sekvence. [81] Izbor odgovarajućeg ekspresionog sistema za rekombinantnu proizvodnju konkretnog proteina predstavlja veliki izazov budući da postoji sve veći broj različitih ekspresionih sistema.

2.4.3.1. *Pichia pastoris* ekspresioni sistem

Zbog svojih brojnih prednosti *Pichia pastoris* se sve intenzivnije primenjuje kao ekspresioni sistem za proizvodnju različitih rekombinantnih proteina. Ključne prednosti ovog metilotrofnog kvasca su kratko vreme ekspresije, mogućnost kotranslacione i posttranslacione modifikacije, kao i relativno jeftin postupak proizvodnje. Najčešće posttranslacione modifikacije odnose se na glikozilaciju, koja se odvija u endoplazmatičnom retikulumu i Goldžijevom aparatu, pri čemu postoje dva tipa glikozilacije: O- i N- glikozilacija, pri čemu je N-glikozilacija uglavnom visokomananskog tipa. Kod N-glikozilacije oligosaharidi se vezuju za amidni azot asparaginskog ostatka N-glikozidnom vezom u konsenzus sekvenci Asn-X-Ser/Thr, gde je X bilo koja aminokiselina osim prolina. U slučaju O-tipa glikozilacije, oligosaharidi se vezuju za serinske ili treoninske ostatke putem glikozidne veze. Sa industrijsko-biotehnološkog aspekta, ovaj ekspresioni sistem ima veliku prednost u poređenju sa ostalima budući da se proteini od interesa mogu proizvoditi u velikim količinama iz malih zapremina kulture. Osim toga, *Pichia pastoris* se smatra dobrim izborom za ekspresioni sistem rekombinantnih proteina jer omogućava sekretornu proizvodnju proteina od interesa direktno u supernatant medijuma, što dalje olakšava proces prečišćavanja. [82]

Ekspresija bilo kog rekombinantnog proteina u *Pichia pastoris* odvija se kroz tri osnovne, međusobno povezane faze. Prva faza podrazumeva kloniranje željenog gena u odgovarajući ekspresioni vektor, pri čemu se gen od interesa insertuje u konstrukt koji sadrži neophodne regulatorne elemente za ekspresiju u *P. pastoris*. Druga faza podrazumeva uvođenje i stabilnu integraciju rekombinantnog vektora u genom domaćina *P. pastoris*. Ovaj proces se najčešće odvija homolognom rekombinacijom, pri čemu se omogućava trajna inkorporacija stranog genetičkog materijala u hromozomsku DNK, što obezbeđuje genetičku stabilnost i konzistentnu ekspresiju tokom uzastopnih ćelijskih deoba. Treća faza obuhvata selekciju i skrining različitih transformisanih sojeva u cilju procene nivoa ekspresije integrisanog rekombinantnog gena. U ovoj fazi se vrši identifikacija najproduktivnijih klonova, kao i optimizacija uslova ekspresije, uključujući indukciju promotora, nutritivne uslove i vreme kultivacije s ciljem postizanja maksimalnog prinosa proteina od interesa. [83]

I pored brojnih prednosti ovaj ekspresioni sistem ima i nekoliko nedostataka, jer za razliku od bakterijskog ekspresionog sistema, za transformaciju *P. pastoris* kompetentnih ćelija je potrebna velika količina plazmida. [84] Rekombinantna proizvodnja u ovom ekspresionom sistemu je regulisana pomoću dva promotora: gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (PGAP) i promotora AOX. Međutim, i pored brojnih prednosti, ni jedan od promotora nema finu regulaciju. [85] Osim navedenih, jedan od ključnih nedostataka ekspresije rekombinantnih proteina u *P. pastoris* je degradacija eksprimiranih proteina delovanjem proteaza, što je pokušano da se reši razvijanjem novih sojeva. [82]

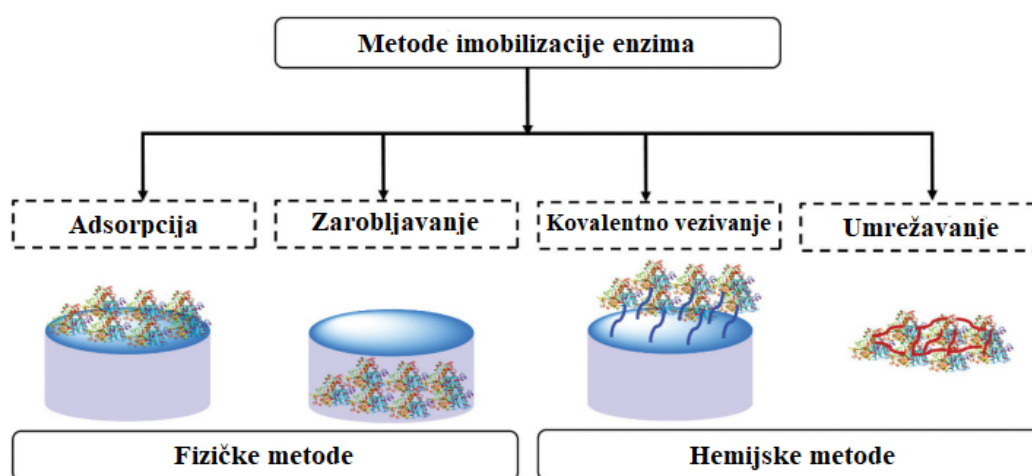
2.5. Imobilizacija enzima

Imajući u vidu da je primena enzima u industrijskim uslovima ograničena zbog rigoroznih reakcionih uslova kao što su visoke temperature ili korišćenje ograničenih rastvarača za njihovu primenu u ove svrhe je neophodno da budu imobilizovani. Kao prvi primer imobilizovanog enzima navodi se invertaza imobilizovana na aktivnom uglju. Ova ideja je potekla od Nelson i Griffina koji su pokazali 1916. da ovako imobilizovana invertaza zadržava svoju aktivnost nakon imobilizacije. Međutim, značajan napredak imobilizacija kao tehnika doživljava tek od 1960. godine, od kada su razvijene brojne metode reverzibilne i ireverzibilne imobilizacije enzima. [86] Osim izbora odgovarajuće

tehnike imobilizacije, jako je bitno izabrati adekvatni nosač, kako bi postupak imobilizacije bio uspešan. Karakteristike koje treba da ispunjava nosač su: dobra hemijska i mehanička stabilnost, velika specifična površina ili porozna struktura kako bi kapacitet imobilizacije bio veći, površinu pogodnu za hemijsku modifikaciju ili funkcionalizaciju, kao i da je ekonomski isplativ tj. da je lako dostupan i ekološki prihvatljiv. [87] Osnovna ideja imobilizacije jeste fiksiranje ili zarobljavanje enzima unutar čvrstih nosača.

Prednost imobilizacije enzima je takođe i što je relativno jednostavno nakon završene enzimske reakcije izdvojiti enzim na nosaču, što ima veliku primenu u prehrambenoj, medicinskoj i farmaceutskoj industriji. [87]

Do danas su opisane različite metode imobilizacije kao što su enkapsulacija, umrežavanje, kovalentno vezivanje, adsorpcija i zarobljavanje (Slika 9). [88]



Slika 9. Različite metode imobilizacije enzima [89]

2.5.1. Metode imobilizacije enzima

2.5.1.1. Kovalentno vezivanje

Kovalentno vezivanje predstavlja jednu od najkorišćenijih metoda imobilizacije enzima, gde se enzimi za nosač vezuju jakim i stabilnim kovalentnim interakcijama, najčešće za materijale kao što su porozni silicijum-dioksid, poliakrilamid, agaroz i porozno staklo i dr. [90] Imajući u vidu činjenicu da se kovalentno vezivanje najčešće ostvaruje aktivacijom nosača uvođenjem nekih funkcionalnih grupa, preko kojih se ostvaruje veza sa funkcionalnim grupama enzima, na ovaj način se dobijaju stabilni imobilizovani sistemi koji su otporni na različite agense poput visoke temperature, organskih rastvarača i ekstremnih pH vrednosti. [91] Kao nedostaci ove metode se navode složeni postupci imobilizacije, duže vreme inkubacije kao i mala količina enzima imobilizovanog po gramu nosača.

2.5.1.2. Umrežavanje

Imobilizacija umrežavanjem se od ostalih metoda imobilizacije razlikuju što se enzimi međusobno povezuju, bez upotrebe nosača. [92] Najčešće se enzimi umrežavaju međumolekulskim povezivanjem enzima u kristalnom obliku, uz upotrebu glutaraldehida. Iako ima niz prednosti za potrebe biotransformacije, kao što su očuvana katalitička aktivnost i dobra zapreminnska efikasnost,

jedan od nedostataka ove metode je što enzimi koji se koriste za imobilizaciju moraju imati visok stepen čistoće, pa je ovaj postupak imobilizacije veoma skup. [93] Osim opisanog načina umrežavanja postoji i metoda enzimskih agregata koji se formiraju jednostavnom precipitacijom enzima u vodenoj sredini, pri čemu nastaju fizički agregati proteinskih čestica. Na početku su ovi agregati enzima stabilizovani nekovalentnim interakcijama, a naknadnim umrežavanjem se formiraju sistemi u kojima su očuvana struktura i katalitička aktivnost enzima. U poređenju sa prethodnom metodom, ova metoda ima ograničenu mehaničku stabilnost, ali je ekonomski isplativija. [93]

2.5.1.3. Adsorpcija

Najjednostavnija metoda imobilizacije je adsorpcija koja podrazumeva najčešće fizičku adsorpciju enzima na nosaču i uglavnom je reverzibilna metoda. Kao nosači u ovim imobilizovanim sistemima se najčešće koriste jonoizmenjivačke smole, aluminijum-oksidi, aktivni ugalj i dr. Sa industrijskog aspekta, ova metoda je relativno jeftina i zato se sve češće primenjuje, ali je glavni nedostatak metode što su veze koje se ostvaruju između enzima i nosača najčešće vodonične, jonske ili hidrofobne. [94, 95]

2.5.1.4. Zarobljavanje

Jedna od tehnika ireverzibilne imobilizacije je zarobljavanje, pri čemu se enzimi „zatvaraju“ unutar mreže vlakana ili unutar nosača ostvarujući kovalentne ili nekovalentne interakcije. [96] Ovakvim načinom imobilizacije se sprečava denaturacija enzima što je posledica činjenice da enzimi direktno reaguju sa polimerima. Prednosti ovog načina ireverzibilne imobilizacije su: visok kapacitet imobilizacije, niski troškovi pripreme, mehanička stabilnost i dr, dok su nedostaci otežana difuzija supstrata do aktivnog mesta enzima zbog ograničenog prenosa mase. Najčešće se za zarobljavanje enzima koriste tehnike kao što su fotopolimerizacija, sol-gel metoda ili elektropolimerizacija. [97]

Kako je napred rečeno, osim tehnike imobilizacije jako je bitno izabrati odgovarajući nosač za enzim. U tu svrhu se uglavnom koriste različiti polimeri, koji mogu biti delimično hemijski modifikovani kako bi se ostvarivala jača interakcija između enzima i nosača.

U poslednje vreme imobilizacija enzima u metal-umreženim organskim okvirima (MOF-ovima) predstavlja sve značajniju strategiju u biotehnologiji i biokatalizi. Zbog velike specifične površine, podesive poroznosti i mogućnosti funkcionalizacije, MOF-ovi se smatraju veoma pogodnim nosačima za stabilizaciju i očuvanje aktivnosti enzima. Osim toga, moguća su fina podešavanja imobilizacije u kontekstu promene strukture enzima i orijentacije. Zbog svih ovih karakteristika, MOF-ovi se izdvajaju kao perspektivni materijali za napredne sisteme za imobilizaciju enzima. [98]

2.5.2. Imobilizacija enzima u metal-organskim okvirima

Metal-organski okviri (MOF) predstavljaju vrstu poroznih materijala koji su izgrađeni od ponavljajućih jedinica organskih liganda i jona metala, pri čemu nastaju uređene 2D i 3D mreže. [99] U poređenju sa ostalim nosačima koji se koriste za imobilizaciju MOF-ovi imaju niz prednosti kao što su velika specifična površina, visoka poroznost, mogućnost uvođenja novih funkcionalnih grupa kao i relativno visoka stabilnost. [100] Struktura i morfologija ovih materijala je direktno zavisna od izbora jona metala kao i organskih liganada koji se koriste za sintezu. [101] Njihova poroznost daje mogućnost za imobilizaciju različitih molekula uključujući gasove i enzime, dok je istovremeno

omogućena efikasna difuzija supstrata i proizvoda. Zbog svih ovih prednosti MOF-ovi su se pokazali kao dobri nosači za imobilizaciju različitih enzima kao što su lipaze, lakaze, glukoza-oksidadze i peroksidaze iz rena. [102, 103, 104] Najčešći načini sinteze enzim@MOF kompozita su fizička adsorpcija, kovalentno vezivanje, koprecipitacija ili ugradnja u pore MOFa. Iako su enzim@MOF kompoziti sintetisani metodom fizičke adsorpcije manje stabilni, a kovalentno vezivanje može dovesti do gubitka aktivnosti enzima, sve ove metode su primenjive jer omogućavaju ponovnu upotrebu. [101]

MOF-ovi se takođe međusobno razlikuju i po veličini pora, pa se na osnovu toga mogu podeliti u tri kategorije: mikroporozni (veličina pora <2 nm), mezoporozni (veličina pora 2-50 nm) i makroporozni (> 50 nm). Za imobilizaciju enzima se najčešće koriste MOF-ovi sa porama većim od 2 nm.

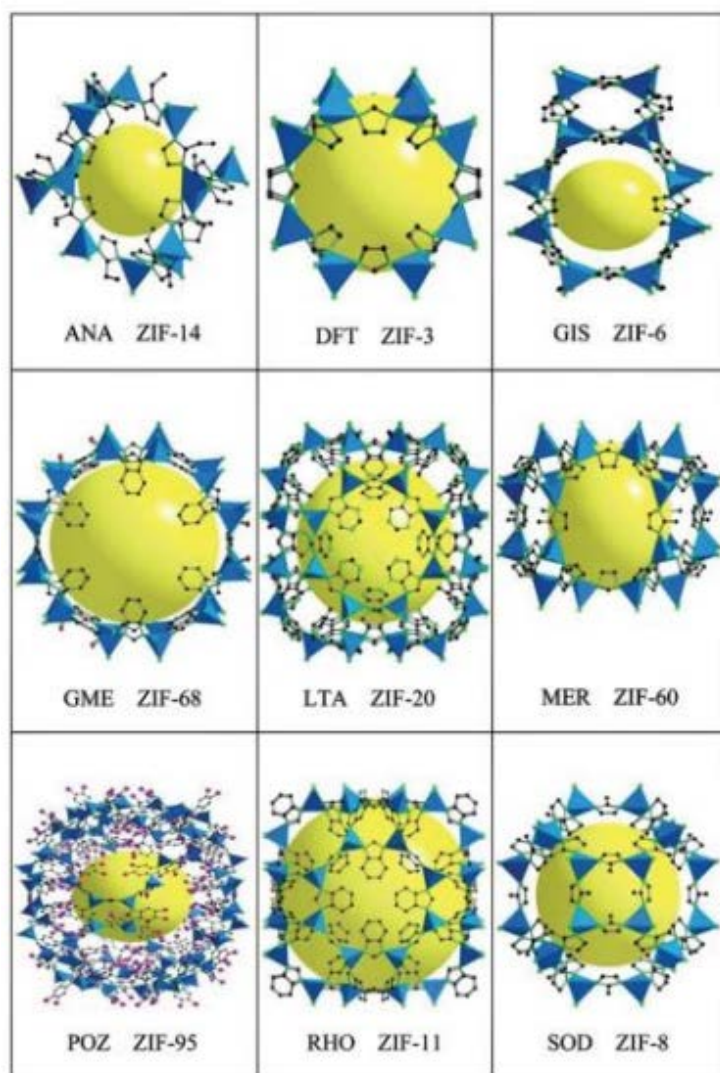
Zahvaljujući izuzetnoj mogućnosti preciznog podešavanja sastava i strukture na atomskom i molekulskom nivou, hijerarhijski porozni MOF materijali omogućavaju finu kontrolu poroznih i strukturnih parametara, uključujući raspodelu i veličinu pora, kao i topologiju metalnih klastera i organskih liganada, način njihove međusobne organizacije i prirodu međupovršina. Ove karakteristike čine hijerarhijski porozne MOF-ove posebno pogodnim za primene u oblastima koje zahtevaju efikasan transport molekula i visoku dostupnost aktivnih mesta, kao što su kataliza i imobilizacija enzima. [99]

Najčešći tipovi MOF-ova uključuju zeolitske imidazolatne okvire (ZIF), izoretikularne MOF-ove (IRMOF), UiO seriju i MIL materijale. [101]

2.5.2.1. Zeolitski imidazolatni okviri (ZIF)

Porozni materijali zeolitskog tipa se smatraju jednim od najvažnijih neorganskih poroznih materijala, koji zbog svoje strukture imaju široku primenu u velikom broju industrijskih procesa kao što su separacija, kataliza i dr. Procenjeno je da ekonomski obim primene zeolita u industriji dostiže i 350 milijardi godišnje, na globalnom nivou. [105] ZIF-ovi se se izdvajaju po svojoj strukturi koja je slična zeolitima, u kojima je fragment Si-O-Si zamenjen M-L-M fragmentom, gde M predstavlja tetraedarske metalne jone kao što su Zn, Co, Cd, Fe, a L predstavlja imidazolatni linker. Različitim strukturnim metodama je utvrđeno da ugao oko kiseonika u zeolitima iznosi 145°, što se slaže sa odgovarajućim uglom mostnog imidazolatnog liganda u ZIF strukturama. Oslanjajući se na ovu ideju do sada je sintetisano više od 100 različitih ZIF-ova. Međutim, u ZIF-ovima osim struktura poznatih kod zeolita uočavaju se i nove tetraedarske topologije, što je možda posledica činjenice da određene topologije koje su karakteristične za zeolite još uvek nisu identifikovane. [106]

Jedan od ranijih pristupa u razvoju strategija za kontrolu zeolitima sličnih topologija ZIF-ova se zasniva na primeni funkcionalizovanih imidazolatnih linkera, a prvi rezultati u tom pravcu su objavljeni 2006. godine. Polazeći od pretpostavke da supstitucija u položaju 2 imidazolnog prstena može uticati na način koordinacije sa Zn^{2+} jonima, pokazano je da izbor odgovarajućeg linkera direktno uslovljava formiranje strukture sa *sod* topologijom, dok se pri korišćenju 2-metilimidazola kao linkera dobijaju ZIF-ovi sa *ana* topologijom. Detaljna strukturna analiza ukazuje na to da priroda i sterni efekti supstituenata utiču na orijentaciju tetraedarske koordinacije cinka, što dalje ima uticaja na način povezivanja jona cinka, a tim i strukturu celog kompozita. [107]



Slika 10. Različite kristalne strukture ZIF-ova (prva tri velika slova označavaju šifru strukture zeolite)[105]

Jedan od ZIF-ova koji se najviše primenjuje je ZIF-8, koji je izgrađen od jona Zn^{2+} i 2-metilimidazola. Zbog svoje sposobnosti da zadrži kristaličnost i poroznost u različitim sredinama, uključujući vodu i organske rastvarače, našao je primenu u različitim reakcijama poput Knoevenagelove reakcije, fotokatalitičkih procesa i adsorpcionih sistema. Budući da se veličina pora i struktura ZIF-8 mogu lako podešavati, ovaj kompozit je našao primenu u procesima adsorpcije i fotokatalize, pa se tako često koristi za uklanjanje zagađivača iz vode. ZIF-8 pokazuje i visoku termičku stabilnost, što je posledica njegove specifične strukture zasnovane na vezama između Zn i imidazolnih linkera. Dostupni literaturni podaci pokazuju da je ZIF-8 struktura stabilna čak i na temperaturama od 550 °C u inertnoj atmosferi, kao i tokom višednevnog izlaganja ključaloj vodi, uz očuvanje kristaličnosti i poroznosti u različitim organskim rastvaračima. Međutim, ZIF-8 pokazuje i niz nedostataka kao što su sklonost ka agregaciji nanočestica u vodi, što dovodi do povećanja veličine čestica, povećanja otpora prenosa naelektrisanja i smanjenja međupovršine, a time i smanjenja adsorpcionog kapaciteta. U cilju prevazilaženja ovih nedostataka razvijeni su brojni hibridni materijali na bazi ZIF-8, najčešće kombinovanjem sa drugim funkcionalnim komponentama. [108]

2.5.2.2. Biomineralizacija enzima u ZIF-8

U prirodi je još odavno poznato da živi organizmi formiraju strukture koje im obezbeđuju egzoskeletnu zaštitu i strukturnu potporu mekim tkivima. Stoga je ovaj biološki indukovani proces, terminološki poznat kao biomineralizacija, moguće izvoditi i u laboratorijskim uslovima. Nastali biokompoziti obično pokazuju bolja mehanička svojstva u odnosu na svoje pojedinačne komponente. Pokazalo se da nakon što su bioaktivni molekuli zaštićeni neorganskim omotačem, oni su pokazali značajno bolja svojstva u pogledu stabilnosti na povišenim temperaturama ili u drugim uslovima koji nisu pogodni za rad enzima.

Do sada su pokušaji integracije enzima u MOF-ove uglavnom bili ograničeni iz dva razloga: u slučaju post-sintetičke inkorporacije moguće je integrisati samo molekule čija je veličina uporediva sa veličinom pora MOF-a, i drugi koji se odnosi na reagens za sintezu MOF-ova, pa se mogu koristiti samo enzimi koji su otporni na njih. [109]

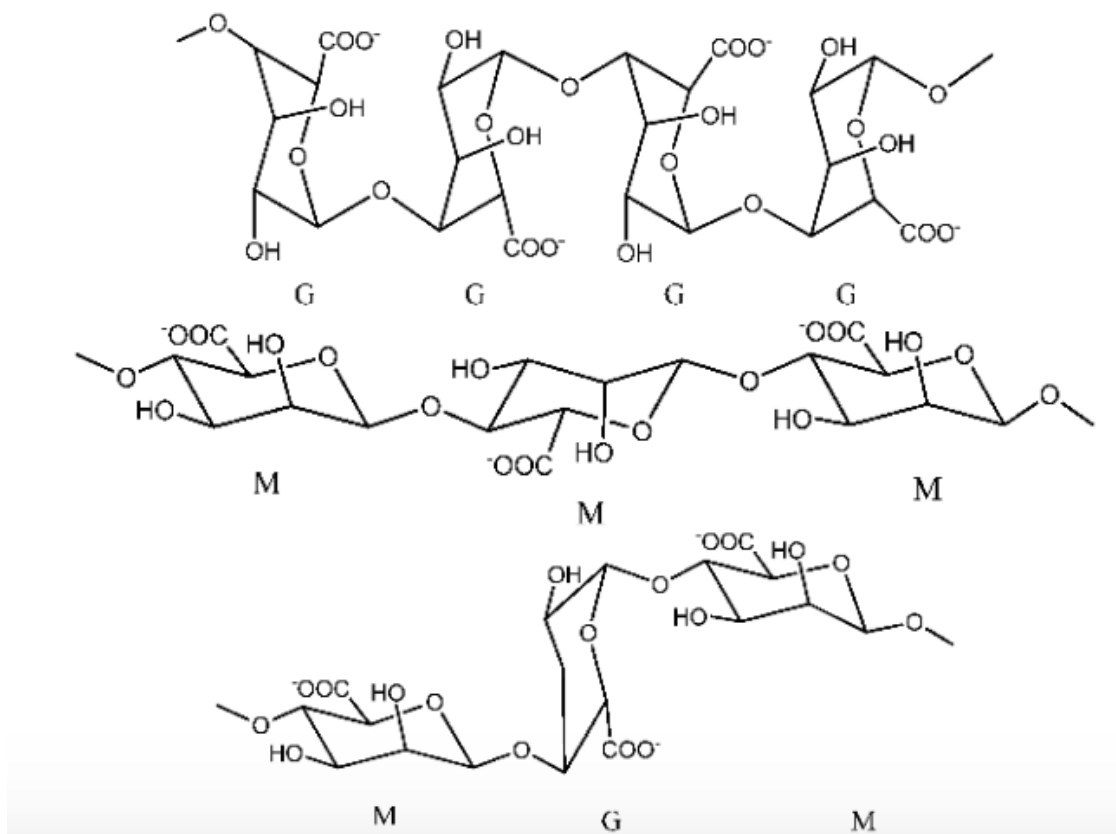
Sam postupak biomineralizacije je složen višestepeni proces, koji zavisi od više činilaca, kao što su složena biološka organska materija, mehanizam rasta kristala i spoljašnji uslovi. Sam proces se odvija tako što međusobno reaguju organski molekuli i joni neorganskih metala na površini i kao rezultat nastaje hijerarhijski uređena struktura. Na formiranje biokompozita takođe utiču i uslovi sredine, kao što su temperatura, pH vrednost i koncentracija čestica. [110]

Prvi primer biomimetičke mineralizacije enzima u MOF je urađen 2015. godine, pri čemu je pokazano da postoji izražen sinergistički efekat interakcija između prekursora MOF-a i biomakromolekula. Ovim eksperimentom je takođe pokazano i da biomakromolekuli regulišu veličinu kristala, morfologiju i kristaličnost, pri čemu se simultano vrši enkapsulacija biomakromolekula unutar poroznog kristala kao i stvaranje novih šupljina koje se nalaze oko njih i ostvaruju veze sa proteinskim lancem. Rezultati su pokazali da enzimi enkapsulirani unutar MOF-a zadržavaju svoju aktivnost čak i nakon izlaganja ekstremnim uslovima. MOF-ovi koji se koriste u ove svrhe su pokazali značajno veću otpornost u poređenju sa drugim materijalima kao što su CaCO_3 ili mezoporozni silicijum-dioksid. Osim toga, kontrolisanjem pH sredine je moguće postepeno oslobađanje enzima iz MOF-a. [109]

Zbog svega navedenog ovaj, prirodom inspirisan, postupak biomineralizacije čiji je osnovni cilj zaštita biomakromolekula od uslova koji narušavaju njihovu stabilnost i aktivnost će u budućnosti imati sve veću primenu u različitim oblastima gde je njihova upotreba bila ograničena, kao što su industrijska biokataliza, farmacija i dr.

2.5.3. Alginat

Alginat je prirodni polimer koji predstavlja 1→4 povezani kopolimer α -L-guluronske kiseline (G) i α -D-manuronske kiseline (M) u različitim odnosima, u zavisnosti od izvora smeđih algi iz kojih se izoluje.



Slika 11. Hemijska struktura alginata[111]

Alginati naročito privlače pažnju budući da imaju sposobnost geliranja u prisustvu dvovalentnih katjona. Istraživanja koja su se ticala razumevanja formiranja veze između hemijske strukture alginata i jonske veze koju ovi dvovalentni katjoni ostvaruju sa alginatom, uglavnom su ukazivala na činjenicu da je sastav alginata ključan za interakciju između biopolimera i katjona. [112, 113, 114]

Proučavanjem strukture alginata se došlo do zaključka da se dvovalentni katjoni najčešće vezuju za G-blokove, ili ako preciznije razmatramo afinitet za vezivanje jona metala opada sledećim redosledom: MG-blokovi < MM-blokovi < GG-blokovi. Dakle, ako želimo da sintetišemo materijal veće krutosti to se može postići korišćenjem alginata koji u svojoj strukturi sadrži više GG-blokova. Iz navedenog se može zaključiti da osim odnosa M/G jedinica, dužina g-blokova i molekulska masa polimera predstavljaju ključne faktore koji značajno utiču na fizička svojstva formiranja gela. [115]

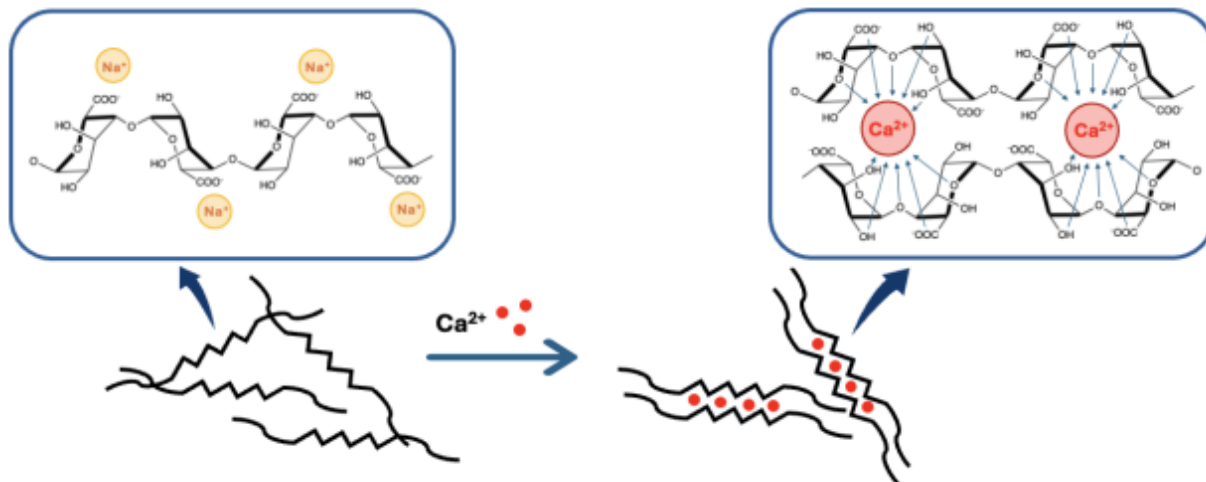
Takođe, značajna prednost alginata ogleda se u činjenici da je ovaj biopolimer odobren od strane američke uprave za hranu i lekove, čime je potvrđena njegova bezbednost za primenu u prehrambenoj industriji i medicini. [114]

2.5.3.1. Hidrogelovi na bazi alginata

Kao što je već spomenuto, zbog svoje strukture, alginati imaju sposobnost formiranja hidrogela u prisustvu dvovalentnih katjona. Hidrogel se definiše kao trodimenzionalna polimerna mreža sa visokim sadržajem vode zarobljene unutar strukture. Različite strukture hidrogelova je moguće dobiti primenom različitih metoda za njihovu sintezu. [116] Osim činjenice da su biokompatibilni alginatni

hidrogelovi, oni se mogu kombinovati sa drugim biopolimerima, kao što je hitozan, radi dobijanja višeslojnih struktura ili poboljšanja mehaničkih svojstava alginatnih kuglica.[117]

Najčešći način pripreme hidrogelova jeste ukapavanjem rastvora natrijum alginata u rastvor koji sadrži dvovalentne katjone, poznate koncentracije. Na ovaj način se formira hidrogel sa takozvanom „egg-box“ morfologijom, što je prikazano na slici ispod.



Slika 12. Mehanizam formiranja “egg-box” hidrogela natrijum alginata u prisustvu jona Ca^{2+} [114]

Prema ovom mehanizmu, dva suprotno orijentisana segmenta bogata G-sekvencama helatno vezuju dvovalentni katjon. Ovakva selektivnost je posledica činjenice da samo GG-blokovi geometrijski omogućavaju formiranje šupljine u koju se smešta jon metala. Sumarno, svaki dvovalentni katjon reaguje sa dve susedne G jedinice, kao i sa dve G jedinice iz suprotnog polimernog lanca, što ima za cilj formiranje hidrogela. U slučaju jona Ca^{2+} , potrebno je najmanje 8 do 20 uzastopnih G jedinica za formiranje stabilnog hidrogela. [118]

2.5.3.2. Enkapsulacija ZIF-8 u hidrogelovima

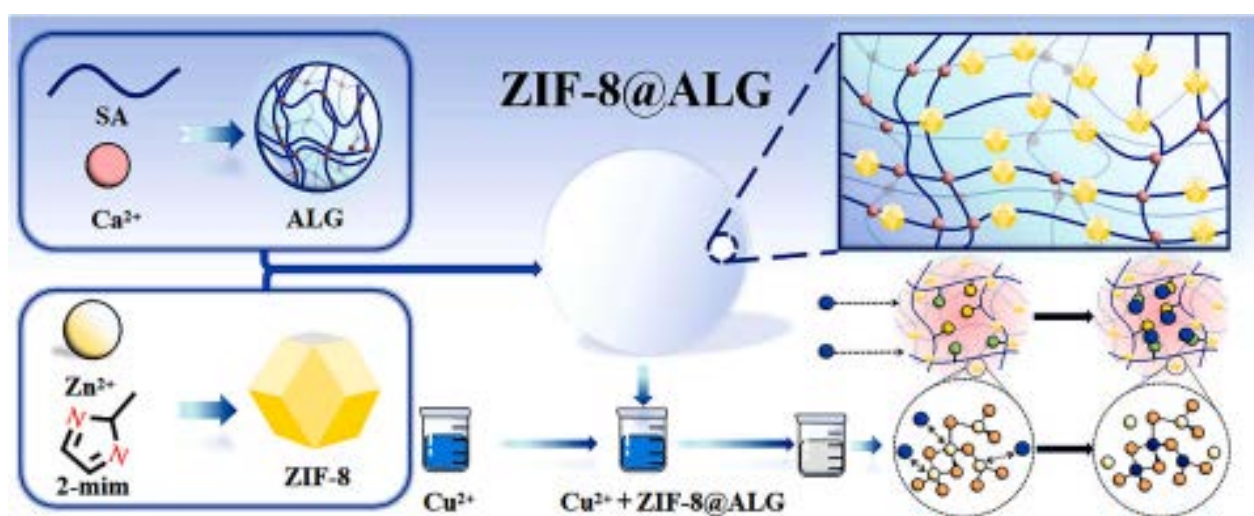
Kako je ranije navedeno enzim@ZIF-8 biokompoziti imaju veliku primenu u rešavanju problema otpadnih voda. Međutim, jedan od izazova za korišćenje ovih biokompozita u te svrhe je što su biokompoziti praškasti i kao takvi imaju otežanu mogućnost reciklaže odnosno ponovne upotrebe. Osim ekonomskog gubitka, ovaj problem može dovesti i do sekundarnog zagađenja i time ograničiti upotrebu ovih materijala. Kao moguće rešenje ovog probleme nameće se imobilizacija enzim@ZIF-8 biokompozita, a i drugih enzim@MOF struktura u druge materijale poput membrana, hidrogelova i dr. Neophodno je da ovi nosači imaju poroznu strukturu, hemijsku i termičku stabilnost u različitim rastvaračima, kao bi efikasno mogli da se koriste u različitim reakcionim uslovima.

U savremenim istraživanjima posebna pažnja posvećena je razvoju kompozitnih hidrogelova na bazi MOF materijala, koji se odlikuju visokim kapacitetom i efikasnošću u adsorpciji jona teških metala. Uvođenjem MOF struktura u matricu hidrogela postiže se sinergijski efekat, pri čemu se unapređuju adsorpcione performanse, ali i prevazilazi ograničenje vezano za otežanu separaciju i ponovnu upotrebu MOF materijala. Hidrogelovi su trodimenzionalno umreženi polimerni sistemi sa visokim sadržajem vode, koji sadrže veliki broj funkcionalnih grupa sposobnih za interakciju sa jonima metala, uključujući $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{CONH}_2$ i $-\text{NH}_2$. Pored izražene hemijske i termičke

stabilnosti, ovi sistemi poseduju i odgovarajuća mehanička svojstva, što ih čini izuzetno pogodnim za primenu u procesima adsorpcije. [119, 120, 121]

Iako je struktura alginatnih hidrogelova takva da imaju veliku adsorpcionu moć, njihova svojstva mogu biti unapređena razvojem kompozitnih hidrogelova koji se dobijaju kombinovanjem alginata sa nano-adsorbensima radi poboljšanja performansi. [122]

Ovako sintetisan ZIF-8@hidrogel kompozit od strane Song i saradnika je pokazao veliku efikasnost u adsorpciji Pb^{2+} jona. Međutim, budući da je EM analiza pokazala neujednačenu raspodelu i nepovoljnu morfologiju ZIF-8, dalja istraživanja su bila usmerena na modifikaciju sastava natrijum-alginatnog hidrogela čime bi se potencijalno omogućila očuvanost unutrašnje strukture tokom sinteze ZIF-8, kao i bolja kontrola sinteze i nukleacije kristala, a time bi se postigla ujednačena raspodela i optimalna morfologija ZIF-8. [123, 122]



Slika 13. Sinteza ZIF-8@alginat biokompozita [122]

Osim klasičnog načina sinteze ZIF-8@hidrogel kompozita, sinteza je moguća i *in situ*, što je prikazano na slici iznad. Ovakvi kompoziti su se pokazali i kao efikasni u uklanjanju jona Cu^{2+} tokom tretmana otpadnih voda. [122]

3. CILJ

Cilj ove doktorske disertacije je razvoj i optimizacija novih biokompozitnih materijala zasnovanih na komercijalnim, hemijski modifikovanim i mutantnim varijantama enzima peroksidaze iz rena (*Armoracia rusticana*) i glukoza-oksidaze iz gljive *Aspergillus niger*, sa unapređenim katalitičkim i operativnim performansama. Poseban fokus istraživanja usmeren je na povećanje enzimske aktivnosti i stabilnosti pri povišenim temperaturama, kao i omogućavanje njihove efikasne višestruke upotrebe.

U tom kontekstu, cilj rada obuhvata racionalan dizajn, proizvodnju i karakterizaciju mutantnih i hemijski modifikovanih enzima sa poboljšanim interakcijama prema čvrstim nosačima, njihovu imobilizaciju u okviru zeolitskih imidazolatnih okvira (ZIF), posebno u ZIF-8 procesom biomimetičke mineralizacije, kao i razvoj hibridnih biokompozita putem dodatne enkapsulacije u alginatne hidrogelove.

Poseban cilj istraživanja predstavlja optimizacija uslova sinteze i detaljna fizičko-hemijska, strukturna i kinetička karakterizacija dobijenih biokompozita, kao i ispitivanje njihovih operativnih performansi u uslovima relevantnim za industrijsku primenu.

Konačni cilj rada je uspostavljanje jasne povezanosti između strukture enzima, strukture zeolit imidazolatnih okvira, uslova imobilizacije i performansi dobijenih biokompozita, radi razvoja stabilnih, efikasnih i višekratno upotrebljivih biokatalitičkih sistema pogodnih za primenu u biotehnologiji, industriji i zaštiti životne sredine.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Mikrobiološke metode

4.1.1. Podloge za rast bakterija

4.1.1.1. Luria-Bertani tečna podloga za rast bakterija (LB)

Ekstrakt kvasca (5g), natrijum hlorid (10 g) i tripton (10 g) su rastvoreni u 1000 ml demineralizovane vode, pri čemu je pH podloge podešen na 7,4, a potom je podloga sterilisana.

4.1.1.2. Luria-Bertani tečna podloga za rast bakterija koje imaju rezistenciju na zeocin (LB-zeocin)

Ekstrakt kvasca (5g), natrijum hlorid (10 g) i tripton (10 g) su rastvoreni u 1000 ml demineralizovane vode, pri čemu je pH podloge podešen na 7,4. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi (40-50 °C) je u sterilnoj zoni dodat rastvor zeocina tako da je finalna koncentracija antibiotika u podlozi bila 25 µg/mL.

4.1.1.3. Luria-Bertani čvrsta podloga za rast bakterija koje imaju rezistenciju na zeocin (LA-zeocin)

Ekstrakt kvasca (5g), natrijum hlorid (10 g), tripton (10 g) i agar (20 g) su rastvoreni u 1000 ml demineralizovane vode, pri čemu je pH podloge podešen na 7,4. Nakon sterilizacije podlozi je u sterilnoj zoni dodat rastvor zeocina tako da je finalna koncentracija antibiotika u podlozi bila 25 µg/mL.

4.1.1.4. Super optimalna tečna podloga za rast bakterija (SOC)

Ekstrakt kvasca (5g), natrijum hlorid (0,5 g) i tripton (20 g) su rastvoreni u 960 ml demineralizovane vode. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodati su 1M magnezijum hlorid (10 mL), 1M magnezijum sulfat (10 mL) i 20% (w/v) glukoza (20 mL), koji su prethodno sterilisani.

4.1.2. Podloge za rast kvasaca

4.1.2.1. Tečna podloga za rast kvasaca (YPD)

Ekstrakt kvasca (10 g) i tripton (20 g) su rastvoreni u 900 mL demineralizovane vode. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi je dodata, prethodno sterilisana, 20% (w/v) glukoza (100 mL).

4.1.2.2. Čvrsta podloga za rast kvasaca (YPD agar)

Ekstrakt kvasca (10 g), tripton (20 g) i agar (20 g) su rastvoreni u 900 mL demineralizovane vode. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi (40-50 °C) je dodata, prethodno sterilisana, 20% (w/v) glukoza (100 mL).

4.1.2.3. Čvrsta podloga za rast kvasaca sa sorbitolom (YPDS agar)

Ekstrakt kvasca (10 g), tripton (20 g), agar (20 g) i sorbitol (182,17 g) su rastvoreni u 900 mL demineralizovane vode. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi (40-50 °C) je dodata, prethodno sterilisana, 20% (w/v) glukoza (100 mL).

4.1.2.4. Čvrsta podloga za rast kvasaca koji imaju rezistenciju na zeocin (YPD+zeocin agar)

Ekstrakt kvasca (10 g), tripton (20 g) i agar (20 g) su rastvoreni u 900 mL demineralizovane vode. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi (40-50 °C) je dodata, prethodno sterilisana, 20% (w/v) glukoza (100 mL), a nakon toga i sterilni rastvor zeocina, tako da finalna koncentracija antibiotika u podlozi bude 100 µg/mL.

4.1.2.5. Tečna podloga za rast transformisane *P. pastoris* KM71H (BMG)

Azotna baza kvasca sa amonijum sulfatom (13,4 g) je rastvorena u 800 mL demineralizovane vode. Nakon sterilizacije, podlozi su dodati 10% (v/v) glicerol (100 ml), 1M KH₂PO₄ pufer pH 6 (100mL) i 0,02% (w/v) biotin (2 mL) takođe prethodno sterilisani, pri čemu je biotin sterilisan kroz filter od 0,22 µm.

4.1.2.6. Tečna podloga za indukciju ekspresije transformisane *P. pastoris* KM71H (BMM)

Azotna baza kvasca sa amonijum sulfatom (13,4 g) je rastvorena u 890 mL demineralizovane vode. Nakon sterilizacije, podlozi su dodati 1M KH₂PO₄ pufer pH 6 (100mL), 0,02% (w/v) biotin (2 mL) i 50% (v/v) metanol (10 mL) takođe prethodno sterilisani, pri čemu su biotin i metanol sterilisani kroz filter od 0,22 µm.

4.1.2.7. Tečna kompleksna podloga za rast transformisane *P. pastoris* KM71H (BCG)

Azotna baza kvasca sa amonijum sulfatom (13,4 g), ekstrakt kvasca (10 g), i pepton (20 g) su rastvoreni u 800 mL demineralizovane vode. Nakon sterilizacije, podlozi su dodati 10% (v/v) glicerol (100 ml), 1M KH₂PO₄ pufer pH 6 (100mL) i 0,02% (w/v) biotin (2 mL) takođe prethodno sterilisani, pri čemu je biotin sterilisan kroz filter od 0,22 µm.

4.1.2.8. Tečna kompleksna podloga za indukciju ekspresije transformisane *P. pastoris* KM71H (BCM)

Azotna baza kvasca sa amonijum sulfatom (13,4 g), ekstrakt kvasca (10 g), i pepton (20 g) su rastvoreni u 890 mL demineralizovane vode. Nakon sterilizacije, podlozi su dodati 1M KH₂PO₄ pufer pH 6 (100mL), 0,02% (w/v) biotin (2 mL) i 50% (v/v) metanol (10 mL) takođe prethodno sterilisani, pri čemu su biotin i metanol sterilisani kroz filter od 0,22 µm.

4.1.3. Pripremanje kompetentnih ćelija

4.1.3.1. Pripremanje hemijski kompetentnih ćelija *E. coli* DH5a i XL10gold

Pojedinačna kolonija *E. coli* sa LB agar ploče je inokulisana u 2 mL LB tečne podloge i gajena u šejkeru preko noći (250 obrtaja/min, 37 °C). Sutradan je 1 mL prekonoćne kulture prebačen u 100 mL LB tečnog medijuma i kultura je gajena u šejkeru (250 obrtaja/min, 37 °C) dok optička gustina na 600 nm nije dostigla vrednost 0,3. Kada su ćelije dostigle odgovarajuću optičku gustinu, prebačene su u vaju i inkubirane na ledu tokom deset minuta, a nakon toga centrifugirane (3000 obrtaja/min, 4 °C, 10 min). Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen, a ćelije resuspendovane u 10 mL ledeno-hladnog CaCl₂ rastvora (60 mM CaCl₂, 15% glicerol, 10 mM TRIS pH 7,0). Čelijske suspenzije su potom centrifugirane (3000 obrtaja/min, 4 °C, 5 min). Postupak resuspendovanja ćelija u CaCl₂ rastvoru i centrifugiranja je ponovljen još jednom. Nakon toga, supernatant je odbačen, a ćelije finalno resuspendovane u 1 mL ledeno-hladnog CaCl₂ rastvora i alikvotirane, a potom zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80 °C.

4.2.3.2. Pripremanje elektro-kompetentnih ćelija *P. pastoris* KM71H

Jedna kolonija *P. pastoris* KM71H sa YPD agar ploče je inokulisana u 3 mL YPD tečnog medijuma, koji je sadržao 12,5 µg/mL hloramfenikola i gajena u šejkeru preko noći (200 obrtaja/min, 30 °C). Sutradan je 100 µL prekonoćne kulture prebačeno u 50 mL YPD medijuma i kultura je opet gajena preko noći (150 obrtaja/min, 30 °C), dok optička gustina ćelija na 600 nm nije dostigla vrednost 1-2. Nakon što su ćelije dostigle odgovarajuću gustinu, čelijska suspenzija je centrifugirana (3000 obrtaja/min, 10 min). Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen, a ćelije resuspendovane u 10 mL DTT/LiAc rastvora (100 mM Litijum acetat, 10 mM DTT, 0,6 M sorbitol, 10 mM TRIS pH 7,5) i inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, uz blago mešanje. Potom je čelijska suspenzija centrifugirana (3000 obrtaja/min, 5 min), supernatant je odbačen, a ćelije resuspendovane u 1 mL ledeno-hladnog 1 M sorbitola. Nakon centrifugiranja (3000 obrtaja/min, 5 min), ćelije su isprane još dva puta 1 M sorbitolom, na isti način. Isprane ćelije su resuspendovane u 500 µL ledeno-hladnog 1 M sorbitola, alikvotirane i zamrznute na -80 °C.

4.2. Molekularno-biološke metode

4.2.4. Transformacija kompetentnih *E. coli* ćelija

Alikvot (50 µL) XL10gold kompetentnih *E. coli* ćelija je inkubiran na ledu nakon vađenja iz zamrzivača. Potom je u alikvot ćelija dodat 1 µL rastvora plazmida i inkubiran na ledu tokom 30 minuta. Po isteku 30 minuta transformaciona smeša je podvrgnuta toplotnom šoku na 42 °C tokom 45 sekundi, a zatim odmah stavljena na led 2 minuta. Nakon toga je transformacionoj smeši dodato 1 mL SOC medijuma i inkubirana je u šejkeru (1h, 37 °C). Nakon inkubiranja, kultura je centrifugirana, 900 µL supernatanta je odbačeno, a u presotalih 100 µL su resuspendovane transformisane ćelije i plejtovane na LB agar podloge sa odgovarajućim antibiotikom. LB podloge su inkubirane preko noći u inkubatoru (37 °C).

4.2.5. Izolovanje plazmida iz bakterija

Jedna kolonija sa LB čvrste podloge sa odgovarajućim antibiotikom je inokulisana u 3 mL LB tečne podloge sa odgovarajućim antibiotikom i gajena u šejkeru (250 obrtaja/min, 37 °C) tokom noći.

Sutradan je prekonoćna kultura prebačena u ependorficu (1,5 mL) i centrifugirana (13000 obrtaja/min, 1 minut). Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen, a ćelije resuspendovane u GTE+ rastvoru (25 mM TRIS, 10 mM EDTA, 50 mM glukoza, 100 µg/mL ribonukleaze, pH 8) (150 µL). Potom je dodato 300 µL P2 rastvora (200 mM NaOH, 1% SDS) i polako mešano dok se sadržaj nije izbistrio. Bistrom rastvoru je dodato još 450 µL hladnog 1M kalijum-acetatnog rastvora pH 6,3 i polako izmešano izvrtanjem ependorfa nekoliko puta. Suspenzija je centrifugirana (13000 obrtaja/min, 8 minuta), a nakon toga je supernatant prebačen u novu ependorficu i njemu je dodato 400 µL izopropanola. Sadržaj ependorfe je promešan nekoliko puta, a zatim centrifugiran (13000 obrtaja/min, 8 min). Supernatant je odbačen, talogu je dodat 1 mL ledeno-hladnog 75% etanola, a potom je smeša centrifugirana (13000 obrtaja/min, 2 min). Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen, a talog u kome je plazmidna DNK je osušen u vakuum uparivaču (45 °C, 30 minuta).

4.3. Eksperija i prečišćavanje enzima (glukoza oksidaza i peroksidaza iz rena)

4.3.1. Transformacija *P. pastoris* KM71H

Pre transformacije *P.pastoris* KM71H kompetetnih ćelija, najpre je bilo neophodno linearizovati plazmide koje sadrže gen za odgovarajuće enzime (glukoza-oksida i peroksida iz rena). Postupak linearizacije je rađen tako što je restrikciona smeša, čiji je sastav prikazan u Tabeli 1 inkubirana na sobnoj temperaturi tokom noći. Sutradan je reakcija linearizacije prekinuta inkubiranjem restrikcione smeše u termobloku prema uputstvima proizvođača (20 min, 80 °C).

Tabela 2. Sastav restrikcione smeše za linearizaciju plazmida

Komponenta	Zapremina
MiliQ voda	7 µL
Plazmid	10 µL
10x pufer za restrikcioni enzim	2 µL
<i>PmeI</i> (5 U/µL)	1 µL
Ukupna zapremina	20 µL

Prethodno pripremljene elektrokompetentne ćelije *P. pastoris* KM71H su pomešane sa 10 µL linearizovanog plazmida. Reakciona smeša je prebačena u prethodno ohlađenu elektroporacionu kivetu (BioRad, Kalifornija, SAD) i ostavljen na ledu tokom 5 minuta. Potom su ćelije transformisane u elektroporatoru (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) postupkom elektroporacije na voltaži 2500 V tokom 5 ms. Nakon elektroporacije je u ćelije dodat 1 mL ledeno hladnog 1 M sorbitola. Najpre su ćelije inkubirane u šejkeru bez mućkanja (1h, 30 °C), a potom je u suspenziju ćelija dodato 2 mL YPD medijuma i ćelije su gajene u šejkeru narednih tri sata (250 obrtaja/min, 30 °C). Po isteku tri sata, suspenzija je centrifugirana (3000 obrtaja/min, 5 minuta), deo supernatante odbačen, a u preostalih 200 µL YPD medijuma, ćelije su resuspendovane a potom plejtovane na YPD ploče sa zeocinom (100 µg/mL) i gajene u inkubatoru (3 dana, 30 °C).

4.3.2. Ekspresija enzima u *P. pastoris* KM71H

Jedna kolonija transformisane *P. pastoris* KM71H koja sadrži odgovarajući gen za enzim, izolovana je sa YPD agar ploče sa zeocinom (100 µg/mL), inokulisana je u 10 mL odgovarajućeg medijuma za rast ćelija (BMG medijum za rast ćelija sa genom za glukoza-oksida, odnosno BCG medijumom za rast ćelija sa genom za peroksida iz rena) i gajeno u šejkeru (24 sata, 200 obrtaja/min, 30 °C).

Nakon toga, je po 1 mL prekonoćne kulture prebačenu u četiri erlenmajera (1 L) koji su sadržali po 250 mL pomenutih medijuma i gajeno u šejkeru (30 °C, 220 obrtaja/min) dok optička gustina ćelija na 600 nm nije dostigla vrednost 5-6. Prekonoćne kulture su potom centrifugirane (2000 obrtaja/min, 20 minuta) a nakon toga resuspendovane u ukupno 100 ml odgovarajućeg medijuma za indukciju ekspresije (BMG za glukoza-oksidadu, BCM za peroksidazu iz rena) i gajene pod opisanim uslovima tokom 5 dana. Na svakih 24 sata je uziman alikvot (500 µL) kako bi se pratila ekspresija proteina i nakon toga ćelijama je dodavan 50% metanol tako da finalna koncentracija metanola bude 0,5%. Takođe, za ekspresiju peroksidaze iz rena osim metanola, na svakih 24 sata je dodavan i hemin, kao prekursor hema, tako da finalna koncentracija bude 1 mM.

4.3.3. Prečišćavanje eksprimiranih proteina metodom jonoizmenjivačke hromatografije

Nakon pet dana fermentacije, kulture su centrifugirane (3000 obrtaja/min, 20 minuta). Nakon toga, supernatant je proceđen kroz filter veličine 0,22 µm, a potom skoncentrovan upotrebom *Viva Flow 50* sistem sa ultrafiltracionom membranom veličine 10 kDa *cut-off* (Sartorius, Nemačka) u slučaju glukoza-oksidade, dok je za peroksidazu iz rena korišćena ultrafiltraciona membrana veličine 5 kDa *cut-off* (Sartorius, Nemačka).

Skocentrovani supernatant nakon fermentacije glukoza-oksidade je najpre stavljen na dijalizu naspram 5 mM Na₂HPO₄ pufera pH 6 tokom noći na 4 °C, dok je u slučaju peroksidaze iz rena skoncentrovani supernatant dijalizovan naspram 10 mM Na₂HPO₄ pufera pH 7,4. Za prečišćavanje oba enzima je korišćena HPLC kolona DEAE *fast flow* od 10 mL prethodno ekvilibrisana 5 mM Na₂HPO₄ puferom pH 6 za glukoza-oksidadu odnosno 10 mM Na₂HPO₄ puferom pH 7,4 za peroksidazu iz rena. Glukoza-oksida je eluirana linearnim gradijentom od 10 do 500 mM Na₂HPO₄ puferom pH 6 sa deset zapremina kolone, a eluirani protein je sakupljan u frakcijama od 1 mL pri protoku od 1 mL/min. Peroksidaza iz rena je eluirana linearnim gradijentom koristeći 10 mM Na₂HPO₄ pufer pH 7,4 i 10 mM Na₂HPO₄ pufer pH 7,4 sa 1M NaCl, takođe sa 10 zapremina kolone u frakcijama od 1mL pri protoku od 1mL/min. Prilikom hromatografskog prečišćavanja oba proteina praćena je apsorbanca na 280, 420 i 450 nm. Step prečišćenja proteina određen je SDS poliakrilamidnom elektroforezom.

4.5. Analitičke metode

4.5.1. Određivanje koncentracije proteina spektroskopskom metodom

Koncentracija čistog proteina određivana je spektroskopskom metodom. Apsorbanca je merena u UV transparentnim mikrotitar pločicama, koristeći Synergy LX BioTek eliza čitač, a nakon toga je koncentracija određena koristeći teorijski ekstincioni koeficijent za odgovarajuće enzime.

4.5.2. Agarozna DNK elektroforeza

U kadu za elektroforezu je izlivena 1% agarozu u 1x TBE puferu (89 mM TRIS, 89 mM borna kiselina, 20 mM EDTA pH 8,0). U bunariće gela je nanošeno 5 µL uzorka homogenizovanog sa 1 µL 6x *purple loading dye*, kao i 1 µL DNK molekulskih markera, pripremljenih na isti način, sa kojima su dobijene trake uzoraka poređenje kako bi se utvrdila tačna masa. Elektroforeza je rađena pod

naponom od 80 V, a DNK je vizuelizovana pod UV-lampom na osnovu prisustva *SYBER Green* boje koja je dodavana u agarozni gel tokom pripreme.

4.5.3. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Za elektroforetsko razdvajanje eksprimiranih proteina i određivanje čistoće je korišćena reduktivna poliakrilamidna gel elektroforeza. Analize su rađene na 10% razdvajajućem i 4% koncentrujućem gelu, čiji je sastav prikazan u Tabeli 2.

Tabela 3. Komponente za pripremu gelova za razdvajanje i koncentrovanje kod SDS-PAGE elektroforeze

Rastvori	10% gel za razdvajanje	4% gel za koncentrovanje
Monomerni rastvor akrilamida (30% T, 2,7% C)*	3,33 mL	0,50 mL
1,5 M TRIS pH 8,8	2,50 mL	/
0,5 M TRIS pH 6,8	/	0,94 mL
Voda	4,00 mL	2,25 mL
10% SDS	0,10 mL	38 µL
TEMED	4 µL	2 µL
10% amonijum persulfat (APS)	50 µL	25 µL
Ukupna zapremina	10 mL	4 mL

* T-ukupna masa akrilamida i bisakrilamida u 100 mL rastvora; C-masa bisakrilamida u odnosu na T.

Nakon što je pripremljen rastvor gela za razdvajanje nanet je između stakala i nadslojen zasićenim rastvorom n-butanola. Polimerizovani gel je ispran od viška n-butanola destilovanom vodom i nakon toga je nanet rastvor gela za koncentrovanje uzoraka, u koji je uronjen češalj za formiranja bunarića za nanošenje uzoraka.

Priprema uzoraka za SDS elektroforezu je podrazumevala homogenizaciju uzorka sa puferom za pripremu uzorka (60 mM TRIS pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM β-merkaptotanol, 0,02% brom fenol plavo) u odnosu 1:5. Ovako pripremljeni rastvori su inkubirani u termobloku (95 °C, 10 minuta). Ohlađeni uzorci, kao i proteinski markeri (Thermo Fisher Scientific, SAD) su nanošeni u bunare SDS gela, s tim da su proteinski markeri nanošeni u zapremini od 5 µL, a ispitivani uzorci u zapremini od 20 µL. Elektroforeza je rađena najpre pri konstantnom naponu od 80V dok uzorci nisu došli do razdvajajućeg gela, a zatim na 180V do završetka elektroforeze u kadi sa puferom za elektroforezu (0,025 M TRIS pH 8,3, 0,192 M glicin, 0,1% SDS).

Po završenoj elektroforezi gel je kratko inkubiran u destilovanoj vodi, a potom 20 minuta u rastvoru za bojenje i fiksiranje (0,1% *Comassie brilliant blue* G-250, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina). Po isteku navedenig vremena, gelovi su prebačeni u rastvor za obezbojavanje (7% rastvor sirćetne kiseline) do pojave obojenih proteinskih traka u gelu.

4.5.4. Nativna elektroforeza

Osim opisane SDS poliakrilamidne elektroforeze, uzorci su analizirani i pomoću native elektroforeze. Za pripremu 10% koncentrujućeg i 4% razdvajajućeg gela su korišćeni rastvori navedeni u Tabeli 3.

Tabela 4. Komponente za pripremu gelova za razdvajanje i koncentrovanje kod nativne elektroforeze

Rastvori	10% gel za razdvajanje	4% gel za koncentrovanje
Monomerni rastvor akrilamida (30% T, 2,7% C)*	3,33 mL	0,50 mL
1,5 M TRIS pH 8,8	2,50 mL	/
0,5 M TRIS pH 6,8	/	0,94 mL
Voda	4,10 mL	2,29 mL
TEMED	4 μ L	2 μ L
10% amonijum persulfat (APS)	75 μ L	25 μ L
Ukupna zapremina	10 mL	4 mL

* T-ukupna masa akrilamida i bisakrilamida u 100 mL rastvora; C-masa bisakrilamida u odnosu na T.

Nakon što je pripremljen rastvor gela za razdvajanje nanet je između stakala i nadslojen zasićenim rastvorom n-butanola. Polimerizovani gel je ispran od viška n-butanola destilovanom vodom i nakon toga je nanet rastvor gela za koncentrovanje uzoraka, u koji je uronjen češalj za formiranja bunarića za nanošenje uzoraka.

Priprema uzoraka za nativnu elektroforezu je podrazumevala homogenizaciju uzorka sa puferom za pripremu uzorka (60 mM TRIS pH 6,8, % glicerol, 2% SDS, 0,02% brom fenol plavo) u odnosu 1:5. Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni na gel, u zapremini od 20 μ L, ali u dve serije, kako bi se druga polovina gela iskoristila kasnije za zimogram. Elektroforeza je rađena najpre pri konstantnom naponu od 80V dok uzorci nisu došli do razdvajajućeg gela, a zatim na 180V do završetka elektroforeze u kadi sa puferom za elektroforezu (0,025 M TRIS pH 8,3, 0,192 M glicin). Po završetku elektroforeze gel je skalpelom podeljen na dva dela. Jedna polovina je kratko inkubirana u destilovanoj vodi, a potom 20 minuta u rastvoru za bojenje i fiksiranje (0,1% *Comassie brilliant blue* G-250, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina). Po isteku navedenog vremena, gelovi su prebačeni u rastvor za obezbojavanje (7% rastvor sirćetne kiseline) do pojave obojenih proteinskih traka u gelu.

4.5.5. Detekcija aktivnosti enzima u nativnom gelu (zimogram)

Druga polovina gela nakon završene nativne elektroforeze je inkubirana u rastvoru za merenje aktivnosti odgovarajućeg enzima do pojave traka na gelu koje potiču od aktivnosti HRP-a odnosno GOx-a.

4.5.6. Dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (2D PAGE)

Prečišćena izoforma peroksidaze iz rena je analizirana poliakrilamidnom gel elektroforezom u dve dimenzije. Cilj ove metode je bio da se potvrdi homogenost izolovane izoforme i odredi izoelektrična tačka enzima. Naime, u prvoj dimenziji 15 μ g uzorka je razdvojeno izoelektričnim fokusiranjem na 5% (w/v) poliakrilamidnom gelu koji je sadržao 2,4% (v/v) amfolita (pH 3,5-10, Farmacija) pri nativnim uslovima. Nakon razdvajanja u prvoj dimenziji, deo gela na kom se nalazio ispitivani protein je inkubiran u ekvibracionom puferu (62,5 mM TRIS·HCl, 5% β -merkaptetoetanol, 2,5% SDS, 10% glicerol) tokom 1 h (2x30 minuta), nakon čega je nanet na 12% denaturišući gel u drugoj dimenziji.

Nakon toga je protein od interesa vizuelizovan nakon bojenja CBB R-250 bojom. Izoelektrična tačka ispitivanog proteina je izračunata na osnovu standardne prave koja je konstruisana prema kretanju amfolita pri primenjenim uslovima u prvoj dimenziji.

4.6. Fizičko-hemijske metode za karakterizaciju materijala

4.6.1. Određivanje zeta potencijala uzoraka

Zeta potencijal uzoraka određen je pomoću uređaja Malvern NanoZS90 Zetasizer (Malvern, UK) na sobnoj temperaturi (25 °C). Merenja su vršena u jednokratnim ćelijama za zeta potencijal (DTS 1070), jedan minut nakon uspostavljanja ravnoteže pri prirodnom pH vrednosti suspenzije.

4.6.2. Rendgenska strukturna analiza uzoraka prahova (PXRD)

Difraktogrami prahova snimljeni su metodom difrakcije rendgenskih zraka na prahu (PXRD) na difraktometru Rigaku SmartLab X-ray Diffractometer, koji radi u θ - θ geometriji sa uzorcima postavljenim u horizontalnom položaju. Merenja su izvedena u parafokusirajućoj Bragg-Brentano geometriji uz upotrebu D/teX Ultra 250 trakastog detektora u standardnom 1D režimu, koristeći $\text{CuK}\alpha_{1,2}$ zračenje ($U = 40 \text{ kV}$, $I = 30 \text{ mA}$). Difrakcioni obrasci snimani su u opsegu 2θ od 5° do 65° , sa korakom od $0,01^\circ$.

4.6.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja (FESEM)

Morfologija biokompozitnih uzoraka ispitivana je metodom skenirajuće elektronske mikroskopije sa emisijom polja (FESEM) na mikroskopu FEI Scios 2 DualBeam (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Mikrografije su snimane pri ubrzavajućem naponu od 10 kV u uslovima visokog vakuuma. Pre analize, uzorci su presvučeni tankim slojem zlata standardnom tehnikom naparavanja (*sputtering*) radi poboljšanja električne provodljivosti.

4.7. Hemijske modifikacije enzima

4.7.1. Izolovanje HRP-C1A izoforme

Budući da komercijalno dostupna peroksidaza iz rena predstavlja smešu različitih izoformi, u cilju dobijanja jedne specifične izoforme tj. izoforme C1A rađeno je prečišćavanje jonoizmenjivačkom hromatografijom. Smeša liofilizovane komercijalne peroksidaze je rastvorena u 5 mM natrijum acetatnom puferu pH 4,5 do finalne koncentracije 5 mg/ml. Ovako pripremljen uzorak je dijalizovan naspram 5 mM natrijum acetatnog pufera (pH 4,5) tokom 24 sata na 4 °C. Nakon toga uzorak je prečišćen jonoizmenjivačkom hromatografijom gde je kao matriks korišćena karboksimetil celuloza (zapremina kolone je 5 ml) ekvilibrisana, takođe, 5 mM natrijum acetatnim puferom (pH 4,5). Po nanošenju uzorka nevezane frakcije su eluirane ekvilibracionim puferom. Vezane frakcije su eluirane korišćenjem 15 mM i 50 mM natrijum acetatnog pufera pH 4,6 i 100 mM natrijum acetatnog pufera pH 5,5. Sve frakcije su prikupljene i izmerena im je apsorbanca na 280 i 405 nm. Step prečišćavanja i izolovanja specifične izoforme je analiziran SDS poliakrilamidnom elektroforezom, gde su za određivanje molekulske mase korišćeni standardni molekulski marker, a pI vrednost izolovane izoforme je potvrđena izoelektričnim fokusiranjem. Frakcije koje su sadržala ciljanu izoformu su sakupljene i korišćene za dalje eksperimente.

4.7.2. Perjodatna oksidacija enzima (HRP i GOx)

Pripremljeni su rastvori enzima HRP i GOx (finalne koncentracije 2 mg/ml i 1,5 mg/ml, respektivno) u 50 mM natrijum acetatnom puferu pH 5. Nakon toga je dodat rastvor natrijum metaperjodata tako da finalne koncentracije budu 2,5, 5 i 50 mM, a potom je uzorak inkubiran 6 sati na 4 °C u mraku. Višak natrijum metaperjodata je uklonjen dodatkom glicerola (85% w/v) i homogenizacijom smeše 30 min na magnetnoj mešalici, pri čemu je finalna koncentracija glicerola bila 100 mM. Nakon toga perjodatno oksidovani uzorci su dijalizovani naspram destilovane vode tokom 24 sata na 4 °C. Takođe, prethodno izolovana izoforma C1A je oksidovana na isti način. Uspešnost perjodatne oksidacije je potvrđena nativnom i poliakrilamidnom elektroforezom.

4.7.3. Hemijske modifikacije GOx L-aspartatom i L-histidinom

Pripremljen je rastvor GOx u 50 mM natrijum acetatnom puferu pH 5 i dodat rastvor natrijum metaperjodata, tako da finalna koncentracija natrijum metaperjodata bude 50 mM. Reakciona smeša je inkubirana na 4 °C tokom 6 sati, u mraku, uz povremeno mešanje. Kako bi se uklonio višak metaperjodata, dodat je glicerol (85% w/v) u višku, pri čemu je reakciona smeša homogenizovna 30 minuta na magnetnoj mešalici. Oksidovani enzim je dijalizovan naspram destilovane vode tokom noći na 4 °C, a nakon toga naspram 50 mM natrijum fosfatnog pufera pH 7, tokom 6 sati, na 4 °C.

Postupak reduktivne aminacije je rađen tako što je prethodno perjodatno oksidovan enzim podeljen u dva alikvota. U prvi alikvot je dodat rastvor L-aspartata (2 mg/ml), a u drugi alikvot rastvor L-histidina (2 mg/ml), nakon čega je smeša inkubirana na 4 °C tokom 30 minuta, u mraku. Nakon toga u oba alikvota je dodat natrijum cijanoborhidrid (5 mg/ml). Po završenoj reakciji reduktivne aminacije, uzorci su dijalizovani na sobnoj temperaturi, uz mešanje, naspram 50 mM natrijum acetatnog pufera pH 5 (2 sata), naspram destilovane vode (3 sata) i na kraju još jednom naspram destilovane vode tokom 3 sata. Dijalizovani uzorci su potom okarakterisani merenjem merenjem apsorbanse na 280 nm, a nakon toga liofilizovan.

4.8. Imobilizacija enzima (GOx i HRP) u različitim ZIF-ovima metodom biomimetičke mineralizacija

4.8.1. Imobilizacija GOx u ZIF-8 metodom biomimetičke biomineralizacije

Procesom biomineralizacije u ZIF-8 su imobilizovani različiti oblici glukoza-oksidade i to: nativna i 2,5 mM perjodatno oksidovana glukoza-oksida, hemijski modifikovana L-aspartatom i L-histidinom glukoza-oksida kao i *wild type* i mutirane varijante enzima. Svi rastvori enzima su homogenizovani sa rastvorom cink acetata tokom 1 minut na magnetnoj mešalici, tako da finalne koncentracije u reakcionoj smeši budu 0,35 mg/mL za različite rastvore enzima glukoza-oksida, a 20 mM za rastvor cink acetata. Nakon toga dodat je rastvor 2-metil imidazola u finalnoj koncentraciji 1M i reakciona smeša je homogenizovana na magnetnoj mešalici tokom 30 minuta, a zatim je ostavljena na sobnoj temperaturi tokom 12 sati. Suspenzija je potom centrifugirana (6000 obrtaja/min, 10 min), supernatanti su sačuvani za dalje analize, a talozi dodatno isprani tri puta sa po 500 µL destilovane vode. Svi ispirci su spojeni i takođe sačuvani za dalje analiziranje.

Nakon ispiranja vodom, kako bi se uklonili površinski adsorbovani proteini, uzorci su inkubirani u 1% SDS (1 mL) tokom 30 minuta, a nakon toga isprani dva puta sa 0,1 M natrijum acetatnim puferom pH 5,5, dva puta sa 96% (w/v) etanolom in a kraju sa destilovanom vodom.

4.8.2. Imobilizacija HRP u ZIF-8 metodom biomimetičke biomineralizacije

Takođe, različiti oblici enzima peroksidaze iz rena su imobilizovani u ZIF-8, tj. *nativna* i 2,5 mM perijodatno oksidovana peroksidaza iz rena, kao i *wild type* i mutirane varijante enzima. Sam proces biomimetičke mineralizacije se ne razlikuje od postupka opisanog u poglavlju 4.8.1, sa izuzetkom promene koja se odnosi na finalnu koncentraciju rastvora enzima. Naime, u slučaju svih rastvora enzima peroksidaze iz rena finalna koncentracija rastvora u suspenziji je bila 0,50 mg/mL. Takođe, u slučaju ovih biokompozita površinski adsorbovani proteini su uklanjani inkubiranjem biokompozita u 1M NaCl tokom 30 minuta, a nakon toga isprani 3 puta destilovanom vodom i korišćeni za dalju analizu.

4.8.3. Biomimetička mineralizacija GOx u ZIFzni

Rastvor *nativne* glukoza-oksidge i cink acetata su homogenizovani tokom 1 minuta. Nakon toga, u reakcionu smešu je dodat rastvor imidazola i suspenzija je homogenizovana na magnetnoj mešalici tokom 30 minuta. U ovom protokolu, finalna koncentracija enzima je bila 0,35 mg/mL. Finalne koncentracije cink acetata su bile 10, 20 i 60 mM, dok je finalna koncentracija imidazola bila 10, 20, 50 i 100 puta veća od finalne koncentracije cink acetata u reakcionoj smeši. Nakon mešanja, suspenzije su ostavljene na sobnoj temperaturi tokom 12 sati, a su centrifugirane (6000 obrtaja/min, 10 min). Supernatanti su sačuvani za dalje analiziranje, a talozi tri puta isprani sa po 500 µL destilovane vode, pri čemu sus vi ispirci spojeni i sačuvani za dalja ispitivanja.

4.8.4. Sintaza hibridnih HRP@ZIF-8@hidrogel biokompozita

Hibridni biokompoziti na bazi peroksidaze rena (HRP), ZIF-8 i alginatnog hidrogela sintetisani su postupkom biomimetičke mineralizacije enzima u okviru ZIF-8 strukture, nakon čega je izvršena enkapsulacija dobijenog biokompozita u alginatne mikro-kuglice

Biomimetička mineralizacija HRP u ZIF-8 izvedena je mešanjem rastvora cink acetata dihidrata i rastvora enzima, nakon čega je dodat rastvor 2-metilimidazola kao organskog liganda. U tipičnoj sintezi, 200 µL rastvora $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ koncentracije 240 mM mešano je sa odgovarajućom količinom HRP tako da konačna koncentracija enzima u reakcionoj smeši iznosi 0,05; 0,1 ili 0,33 mg/mL. Smeša je ručno homogenizovana tokom 5 min, nakon čega je dodat 1,2 M rastvor 2-metilimidazola do ukupne zapremine od 2,4 mL. Reakciona smeša je mešana 30 min na sobnoj temperaturi, a zatim ostavljena da stoji dodatnih 60 min bez mešanja.

Dobijena suspenzija centrifugirana je 5 min pri 12000 rpm, a supernatanti su sačuvani radi određivanja nevezane enzimске aktivnosti. Talog je ispiran tri puta destilovanom vodom uz homogenizaciju na vorteks uređaju i ponovno centrifugiranje. Nakon ispiranja, dobijeni HRP@ZIF-8 biokompozit resuspendovan je u destilovanoj vodi do željene koncentracije.

Za pripremu hidrogelnih biokompozita korišćen je 2% (w/v) rastvor natrijum-alginata pripremljen rastvaranjem alginata u destilovanoj vodi. Kao rastvor za geliranje korišćen je 2,5% (w/v) ZnCl_2 . Suspenzija HRP@ZIF-8 biokompozita mešana je sa rastvorom alginata u odnosu 1:2 (v/v), nakon čega je smeša prebačena u špric sa iglom prečnika 26G. Formiranje mikro-kuglica vršeno je kapanjem suspenzije u rastvor ZnCl_2 uz blago mešanje na magnetnoj mešalici. Formirane kuglice približnog prečnika oko 2 mm ostavljene su u rastvoru za geliranje tokom 1 h radi stabilizacije strukture.

U drugom setu eksperimenata ispitivan je uticaj koncentracije HRP@ZIF-8 suspenzije na karakteristike hidrogelnog biokompozita. Nakon sinteze HRP@ZIF-8 pri početnoj koncentraciji HRP

od 0,33 mg/mL, dobijeni talog resuspendovan je u različitim zapreminama vode kako bi se dobile suspenzije koncentracija 57,6 mg/mL i 15,4 mg/mL, koje su zatim korišćene za pripremu HRP@ZIF-8@ALG mikro-kuglica.

4.9. Karakterizacija enzima

4.9.1. Određivanje aktivnosti enzima

Aktivnost glukoza-oksidadze u svim eksperimentima je merena korišćenjem ABTS- a kao supstrata. Merenja su izvedena tako što je u 90 μ L 100mM natrijum acetatnog pufera pH 5,5 ispipetirano 10 μ L uzorka enzima. Neposredno pre merenja u bunar je dodato 100 μ rastvora koje je sadržao 500 mM glukozu, 2 mM ABTS, 2 IU/ml HRP kao i 100 mM natrijum acetatni pufer pH 5,5, nakon čega je praćena promena apsorbance na 405 nm u vremenu na eliza čitaču. Kako je u ovom radu napred navedeno, jedna jedinica (1 U) glukoza-oksidadze predstavlja onu količinu enzima koja za 1 minut proizvede 1 μ mol vodonik-peroksida. Nastala količina peroksida se određuje preko koncentracije oksidovanog ABTS-a čiji ekstincioni koeficijent iznosi 36,8 mL μ mol⁻¹cm⁻¹ na 405 nm.

Aktivnost peroksidaze iz rena je merenja korišćenjem pirogalola kao supstrata. Reakciona smeša za merenje aktivnosti je sadržala 0,1(w/v) H₂O₂ i 0,2 (w/v) pirogalol u 100 mM natrijum acetatnom puferu pH 5,5. Aktivnost je merena praćenjem promene apsorbance na 405 nm koristeći ekstincioni koeficijent 12 mM⁻¹cm⁻¹ za oksidovani pirogalol. Jedna jedinica (1U) enzima je definisana kao količina enzima koja oksiduje 1 mg pirogalola tokom 20 s. Aktivnost enzima je po istom protokolu izmerena i u 100 mM kalijum fosfatnom puferu pH 6.

Osim pirogalola za merenje aktivnosti peroksidaze iz rena je korišćen i ABTS kao supstrat. Najpre je ispipetirano u bunar mikrotitar ploče 90 μ L 50 mM natrijum acetatnoh pufera pH 4,5, a potom dodato 10 μ L uzorka. neposredno pre merenja je odata smeša za merenje aktivnosti koja j esadržala 2 mM ABTS, 1,8 mM H₂O₂ u 50 mM natrijum acetatnom puferu pH 4,5. Dalje je aktivnost određena praćenjem promene apsorbance na 405 nm tokom vremena.

4.9.2. Određivanje kinetičkih parametara enzima

Karakterizacija mutanata je podrazumevala i određivanje kinetičkih parametara, koji su određeni u finalno prečišćenim frakcijama oba enzima, tako što je merena početna brzina reakcije ne gore opisani način (poglavlje 4.9.1) za koncentracije glukoze u rasponu 5 do 500 mM za glukoza-oksidadzu, odnosno 0,5 mM do 4 mM ABTS za peroksidazu iz rena. Dobijeni podaci nakon merenja su fitovani u Mihaelis-Menteneovu hiperbolu.

4.9.3. Određivanje temperaturne stabilnosti enzima

Temperaturna stabilnost rastvornih enzima je određena inkubiranjem rastvora enzima u termobloku tokom jednog sata na 60 °C za peroksidazu iz rena odnosno na 65 °C za glukoza-oksidadzu. Nakon inkubiranja na povišenim temperaturama uzorci su inkubirani na ledu tokom 10 minuta, a zatim im je rezidualna aktivnost određena merenjem specifične aktivnosti na sobnoj temperature. Rezidualna aktivnost oba enzima se definiše kao količnik specifične aktivnosti odgovarajućeg enzima nakon inkubiranja na povišenoj temperaturi i specifične aktivnosti neinkubiranog enzima.

4.9.4. Određivanje pH optimuma enzima

pH optimum oba enzima je određen merenjem promene apsorbance u različitim puferima čiji je pH bio u opsegu od 2 do 9, na po pola pH jedinice, pri čemu je kao supstrat korišćen ABTS za oba enzima. Za ove eksperimente su korišćeni različiti puferi, što je prikazano u Tabeli ispod.

Tabela 5. Puferi za određivanje pH optimuma

Opseg pH	Pufer
2-3,5	0,1 M citratni
4-5,5	0,1 M natrijum acetatni
6-7,5	0,1 M PIPES
8-9	0,1 M natrijum dihidrogen fosfatni

4.9.5. Određivanje supstratne specifičnosti glukoza-oksidade

Određivanje supstratne specifičnosti glukoza-oksidade je podrazumevalo merenje specifične aktivnosti glukoza-oksidade koristeći galaktozu i maltozu kao supstrate, pri čemu su finalne koncentracije supstrata bile 5 i 250 mM. Merenja su rađena u PBS puferu pH 7,4 kao i u 100 mM natrijum acetatnom puferu pH 5,5.

4.10. Karakterizacija biokompozita

4.10.1. Određivanje specifične aktivnosti biokompozita

Pre određivanja specifične aktivnosti biokompozit je nakon ispiranja resuspendovan u odgovarajućoj zapremini destilovane vode. Nakon toga je specifična aktivnost određena praćenjem promene apsorbance, na već opisan način.

4.10.2. Stabilnost biokompozita u organskom rastvaraču

U cilju određivanja stabilnosti biokompozita u organskom rastvaraču HRP@ZIF-8 biokompoziti su inkubirani u 50% (w/v) dioksanu tokom 1 sata. Nakon inkubiranja biokompoziti su isprani dva puta 0,1M natrijum acetatnim puferom pH 5,5, a nakon toga im je izmerena specifična aktivnost. Rezidualna aktivnost je u ovom slučaju definisana kao količnik specifične aktivnosti biokompozita inkubiranog u 50% dioksanu i neinkubiranog biokompozita.

4.10.3. Temperaturna stabilnost biokompozita

Temperaturna stabilnost biokompozita je određena inkubiranjem enzim@ZIF8 ili GOx@ZIF8 biokompozita na termobloku tokom 1 sata, na 65 °C u slučaju glukoza-oksidade odnosno na 60 °C u slučaju peroksidaze iz rena. Rezidualna aktivnost je u ovom slučaju definisana kao količnik specifične aktivnosti biokompozita inkubiranih na određenoj temperaturi i specifične aktivnosti biokompozita na sobnoj temperaturi.

4.10.4. Višekratno korišćenje biokompozita (ciklusi)

Reakcija je izvođena u 1,5 mL 0,1 M natrijum-acetatnog pufera pH 5,5 koji je sadržao 1 mM cink-hlorida i 0,25 M glukoze, na temperaturi od 25 °C tokom 30 min. Nakon toga, 1 µL reakcione smeše dodat je u 300 µL istog pufera koji je sadržao 1 mM ABTS i 1 IU/mL HRP. Uzorak je inkubiran 15 min, nakon čega je izmerena apsorbanca na 405 nm radi određivanja količine formiranog vodonik-peroksida.

4.10.5. Određivanje aktivnosti hibridnih HRP@ZIF-8@ALG biokompozita

Aktivnost hidrogelnih biokompozita određivana je spektrofotometrijski korišćenjem ABTS kao supstrata. Mikro-kuglice su inkubirane u 3 mL reakcione smeše koja je sadržala 0,12 mM ABTS u 0,1 M natrijum-acetatnom puferu pH 5,5 i 2 mM H₂O₂. Promena apsorbanca praćena je na 420 nm tokom 40 min.

Aktivnost biokompozita izražena je kao specifična aktivnost po masi imobilizata, kao i preko ukupnog broja vezanih enzimskih jedinica. Prinos imobilizacije računat je na osnovu odnosa aktivnosti imobilizovanog i početno dodatog enzima.

4.10.6. Određivanje pH optimuma hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG

Ispitivanje uticaja pH vrednosti na katalitičku aktivnost hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG izvedeno je u diskontinuiranom sistemu na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša (ukupne zapremine 3,3 mL) formirana je u vijalici dodavanjem jedne kuglice biokompozita (mase u opsegu 4,0–5,8 mg) u 3 mL rastvora ABTS supstrata (krajnje koncentracije 0,12 mM) u odgovarajućem puferu (0,1 M, pH 3,5–9,0). Reakcija je inicirana dodavanjem 30 µL rastvora vodonik-peroksida (krajnje koncentracije 2 mM). Za održavanje pH vrednosti korišćeni su natrijum-acetatni (pH 3,5–5,5), HEPES (pH 6,0–8,0). Tokom 20 minuta reakcije, u definisanim intervalima uziman je alikvot od 300 µL i prenošen u mikrotitar ploču, gde je merena apsorbanca na 420 nm pomoću čitača mikrotitar ploča. Prilikom proračuna specifične aktivnosti uzete su u obzir pojedinačne mase kuglica.

4.10.7. Određivanje stabilnosti hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG u dioksanu

Ispitivanje stabilnosti hibridnog biokompozita u organskom rastvaraču izvedeno je inkubacijom oko 5 mg imobilizata u 2 mL 80%-tnog dioksana tokom definisanih vremenskih intervala (0, 2, 24 i 48 sati). Nakon isteka vremena inkubacije, dioksan je odliven iz reakcionih bočica. Preostala katalitička aktivnost HRP@ZIF-8@ALG određena je u vodenoj sredini pod identičnim eksperimentalnim uslovima kao kod testa temperaturene stabilnosti (3 mL 0,12 mM ABTS u acetatnom puferu pH 5,5 uz dodatak 30 µL 2 mM H₂O₂), uzorkovanjem alikvota od 300 µL u minutnim intervalima.

4.10.8. Dekolorizacija boje *Evans Blue* i *Methyl Orange* pomoću HRP@ZIF-8@ALG

Efikasnost hibridnog biokompozita u procesima prečišćavanja otpadnih voda ispitana je kroz dekolozaciju azo boja *Evans Blue* i *Methyl Orange*. Reakciona smesa formirana je u ependorfici dodavanjem 5 kuglica imobilizata (prosečne mase oko 26 mg) u 900 µL rastvora boje (krajnje koncentracije 25 mM, sa početnom apsorbancom oko 1 na 620 i 497 nm) i 100 µL vodonik-peroksida (krajnje koncentracije 20 mM). Proces degradacije praćen je tokom 24 časa na tamnom na šejkeru. U

definisanim vremenskim tačkama, alikvoti od 300 ul privremeno su prebacivani u mikrotitar ploču radi merenja opadanja apsorbancije na 620 i 487 nm, nakon čega su vraćani u reakcionu smesu. Procenat dekolorizacije izračunat je na osnovu relativnog smanjenja početne apsorbancije rastvora boje u funkciji vremena.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

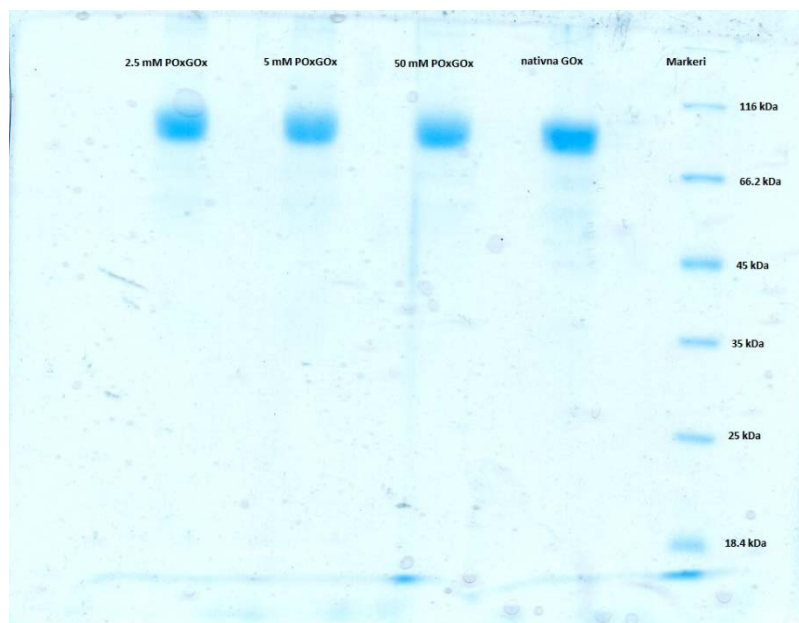
5.1. Imobilizacija perjodatno oksidovane GOx u ZIF-8

U prvom delu istraživanja smo ispitivali uticaj perjodatne oksidacije ugljenohidratne komponente GOx na proces biomineralizacije, kao i na aktivnost i stabilnost dobijenog biokompozita. U tu svrhu je GOx perjodatno oksidovana, biomineralizovana na dva načina i dobijeni biokompoziti su strukturno i kinetički okarakterisani.

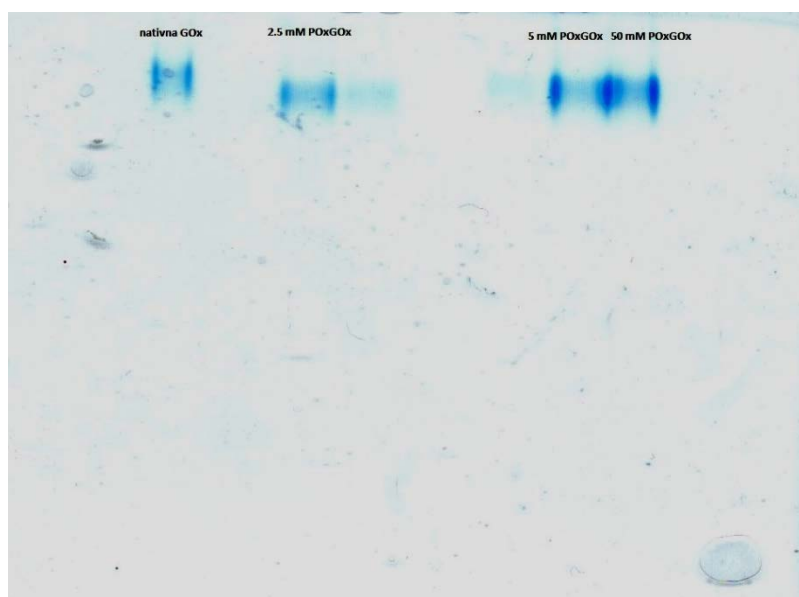
5.1.1. Perjodatna oksidacija glukoza-oksidade

U cilju povećanja elektrostatičke interakcije između proteina i nosača koji je korišćen za imobilizaciju najčešće se koriste metode hemijske modifikacije amino kiselina. Ranije je već u literaturi pokazano da metodama hemijske modifikacije mogu da se izmene karakteristike enzima, u cilju povećanja specifične aktivnosti ili poboljšanja operativnih performansi enzima. Naime, kada je slabo aktivna lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* (TLL) modifikovana glutaraldehydom primećen je porast aktivnosti od oko 5%. Međutim, drugačiji rezultati su dobijeni kada je isti biokatalizator modifikovan glutaraldehydom u većem procentu što je rezultiralo gubitkom od oko četvrtine početne aktivnosti. [124] Navedeni primer pokazuju da se hemijskom modifikacijom može uticati na strukturu, aktivnost kao i na interakcije između enzima i nosača. Budući da većina industrijski važnih enzima pripada grupi glikoproteina, metoda modifikacije enzima preko njegove ugljenohidratne komponente može biti dobro rešenje za poboljšanje karakteristika enzima uz minimalno smanjenje aktivnosti usled hemijske modifikacije aktivnog mesta enzima.

Za hemijsku modifikaciju glukoza-oksidade je odabrana perjodatna oksidacija ugljenohidratnih komponenti jer je već ranije utvrđeno da ova metoda ne dovodi do narušavanja terciarne i kvaternarne strukture, kao i da nema uticaja na katalitičke parametre. [125, 126] Perjodatna oksidacija je rađena natrijum metaperjodatom i to u tri različite koncentracije: 2,5, 5 i 50 mM. Uticaj perjodatne oksidacije na masu i naelektrisanje je praćen SDS i nativnom elektroforezom, kao i merenjem zeta potencijala.



Slika 14. SDS elektroforeza nativne i 2,5, 5 i 50 mM perjodatno oksidovane glukoza-oksidade



Slika 15. Nativna elektroforeza nativne i 2,5, 5 i 50 mM perjodatno oksidovane glukoza-oksidade

Rezultati SDS-PAGE elektroforeze (Slika 14) su pokazali da nije došlo do promene u molekularnoj masi proteina, što ukazuje na činjenicu da perjodatna oksidacija ne izaziva deglikozilaciju enzima. Međutim, rezultati nativne elektroforeze (Slika 15) su pokazali da su oksidovani oblici glukoza-oksidade negativnije naelektrisani u poređenju sa nativnim uzorkom. Osim toga, rezultati merenja zeta potencijala se takođe slažu sa rezultatima dobijenim nakon nativne elektroforeze, čime je potvrđeno da su oksidovani oblici enzima negativnije naelektrisani u poređenju sa nativnim.

Tabela 6. Eksperimentalno dobijeni podaci zeta potencijala za ispitivane uzorke

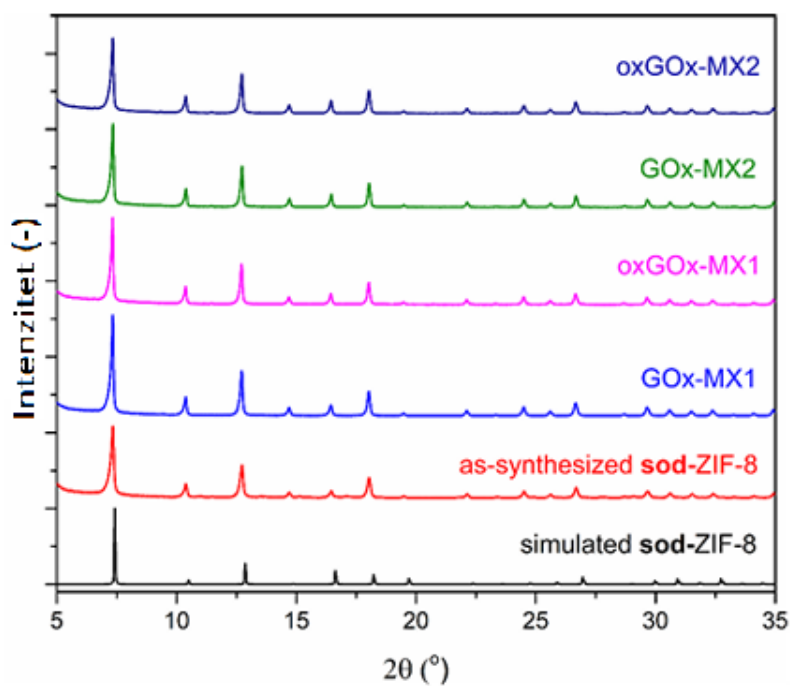
Uzorak	Zeta potencijal (mV)
GOx	-10,2 ± 4,6
2,5 mM oxGOx	-36,9 ± 5,6
5 mM oxGOx	-32,7 ± 4,4
50 mM oxGOx	-29,5 ± 5,2
GOx u rastvoru Zn (II)	1,95 ± 3,8
GOx u rastvoru 2-metilimidazola	-13,1 ± 3,6
2,5 mM oxGOx u rastvoru Zn (II)	-1,93 ± 4,2
2,5 mM oxGOx u rastvoru 2-metilimidazola	-23,6 ± 4,9

Uzimajući u obzir sve napred navedene rezultate 2,5 mM oxGOx je pokazala najveće pomerenje negativnog naelektrisanja (od -10,2 do -36,9 mV) zbog čega je dalje korišćena za biomineralizaciju.

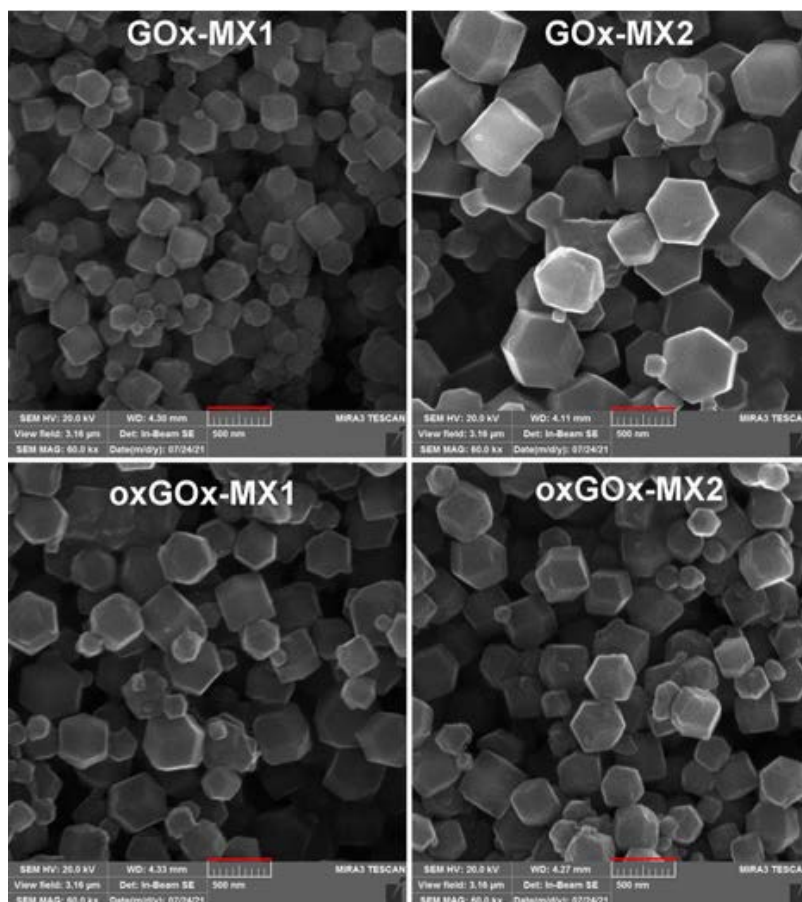
5.1.2. Biomineralizacija komercijalne nativne i perjodatno oksidovane glukoza-oksidade u ZIF-8

Kako bi se ispitali optimalni uslovi za biomineralizaciju komercijalne nativne i perjodatno oksidovane glukoza-oksidade reakcija je izvedena na dva načina. Prvi način biomineralizacije je podrazumevao mešanje rastvora koji u sebi sadrži enzim i 2-metilimidazol, tokom 1 minuta, nakon čega je rastvoru dodat rastvor cink acetata i reakciona smeša je potom mešana tokom 30 min (MX1). Drugi način biomineralizacije je podrazumevao mešanje rastvora proteina i cink acetata tokom 1 minuta, nakon čega je dodat rastvor 2-metilimidazola pa je reakciona smeša dodatno mešana tokom 30 minuta (MX2). U literaturi je već ranije pokazano da odgovarajući izbor metalnih jona kao i organskih liganada može predominantno uticati na sintezu odgovarajuće topologije ZIF-8. Dodatno, uslovi sinteze odgovarajućih ZIF-ova takođe imaju uticaja na topologiju dobijenog ZIF-a. [127] U oba seta eksperimenata je korišćen sveže pripremljen rastvor enzima, kako bi se izbegao eventualni problem agregiranja proteina tokom stajanja. Finalne koncentracije rastvora enzima, cink acetata i 2-metilimidazola su bile 0,35 mg/ml, 20 mM i 1 M, respektivno. Osim izbora metalnog jona i organskih liganada, veliki uticaj na sintezu biokompozita ima i redosled dodavanja rastvora. Naime, ranije je pokazano da interakcijom pozitivno naelektrisanog jona cinka i površinski negativno naelektrisanog proteina dolazi do formiranja nukleacionog centra kristalizacije, a zatim dodatkom organskog linkera nastaje stabilniji biokompozit te smo stoga koristili dva načina mešanja rastvora i redosleda dodavanja reaktanata. [109, 128, 129]

Rezultati PXRD analize i SEM fotografija su pokazali da se u svim slučajevima enzim@ZIF biokompozita dobija **sod** topologija (ZIF-8).



Slika 16. Simulirana PXRD analiza sod-ZIF-8 (crno) i eksperimentalno dobijena PXRD analiza sod-ZIF-8 (crveno), GOx-MX1 (plavo) oxGOx-MX1 (magenta), GOx-MX2 (zeleno) i oxGOx-MX2 (teget)



Slika 17. SEM slike biokompozita nakon ispiranja vodom (skala 500 nm)

5.1.3. Kinetički parametri imobilizacije nativne i oksidovane glukoza-oksidge u ZIF-8

Budući da je imobilizacija enzima u MOF-ove interdisciplinarno naučno polje, za razumevanje ovog oblika imobilizacije neophodno je povezati znanja nauke o materijalima, biohemije proteina i enzimologije.

Za opisivanje prinosa imobilizacije se koriste dva ključna faktora koji se odnose na procent vezane enzimske aktivnosti (Y_A) odnosno imobilizovane mase proteina (Y_P). Procent vezane enzimske aktivnosti (Y_A) predstavlja odnos ukupnog broja imobilizovanih enzimskih jedinica (na površini i unutar ZIF-8) i ukupnog broja enzimskih jedinica korišćenih za reakciju biomineralizacije. Slično tome, procent imobilizovane mase proteina (Y_P) predstavlja količnik ukupne mase imobilizovanog enzima i ukupne mase korišćenog proteina u reakciji biomineralizacije. Kapacitet vezivanja proteina (mg/g) predstavlja masu imobilizovanog enzima (mg) po 1 g nosača. Aktivnost imobilizovanog enzima po jedinici mase čvrstog biokompozita predstavlja specifičnu aktivnost biokompozita, dok se specifična aktivnost vezanog enzima definiše kao aktivnost imobilizovanog enzima po jednom mg imobilizovanog proteina. Faktor efikasnosti (η) se definiše kao odnos specifične aktivnosti vezanog enzima i specifične aktivnosti rastvornog enzima. [130]

Tabela 7. Ključni parametri imobilizacije za navedene biokompozite isprane samo destilovanom vodom

Parametar	GOx-MX1	oxGOx-MX1	GOx-MX2	oxGOx-MX2
Y_A	0,82	0,99	0,95	0,99
Y_P	0,52	0,56	0,40	0,63
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	41,25	24,14	37,47	36,56
Specifična aktivnost (U/g _{kompozita})	1591,25	855,84	815,02	873,51
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	39,18	25,61	33,51	28,83
Faktor efikasnosti (η) x 100 (%)	22	22	19	24

Tabela 8. Ključni parametri imobilizacije za navedene biokompozite isprane destilovanom vodom i 10% (w/v) SDS

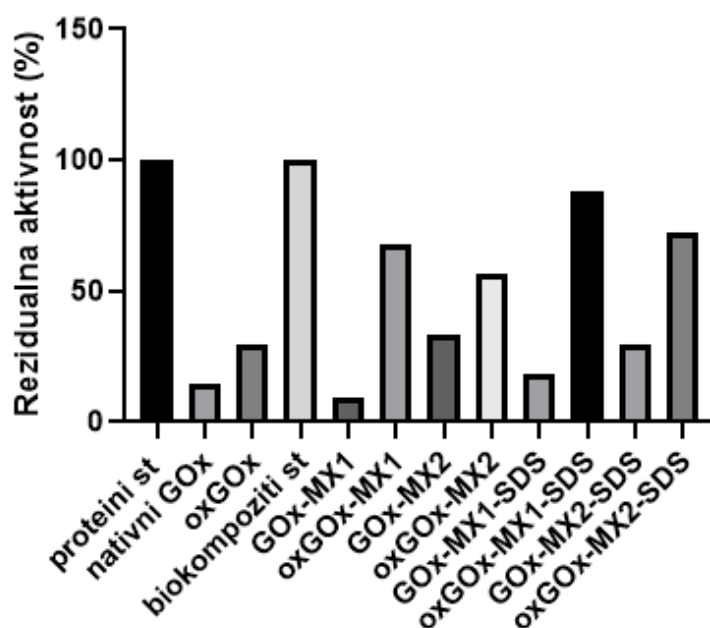
Parametar	GOx-MX1	oxGOx-MX1	GOx-MX2	oxGOx-MX2
Y_P	0,28	0,50	0,26	0,55
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	24,40	28,90	22,72	32,72
Specifična aktivnost (U/g _{kompozita})	52,55	534,55	15,88	338,90
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	2,32	20,46	2,45	22,59
Faktor efikasnosti (η) x 100 (%)	1,3	17	3	19

U Tabeli 7 su prikazani ključni parametri imobilizacije enzima tj. nativne i perijodno oksidovane glukoza-oksidge u ZIF-8, nakon ispiranja destilovanom vodom, dok su u Tabeli 8 prikazane i vrednosti izračunatih parametara za kompozite nakon ispiranja vodom i 10% (w/v) SDS.

Iz prikazanih rezultata se može uočiti da su ključni kinetički parametri kod svih ispitivanih biokompozita ispranih vodom veoma slični. Međutim, očigledne razlike su primećene tek nakon inkubiranja uzoraka u 10% (w/v) SDS i to naročito u odnosu native i perjodatno oksidovane glukoza-oksidade. Rezultati ukazuju na značaj pada imobilizovane mase proteina kod uzoraka sa nativnom glukoza-oksidadom u odnosu na perjodatno oksidovanu, nakon inkubiranja biokompozita u 10% (w/v) SDS rastvoru, što se može objasniti uklanjanjem površinskih adsorbovanog proteina. Sličan trend je primećen i kod parametra koji se odnosi na kapacitet vezivanja proteina. Što se tiče specifične aktivnosti biokompozita, jednog od najvažnijih parametara, bolji rezultati se dobijaju u slučaju perjodatno oksidovane glukoza-oksidade. Takođe, bitno je pomenuti da su vrednosti specifične aktivnosti vezanog enzima i kao i faktora efikasnosti značajno više za biokompozite sa imobilizovanom perjodatno oksidovanom glukoza-oksidadom. Činjenica je da je prema prethodno prikazanim podacima, bez obzira na način mešanja, procenat vezanog proteina na površini u slučaju imobilizovane native glukoza-oksidade oko 50%, dok je kod perjodatno oksidovane glukoza-oksidade taj procenat značajno manji i iznosi oko 15%. Ovaj rezultat je od posebnog značaja, budući da površinski adsorbovani proteini obično doprinose smanjenoj stabilnosti biokompozita.

5.1.4. Termostabilnost kompozita GOx@ZIF-8 i oxGOx@ZIF-8

Termostabilnost rastvornih i imobilizovanih enzima je određena inkubiranjem uzoraka u termobloku na 65 °C tokom 1 sata. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 18, pri čemu je rezidualna aktivnost izražena kao odnos specifične aktivnosti uzoraka nakon inkubiranja uzoraka i specifične aktivnosti neinkubiranih uzoraka.

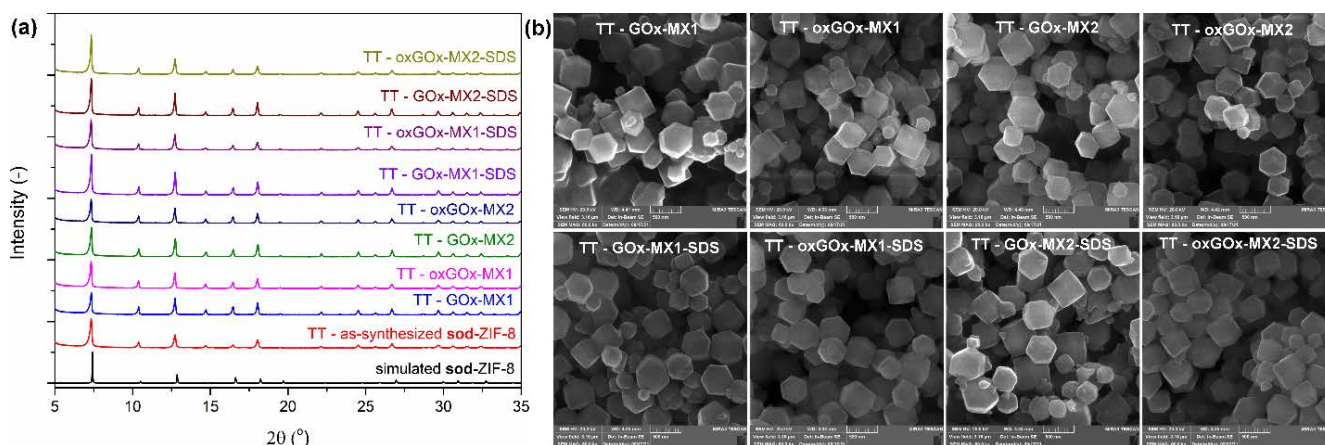


Slika 18. Termostabilnost neimobilizovanih enzima i biokompozita ispranih vodom i biokompozita inkubiranih u 10% (w/v) SDS

Očigledno je da nativna glukoza-oksida i perjodatno oksidovana glukoza-oksida zadržavaju najviše 30% svoje početne aktivnosti. Dalje, prikazani rezultati pokazuju da biokompoziti isprani SDS-om pokazuju veću termičku stabilnost u slučaju imobilizovane oksidovane glukoza-oksidade. Povećana termostabilnost oxGOx@ZIF-8 biokompozita se može pripisati promenama u površinskom

naelektrisanju enzima usled perjodatne oksidacije što omogućava jače interakcije sa Zn^{2+} jonima i time omogućiti efikasniju imobilizaciju, formiranjem stabilnijeg centra nukleacije. Zbog toga je enzim bolje enkapsuliran unutar ZIF-8, čime je smanjen uticaj temperature na aktivni centar enzima usled ograničenih konformacionih promena koje dovode do denaturacije. Osim toga, smanjen je i udeo površinskih adsorbovanog enzima, što dodatno doprinosi većoj stabilnosti nastalih biokompozita.

Bitno je napomenuti da inkubiranje biokompozita na povišenoj temperaturi nije doprinelo narušavanju strukture biokompozita, što je prikazano na Slici 19 (a-PXRD difraktogram i b-SEM fotografije biokompozita inkubiranih na 65 °C tokom 1 sata).



Slika 19. PXRD difraktogrami (a) i SEM fotografije (b) biokompozita ispranih SDS, nakon inkubiranja (1h, 65 °C) (TT-temperaturno tretirani)

Rezultati iz ovog dela istraživanja su pokazali da perjodatna oksidacija glukoza-oksidadze povećava negativno površinsko naelektrisanje enzima bez narušavanja njegove strukture, čime se poboljšava biomineralizacija u ZIF-8. Biokompoziti sa oksidovanom glukoza-oksidadzom pokazali su veću efikasnost imobilizacije, manji udeo površinski adsorbovanog enzima i veću specifičnu aktivnost nakon SDS tretmana u odnosu na biokompozite sa nativnim enzimom. Takođe, oxGOx@ZIF-8 biokompoziti imali su značajno veću termostabilnost uz očuvanu kristalnu strukturu ZIF-8 nakon inkubacije na povišenoj temperaturi. Dobijeni rezultati potvrđuju da perjodatna oksidacija ugljenohidratne komponente glikoproteina predstavlja efikasnu strategiju za dobijanje stabilnijih i funkcionalno efikasnijih enzim@ZIF biokompozita.

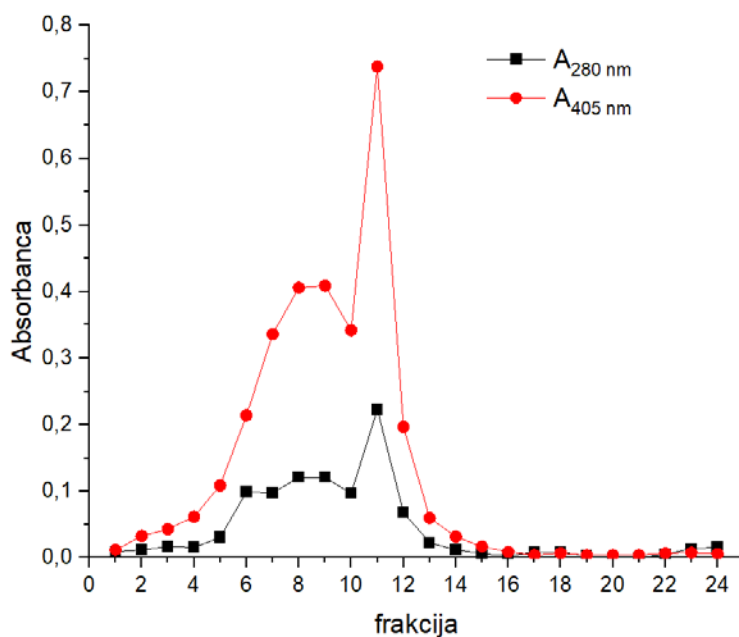
5.2. Imobilizacija HRP-C izoforme u ZIF-8

U drugom delu istraživanja smo hteli da proverimo da li perjodatna oksidacija i peroksidaze iz rena takođe poboljšava proces biomineralizacije kao i kod GOx. U tu svrhu je komercijalni preparat HRP dodatno prečišćen, perjodatno oksidovan, biomineralizovan i strukturno i kinetički okarakterisan.

5.2.1. Prečišćavanje i perjodatna oksidacija peroksidaze iz rena

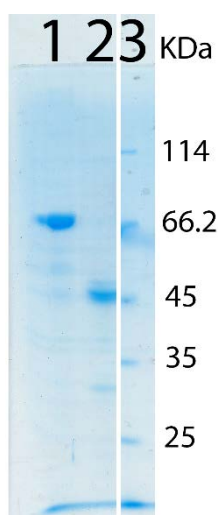
Kako bi se eliminisao uticaj vrste izoforme enzima koje imaju različite pI vrednosti na reakciju biomineralizacije, u ovom slučaju peroksidaze iz rena, smeša različitih izoformi HRP je prečišćena

jonoizmenjivačkom hromatografijom, koristeći karboksimetil celulozu (CMC) kao matriks. [131] Specifična izoforma HRP-C je eluirana povećanjem koncentracije natrijum acetatnog pufera različitih pH vrednosti (Slika 20).



Slika 20. Hromatogram nakon prečišćavanja smeše HRP izoformi na CMC hromatografskoj koloni

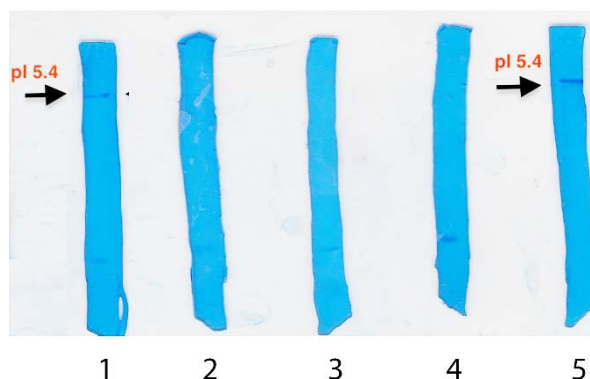
Nakon prečišćavanja, frakcije enzima sa najvećom enzimskom aktivnošću su skupljene i čistoća dobijenih frakcija je proverena SDS-PAGE elektroforezom (Slika 21).



Slika 21. SDS PAGE elektroforeza: 1-komercijalni HRP pre prečišćavanja; 2- HRP-C izoforma; 3- proteinski markeri

Kako se vidi sa Slike 21 poređem uzorka HRP pre prečišćavanja sa izolovanom pojedinačnom izoformom, HRP-C, jasno se uočava traka na ~45 kDa, koja potiče od HRP-C izoforme. Osim toga,

važno je primetiti i izostanak trake na oko ~70 kDa, za šta se pretpostavlja da su nečistoće prisutne u komercijalnom preparatu. Osim toga, uspešnost prečišćavanja HRP-C izoforme je potvrđena i određivanjem vrednosti izoelektrične tačke od 5,4 izoelektričnim fokusiranjem (Slika 22).



Slika 22. Izoelektrično fokusiranje i pI vrednost izoformi HRP: 1-komercijalna HRP pre prečišćavanja; 2-4- osnovne izoforme; 5-HRP-C izoforma

Budući da je i peroksidaza glikoprotein kao i GOx koji sadrži oko 20% (w/w) ugljenih hidrata na svojoj površini, ovakva struktura je takođe pogodna za različite hemijske modifikacije enzima. [132] Poznato je od ranije da perjodatna oksidacija šećernih ostataka na površini enzima ima za rezultat formiranje reaktivnih aldehydskih grupa, koje se mogu dalje koristiti u različitim hemijskim reakcijama. [133] Međutim, u ovim eksperimentima perjodatna oksidacija je primenjena sa ciljem povećanja negativnog naelektrisanja na površini enzima, čime bi se ostvarila bolja interakcija sa Zn^{2+} jonima, a time i formirali bolji biokompoziti. Perjodatna oksidacija je rađena korišćenjem $NaIO_4$ kao reagensa i to u opsegu koncentracija od 2,5 do 50 mM. Promena u naelektrisanja je potvrđena nativnom elektroforezom (Slika 23).



Slika 23. Nativna elektroforeza gde je kao susprtat korišćen 5% pirogalol 1-komercijalni HRP; 2- 2,5 mM oxHRP; 3- 5,0 mM oxHRP; 4- 50,0 mM oxHRP

Sa native elektroforeze se jasno vidi da su oksidovani oblici enzima negativnije naelektrisani u poređenju sa nativnim HRP-om. Promena naelektrisanja je potvrđena i merenjem zeta potencijala (Tabela 9).

Tabela 9. Eksperimentalno dobijeni podaci za zeta potencijal, pri uslovima: 0,35 mg/ml enzima u destilovanoj vodi, 0,02 M Zn (II) rastvor i 1 M 2-metilimidazol rastvor

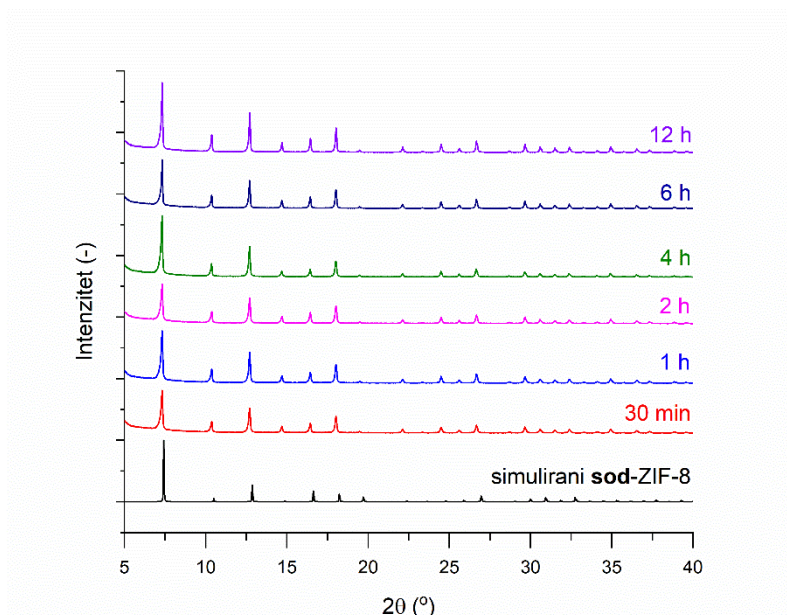
Uzorak	Zeta potencijal (mV)
HRP	-26,7±2,6
HRP u rastvoru Zn (II)	+2,82±0,75
HRP u rastvoru 2-metilimidazola	-28,1±3,6
oxHRP (2,5 mM NaIO ₄)	-46,7±4,6
oxHRP (5,0 mM NaIO ₄)	-40,2±5,9
oxHRP (50,0 mM NaIO ₄)	-34,4±3,8
oxHRP u Zn (II) rastvoru	+2,72±0,84
oxHRP u rastvoru 2-metilimidazola	-24,4±3,2
HRP-C	-27,3±3,4
HRP-C u rastvoru Zn (II)	-2,84±1,15
HRP-C u rastvoru 2-metilimidazola	-29,1±2,6
ox-HRP-C	-47,5±5,2
oxHRP-C u rastvoru Zn (II)	+2,84±1,24
oxHRP-C u rastvoru 2-metilimidazola	-23,8±2,7

Na osnovu podataka zeta potencijala prikazanih u Tabeli 9, 2,5 mM koncentracija NaIO_4 je odabrana kao najpogodnija za oksidaciju HRP i HRP-C izoforme. Ova koncentracija perjodata je izabrana kao najpogodnija za oksidaciju, budući da je pri ovoj koncentraciji postignuta najizraženija negativna vrednost površinskog naelektrisanja oksidovanih enzima. Dodatak 2-metilimidazola u rastvore neoksidovanih enzima doveo je do blagog smanjenja zeta potencijala, dok je kod oksidovanih formi zabeležen porast zeta potencijala za oko 50%, što ukazuje na povećanje pozitivnog naelektrisanja površine proteina.

Oslanjajući se na prethodno navedene rezultate, dalji eksperimenti biomimetičke biomineralizacije su rađeni sa 2,5 mM perjodatno oksidovanim oblicima enzima.

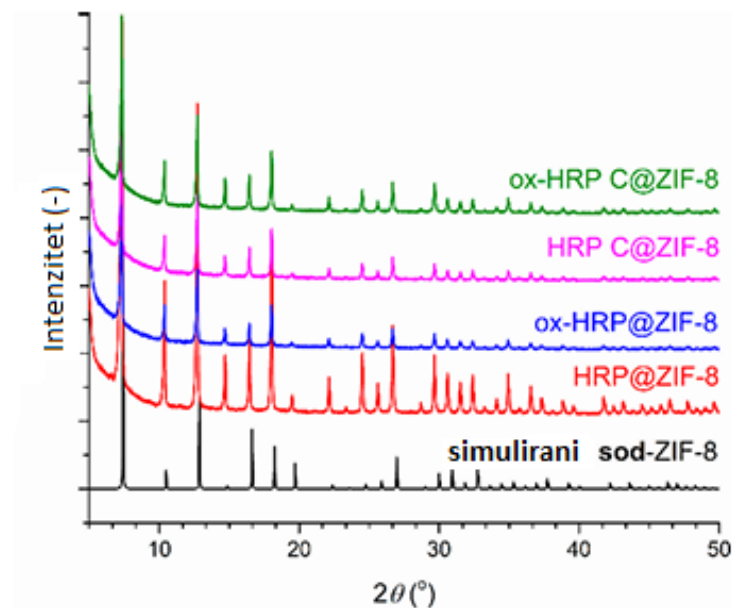
5.2.2. Biomineralizacija native i perjodatno oksidovane peroksidaze iz rena

Kako bi se utvrdili optimalni uslovi biomineralizacije, ispitivana su različita reakciona vremena biomineralizacije, i to: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h i 12 h, a nakon toga je talog ostavljen da „sazri“ tokom 1 sata. Dalje, finalne koncentracije enzima, Zn (II) rastvora i rastvora 2-metilimidazola su bile 0,5 mg/ml, 0,02 M i 1M, respektivno. Ovakvi odnosi cinka i 2-metilimidazola preferencijalno favorizuju nastanak *sod*-topologije. [134] Dobijeni biokompoziti su isprani destilovanom vodom, osušeni na vazduhu a nakon toga analizirani pomoću PXRD (Slika 24).

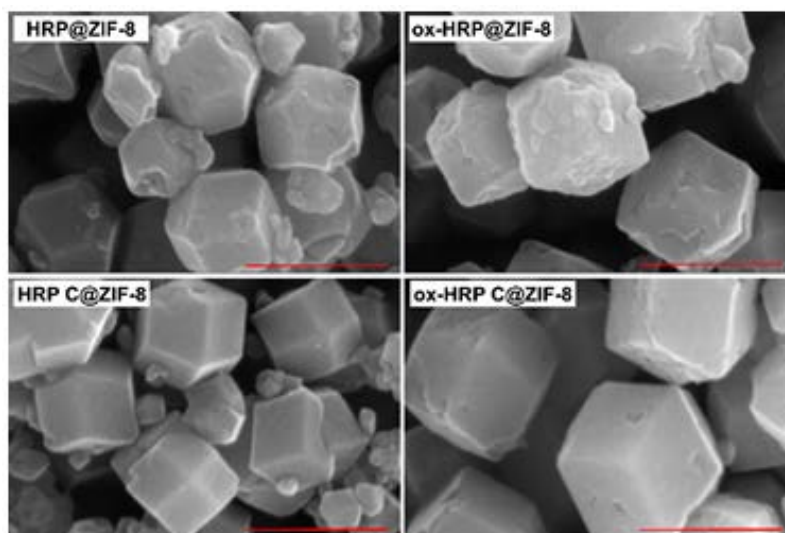


Slika 24. PXRD difraktogrami za različita reakciona vremena biomineralizacije HRP@ZIF-8

Kako su analize PXRD difraktograma pokazale karakteristične pikove *sod*-topologije za sva vremena inkubacije za dalje reakcije biomineralizacije je reakciono vreme bilo 30 min. Za sve varijante HRP biokompozita nakon 30 minuta biomineralizacije su dobijene *sod*-topologije što je pokazano PXRD difraktogramima (Slika 25).



Slika 25. PXRD difraktogrami različitih enzim@ZIF-8 biokompozita nakon 30 min biomineralizacije



Slika 26. SEM fotografije različitih enzim@ZIF-8 biokompozita nakon 30 min biomineralizacije (veličina skale 500 nm)

Na osnovu SEM analize uzoraka (Slika 26) određena je veličina čestica: 392 ± 37 nm (HRP@ZIF-8), 399 ± 41 nm (HRP-C@ZIF-8), 546 ± 54 nm (ox-HRP@ZIF-8) i 543 ± 71 nm (ox-HRP-C@ZIF-8).

Primećen porast u veličini čestica za različite biokompozite može se objasniti promenama u površinskom naelektrisanju enzima, a time i boljim interakcijama sa Zn^{2+} jonima, što ima za posledicu intenzivnije formiranje pre nukleacionih klastera, a time dovesti do ubrzanog rasta kristala i formiranje većih čestica.

5.2.3. Kinetički parametri imobilizacije native i oksidovane peroksidaze iz rena u ZIF-8

Kako bi se ispitali optimalni uslovi u odnosu na vrstu pufera u kom se meri aktivnost neimobilizovane i imobilizavne peroksidaze u ZIF-8, merena je aktivnost rastvornog enzima u dva pufera, i to: kalijum fosfatnom puferu pH 6,0 i natrijum acetatnom puferu pH 5,5. Dobijeni vrednosti specifične aktivnosti različitih uzoraka enzima su prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Specifične aktivnosti (U/mg) različitih uzoraka HRP-a u fosfatnom i acetatnom puferu

Uzorak	Specifična aktivnost (U/mg), kalijum fosfatni pufer pH 6,0	Specifična aktivnost (U/mg), natrijum acetatni pufer pH 5,5
HRP	18,83 ± 0,80	13,75 ± 0,58
2,5 mM oxHRP	2,89 ± 0,21	2,17 ± 0,17
HRP-C	81,80 ± 4,42	64,42 ± 3,30
2,5 mM oxHRP-C	49,52 ± 3,10	41,25 ± 2,60

Dobijeni podaci za specifičnu aktivnost pokazuju porast od 13,75 U/mg za neprečišćen HRP do 64,42 U/mg za prečišćenu izoformu, HRP-C, mereno u acetatnom puferu. Kako bi se sprečila moguća degradacija ZIF-8 biokompozita u fosfatnom puferu, sva dalja merenja specifičnih aktivnosti su rađena u acetatnom puferu (Tabela 11 i 12).

Tabela 11. Ključni parametri imobilizacije za navedene biokompozite isprane samo destilovanom vodom

Parametar	HRP@ZIF-8	oxHRP@ZIF-8	HRP-C@ZIF-8	oxHRP-C@ZIF-8
Y_A	<0,01	0,76±0,05	0,09±0,05	0,97±0,01
Y_P	0,49±0,05	0,77±0,06	0,23±0,01	0,97±0,02
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	57,52±3,37	90,39±6,01	27,01±9,51	76,10±5,59
Specifična aktivnost (U/g _{kompozita})	0,61±0,06	125,37±3,06	3,48±2,55	49,92±13,95
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	<0,01	1,39±0,08	0,12±0,04	0,66±0,21
Faktor efikasnosti (η) x 100 (%)	<0,07	64,06±4,05	0,19±0,05	1,60±0,52

Tabela 12. Ključni parametri imobilizacije za navedene biokompozite isprane destilovanom vodom i 1 M NaCl

Parametar	HRP@ZIF-8	oxHRP@ZIF-8	HRP-C@ZIF-8	oxHRP-C@ZIF-8
Y_A	<0,01	0,75±0,05	0,09±0,04	0,97±0,01
Y_P	0,27±0,07	0,71±0,01	0,11±0,08	0,54±0,21
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	38,01±7,70	83,11±1,49	10,61±6,63	43,28±18,19
Specifična aktivnost (U/g _{kompozita})	0,40±0,05	62,80±5,82	2,20±0,33	47,16±15,41
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	<0,01	0,76±0,04	0,26±0,16	1,4±1,21
Faktor efikasnosti (η) x 100 (%)	<0,07	35,02±3,15	0,40±0,07	3,47±0,32

Za karakterizaciju dobijenih biokompozita korišćeni su već ranije pomenuti ključni parametri imobilizacije: procenat vezane enzimske aktivnosti (Y_A) odnosno procenat vezane mase proteina (Y_P), kapacitet vezivanja proteina, specifična aktivnost biokompozita, specifična aktivnost vezanog enzima i faktor efikasnosti (η). Parametri su određeni za uzorke isprane vodom, kao i za uzorke koji su dodatno isprani 1 M NaCl, kako bi se smanjio procenat površinski apsorbovanog enzima.

Iz prikazanih rezultata se može zaključiti da HRP@ZIF-8 biokompoziti imaju niži specifičnu aktivnost, kao i procenat vezane enzimske aktivnosti, iako je velika vrednost dobijena za parametar koji se odnosi na kapacitet vezivanja proteina. Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da je preparat enzima koji je korišćen za imobilizaciju nedovoljno čist tj. sadrži više različitih izoformi odgovarajućeg proteina.

Međutim, ukoliko se posmatraju podaci dobijeni za bimineralizaciju HRP-C izoforme u ZIF-8 može se primetiti povećana specifična aktivnost biokompozita 3,5 U/g u odnosu na 0,6 U/g, kao i povećan faktor efikasnosti u poređenju sa neprečišćenom HRP@ZIF-8 biokompozitom.

Međutim, najviše vrednosti specifične aktivnosti biokompozita i vezanog enzima se dobijaju u slučaju perjodatno oksidovanih preparata enzima, što je očekivano budući da perjodatna oksidacija ugljenohidratne površine enzima ima za rezultat povećanje negativnog naelektrisanja na površini enzima, što dalje vodi boljim interakcijama sa Zn^{2+} jonima i formiranje stabilnijih biokompozita.

Da bi se ispitao procenat enzima absorbovanog na površini, nakon ispiranja biokompozita destilovanom vodom, biokompoziti su inkubirani u rastvoru 1 M NaCl, a nakon toga isprani vodom. I u ovom slučaju podaci potvrđuju da je bolja enkapsulacija postignuta u slučaju perjodatno oksidovanih enzima budući da su biokompoziti u ovom slučaju zadržali veći procenat prvobitne specifične aktivnosti. Takođe, specifična aktivnost vezanog enzima je veća u slučaju perjodatno oksidovanih enzima i to najviše za biokompozit gde je enkapsulirana perjodatno oksidovana HRP-C izoforma enzima.

5.2.4. Termostabilnost kompozita HRP@ZIF-8 i oxHRP@ZIF-8

Za ispitivanje termostabilnosti dobijenih biokompozita svi uzorci su inkubirani na 60 °C tokom jednog sata. Dobijeni podaci su prikazani u Tabeli 13 i izraženi kao rezidualna aktivnost koja predstavlja odnos specifične aktivnosti ispitivanih uzoraka nakon inkubiranja i specifičnih aktivnosti uzoraka pre inkubiranja.

Tabela 13. Termalna stabilnost biokompozita ispranih vodom i ispranih vodom, nakon toga i 1 M NaCl

Parametar	HRP@ZIF-8	oxHRP@ZIF-8	HRP-C@ZIF-8	oxHRP-C@ZIF-8
Rezidualna aktivnost (%) uzoraka nakon ispiranja vodom	64,20±20,34	57,61±28,84	35,18±12,52	102,32±22,07
Rezidualna aktivnost (%) uzoraka nakon ispiranja vodom i 1 M NaCl	55,78±7,94	41,71±6,86	20,81±2,60	119,50±3,93

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da se nakon inkubiranja deo enzima deaktivira. Međutim, u slučaju oksidovane HRP-C izoforme, a potom imobilizovane u ZIF-8 primećeno je da ne dolazi do pada aktivnosti, što se može objasniti izuzetno dobrom enkapsulacijom enzima nakon perjodatno oksidacije, što je ranije već potvrđeno ispitivanjem kinetičkih parametara imobilizacije.

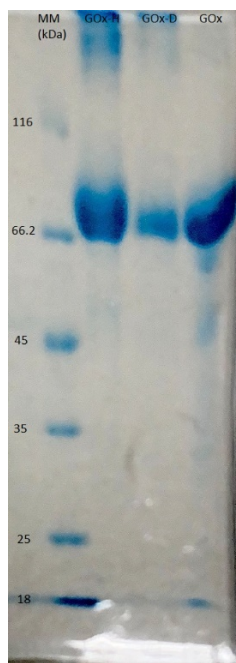
5.3. Imobilizacija L-histidinom i L-aspartatom modifikovane GOx u ZIF-8

U trećem delu istraživanja smo hteli da dodatno ispitamo uticaj naelektrisanja i vrste modifikacije površine glikoproteina na proces biomineralizacije, aktivnost i stabilnost dobijenog biokompozita. U tu svrhu smo GOx hemijski modifikovali L-aspartatom i L-histidinom preko ugljenohidratne komponente, okarakterisali modifikovani rastvorni enzim i ispitili uticaj vrste modifikacije na proces biomineralizacije, i na aktivnost i stabilnost dobijenih biokompozita.

5.3.1. Hemijska modifikacija glukoza-oksidaze perjodatnom oksidacijom i L-histidinom i L-aspartatom

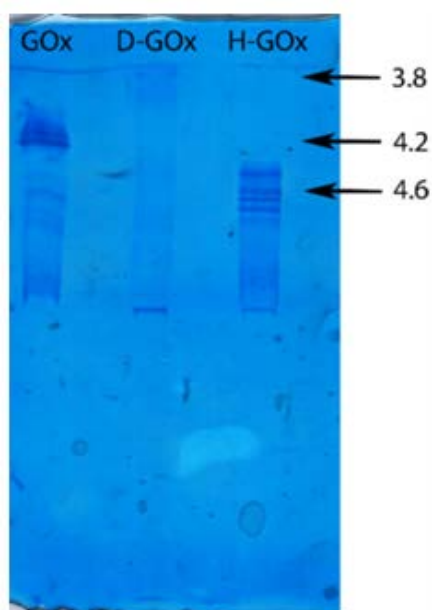
Kako je već ranije u literaturi opisano, povećanje negativnog naelektrisanja na površini proteina doprinosi efikasnijoj biomimetičkoj mineralizaciji, dok prisustvo amino grupa na površini proteina ometa ovu reakciju. [128] Takođe, poznato je da uvođenje histidinskih ostataka na površini enzima ubrzava reakciju biomineralizacije zbog ostvarivanja koordinativnih interakcija sa jonima Zn^{2+} . [135] [136] Na osnovu ovih činjenica, ispitivan je uticaj uvođenja L-aspartata i L-histidina u ugljenohidratnu strukturu glukoza-oksidaze na formiranje GOx@ZIF-8 biokompozita, kao i na njihovu stabilnost i katalitičku aktivnost.

Naime, glukoza-oksidaza je najpre perjodatno oksidovana kako bi se hidroksilne grupe šećernih komponenti sa površine enzima oksidovale do aldehidnih, nakon čega je usledila reduktivna aminacija L-aspartatom (L-Asp, D) i L-histidinom (L-his, H). Kako bi se potvrdila hipoteza da pri ovim reakcijama ne dolazi do promene molekulske mase proteina, uzorci su analizirani SDS PAGE elektroforezom (Slika 27).



Slika 27. SDS PAGE elektroforeza GOx-H (L-histidinom modificovana GOx), GOx-D (L-aspartatom modificovana GOx) i komercijalna GOx

Osim SDS PAGE elektroforezom, uzorci su analizirani i izoelektričnim fokusiranjem, kako bi se ispitala promene u pI vrednosti uzoraka nakon hemijskih modifikacija (Slika 28).



Slika 28. Izoelektrično fokusiranje i procenjene pI vrednosti komercijalne, D-GOx (aspartatom modificovane GOx) i H-GOx (L-histidinom modificovane GOx)

Izoelektrično fokusiranje je pokazalo da modifikacija GOx L-aspartatom ima za rezultat smanjenje pI vrednosti sa 4,2 na 3,8, što je u skladu sa uvođenjem negativno naelektrisanih aspartatnih ostataka. Suprotno tome, modifikacija GOx-a L-histidinom ima za rezultat povećanje pI vrednosti na oko 4,6, što se može objasniti kao posledica uvođenja baznih imidazolnih grupa. Pojava većeg broja traka u

uzorcima u slučaju izoelektričnog fokusiranja se može objasniti nehomogenošću početnog preparata komercijalne GOx koji je korišćen u reakciji.

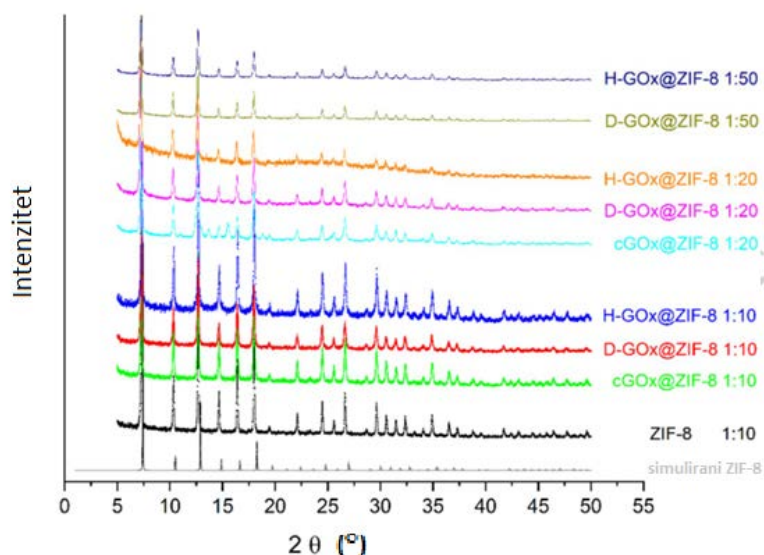
5.3.2. Biomineralizacija hemijski modifikovane GOx

Nakon što je glukoza-oksidadza hemijski modifikovana, imobilizovana je u ZIF-8 procesom biomimetičke mineralizacije. Formiranje određene topologije biokompozita je određeno brojnim faktorima. Različite topologije, **dia** i **sod**, su različito kinetički favorizovane, iako je stehiometrijski odnos Zn^{2+} i 2-metilimidazola isti, razlika potiče od kinetike formiranja, vrsti gradivnih jedinica i uslova sinteze. [137] Naime, **dia** topologija je niže koordinacije, gde nastaju gušće, slojevite (lamerarne) strukture i kinetički je jednostavnija za formiranje. Za razliku od **dia** topologije, **sod** topologija je tetraedarske koordinacije, gde nastaje 3D porozna mreža i ova topologija je kinetički zahtevnija za formiranje.

Kako bi se ispitao uticaj koncentracije rastvora cinka i 2-metilimidazola na formiranje jedne specifične topologije, postavljeni su eksperimenti sa različitim odnosom cinka i 2-metilimidazola, i to 1:50, 1:20 i 1:10, pri čemu je koncentracija cinka u svim eksperimentima bila 20 mM. Takođe, finalna koncentracija glukoza-oksidade i hemijski modifikovanih oblika je bila u svim eksperimentima 0,35 mg/mL.

Budući da je površina proteina i pre, a naročito posle hemijske modifikacije L-aspartatom i L-histidinom, dodatno naelektrisana, favorizovano je nastajanje **sod** topologije budući da u ovom slučaju površina enzima postaje centar nukleacije i formiranje stabilnijeg biokompozita je definisano ostvarivanjem koordinatno kovalentnih veza između naelektrisane površine enzima, jona Zn^{2+} kao i 2-metilimidazola.

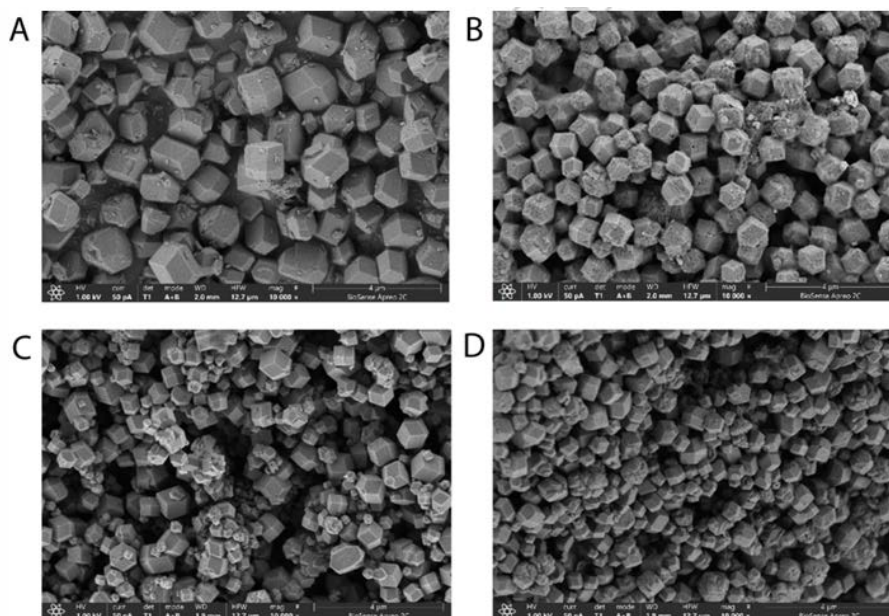
Topologija dobijenih biokompozita je određena PXRD analizama, pre čega su biokompoziti isprani vodom i osušeni na vazduhu, i dobijeni difraktogrami su prikazani na Slici 29.



Slika 29. PXRD difraktogrami sod-ZIF8 kao i GOx@ZIF-8 biokompozita sa 20 mM Zn^{2+} , pri različitim odnosima Zn^{2+} jona i 2-metilimidazola, 1:10, 1:20 i 1:50 ispranih vodom i osušeni na vazduhu

PXRD analiza je potvrdila da svi uzorci imaju sodalitnu topologiju, što je potvrđeno difrakcionim obrascima koji se poklapaju sa simuliranim *sod*-ZIF-8.

SEM analiza pokazala je jasno definisane romboedarske dodekaedarske kristale sa prosečnom veličinom čestica od približno 500 nm (Slika 30). Nešto veći prečnici kristala su uočeni kod ZIF-8 sintetisanog bez enzima, što ukazuje na blag uticaj prisustva proteina na morfologiju kristala.



Slika 30. SEM fotografije 4 vrste biokompozita (20 mM Zn^{2+} , odnos ZN i 2-metilimidazola 1:10): A-ZIF-8; B- cGOx@ZIF-8; C- D-GOx@ZIF-8; D- H-GOx@ZIF-8

5.3.3. Kinetički parametri imobilizacije hemijski modifikovane glukoza-oksidade u ZIF-8

Za opisivanje uspešnosti imobilizacije komercijalne i hemijski modifikovane glukoza-oksidade korišćeni su parametri opisani u prethodnim poglavljima. Sintetisni biokompoziti su isprani vodom, a nakon toga dodatno 10% (w/v) SDS, kako bi se utvrdila količina enzima adsorbovanog na površini. Prema podacima iz narednih tabela biokompoziti sa modifikovanom GOx pokazali su veću specifičnu aktivnost u odnosu na nativnu glukoza-oksidadu, dok su biokompoziti H-GOx@ZIF-8 imali najveću aktivnost. Navedeni podaci su u skladu sa postojećom literaturom i mogu se objasniti povećanjem negativnog naelektrisanja na površini proteina i uvođenjem imidazolnih funkcionalnih grupa koje omogućavaju koordinaciju sa Zn^{2+} jonima, čime se pospešuje biomineralizacija.

Tabela 14. Ključni parametri imobilizacije za različite biokompozite cGOx@ZIF-8 (20 mM Zn²⁺)

Parametar/odnos Zn:2-metilimidazol	1:50	1:20	1:10
Y _A (%)	99,92±0,10	99,9±0,09	99,06±1,01
Y _P (%)	41,77±6,71	88,16±2,06	90,02±4,31
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	27,51±9,80	24,06±0,52	33,89±4,28
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O(U/g _{kompozita})	1432,85±188,22	1888,48±732,40	2322,98±292,76
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	54,27±12,44	62,56±11,87	63,15±2,42
Factor efikasnosti (η) x 100 (%)	66,57±15,26	76,48±20,59	74,60±6,99
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O i 10% SDS(U/g _{kompozita})	26,93±12,94	57,57±2,13	110,35±12,32

Tabela 15. Ključni parametri imobilizacije za različite biokompozite D-GOx@ZIF-8 (20 mM Zn²⁺)

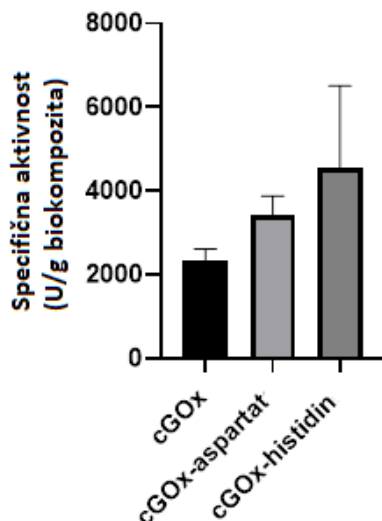
Parametar/odnos Zn:2-metilimidazol	1:50	1:20	1:10
Y _A (%)	99,73±0,23	99,73±0,33	99,94±0,08
Y _P (%)	12,22±2,01	18,40±0,03	13,31±0,20
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	40,07±6,85	59,10±9,17	47,91±2,33
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O(U/g _{kompozita})	596,36±124,14	3055,11±426,22	3407,52±475,51
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	15,45±9,54	47,44±6,69	71,53±13,08
Factor efikasnosti (η) x 100 (%)	10,28±2,54	45,77±6,45	76,19±2,88
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O i 10% SDS(U/g _{kompozita})	397,71±69,47	421,59±214,55	681,27±163,93

Tabela 16. Ključni parametri imobilizacije za različite biokompozite H-GOx@ZIF-8 (20 mM Zn²⁺)

Parametar/odnos Zn:2-metilimidazol	1:50	1:20	1:10
Y _A (%)	99,94±0,08	99,98±0,01	98,85±0,98
Y _P (%)	78,19±8,52	91,18±0,84	93,94±8,29
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	37,94±0,97	69,10±10,32	40,46±4,85
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O(U/g _{kompozita})	987,62±2,33	1937,93±191,13	4550,86±195,8
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	25,65±0,16	24,41±8,99	30,80±4,35
Faktor efikasnosti (η) x 100 (%)	31,83±5,05	26,88±9,12	27,55±3,89
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O i 10% SDS(U/g _{kompozita})	636,56±4,28	363,63±6,86	268,99±5,23

Specifična aktivnost biokompozita se povećala sa smanjenjem odnosa Zn²⁺:2-metilimidazol, a najviše vrednosti su dobijene pri odnosu 1:10. U poređenju sa prethodnim rezultatima, uočeno je značajno

povećanje aktivnosti, posebno u slučaju H-GOx, što ukazuje na pozitivan efekat hemijske modifikacije na efikasnost imobilizacije (Slika 31).



Slika 31. Specifična aktivnost različitih biokompozita ispranih destilovanom vodom (20 mM Zn^{2+} , odnos Zn^{2+} i 2-metilimidazola 1:10)

Ostali kinetički parametri (Y_A , Y_P i kapacitet vezivanja proteina) su uporedivi sa prethodnim rezultatima, dok se faktor efikasnosti nije značajno menjao u zavisnosti od odnosa reaktanata.

Nakon inkubiranja biokompozita u rastvoru SDS-a pokazalo se da je kod native glukoza-oksidade većina enzima bila površinski adsorbovana, što je potvrđeno velikim padom aktivnosti. Međutim, u slučaju biokompozita sa hemijski modifikovanom glukoza-oksidadom to nije slučaju budući da je pad aktivnosti bio manji, a što se smatra kao posledica bolje enkapsulacije enzima unutar ZIF-8.

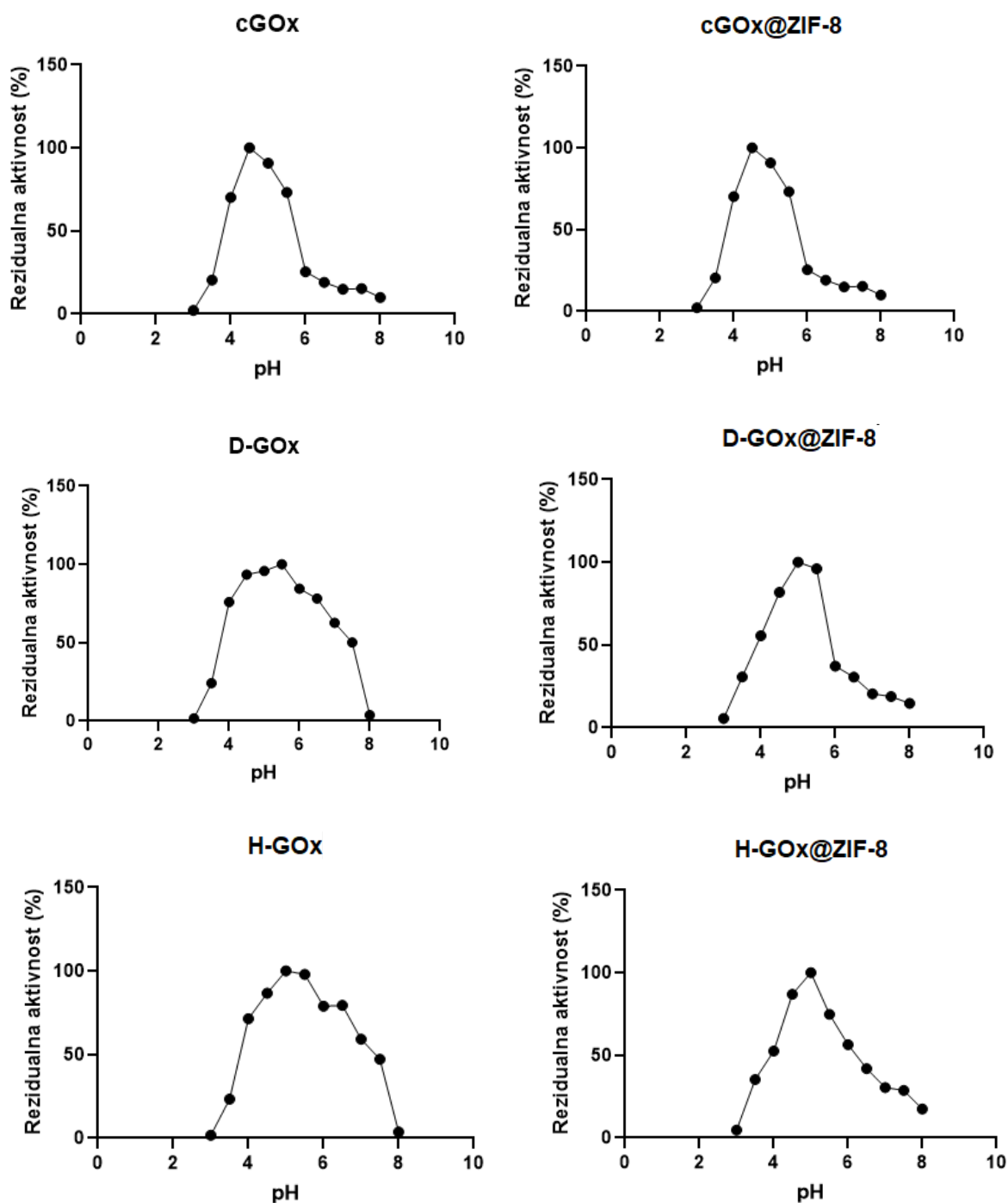
Dodatno, kao što je prikazano u Tabeli 17, hemijska modifikacija dovodi do delimičnih promena K_m vrednosti kao i specifične aktivnosti enzima, što potvrđuje hipotezu da je katalitička aktivnost glukoza-oksidade u velikoj meri očuvana odnosno supstrat se i dalje vezuje i konvertuje skoro istom efikasnošću. Međutim, imobilizacija u ZIF-8 dovodi do značajnih povećanja K_m vrednosti, što je u skladu sa difuzionim ograničenjima i izmenjenim mikrokruženjem karakterističnim za enzim@ZIF-8 sisteme. Kinetički parametri, K_m i V_{max} su izračunati samo za biokompozite koji su pokazali najbolju aktivnost, odnosno one biokompozite gde je finalna koncentracija Zn^{2+} bila 20 mM, a odnos cinka i 2-metilimidazola u reakciji biomineralizacije 1:10, pri konstantnoj finalnoj koncentraciji enzima od 0,35 mg/mL.

Tabela 17. Kinetički parametri rastvornih i imobilizovanih enzima (20 mM Zn²⁺, 1:10 odnos cinka i 2-metilimidazola), merenje rađeno u 0,1 M natrijum acetatnom puferu pH 5,5 na 25 °C

Uzorak	K _m (mM)	V _{max} (specifična aktivnost, IU/mg)
cGOx	4,91	84,7
D-GOx	6,17	93,9
H-GOx	7,12	112
cGOx@ZIF-8	10,9	63,2
D-GOx@ZIF-8	14,5	71,5
H-GOx@ZIF-8	10,2	30,8

5.3.4. pH optimumi rastvornih oblika komercijalne native i hemijski modifikovane glukoza-oksidade i enzim@ZIF-8 biokompozota

Grafici na Slici 32 prikazuju profile pH optimuma za nativnu i hemijski modifikovanu glukoza-oksidadu (cGOx, D-GOx i H-GOx), kao i za odgovarajuće enzime imobilizovane u ZIF-8. Za konstruisanje krivih pH optimuma su odabrani biokompoziti koji su pokazali najveću specifičnu aktivnost, odnosno biokompoziti koji se dobijaju kada je finalna koncentracija rastvora cinka 20 mM, a odnos cinka i 2-metilimidazola 1:10. Finalna koncentracija enzima je bila 0,35 mg/ml.



Slika 32. Grafici pH optimuma za rastvorne i enzime imobilizovane u ZIF-8

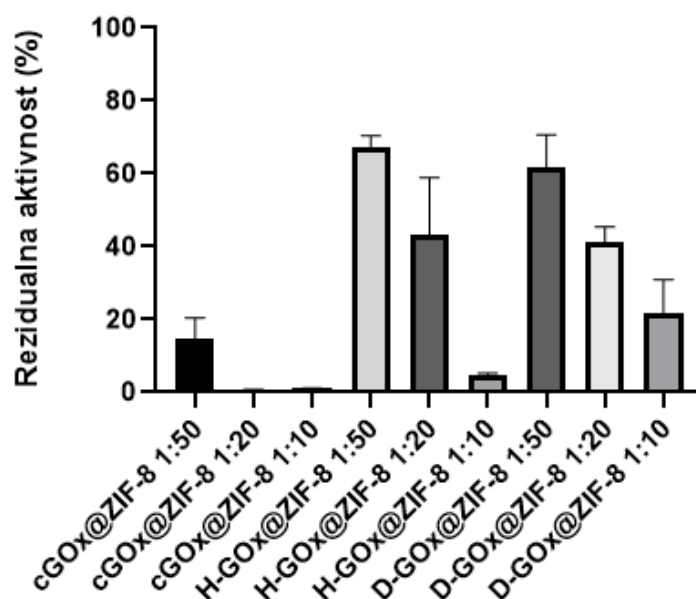
Dobijeni rezultati pokazuju da neimobilizovana nativna (cGOx) i hemijski modifikovana glukoza-oksidadaza (D-GOx i H-GOx) imaju slične pH optimume u opsegu pH 5-5,5, što ukazuje da hemijska modifikacija nije značajno uticala na pH optimum enzima.

Nakon imobilizacije u ZIF-8, pH optimumi su kod svih biokompozita dosta slični u poređenju sa neimobilizovanim enzimima, osim što se može uočiti umereno proširenje krive pH optimuma. Ovakvo ponašanje je u skladu sa različitim mikrokruženjima molekula enzima, difuzionim ograničenjima i efektima koje imobilizacija ima na aktivno mesto enzima.

5.3.5. Temperaturna stabilnost cGOx@ZIF-8, D-GOx@ZIF-8 i H-GOx@ZIF-8 biokompozita

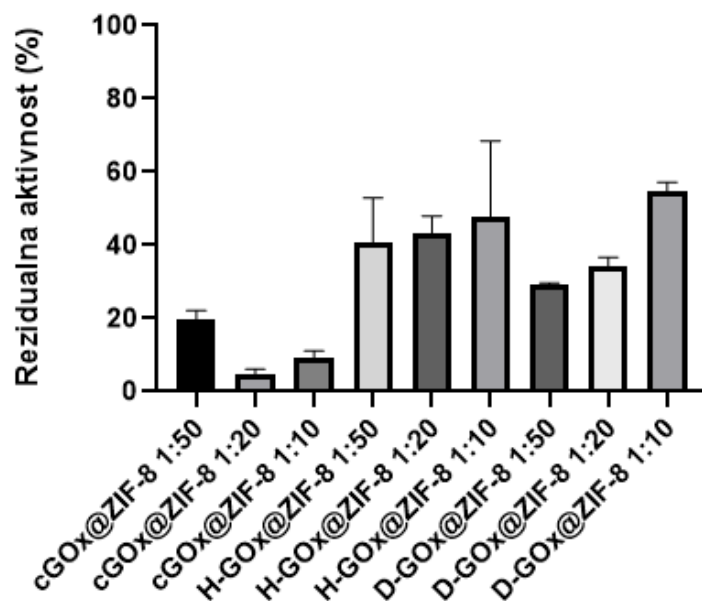
Termostabilnost biokompozita je određena merenjem specifične aktivnosti uzoraka nakon inkubiranja na 65 °C tokom 1 sata. Rezidualna aktivnost se izražava u procentima i definiše se kao odnos specifične aktivnosti uzoraka nakon i pre inkubiranja na 65 °C. Sa Slike 33 se može uočiti da je termostabilnost niža pri manjim odnosima Zn²⁺ i 2-metilimidazola, što ukazuje na veći udeo površinski adsorbovanog enzima. To je potvrdio i pad aktivnosti nakon inkubiranja biokompozita u 10% (w/v) rastvoru SDS. Hemijski modifikovani enzimi su pokazali veću termostabilnost u odnosu na nativni enzim, nakon imobilizacije u ZIF-8.

Najveću termostabilnost je pokazao H-GOx@ZIF-8 koji je zadržao oko 70% početne aktivnosti, dok je cGOx@ZIF-8 zadržao oko 15%. Slično tome, D-GOx@ZIF-8 je zadržao oko 60% početne aktivnosti.



Slika 33. Temperaturna stabilnost različitih biokompozita (različiti odnosi cinka i 2-metilimidazola) ispranih destilovanom vodom nakon inkubiranja 1 sat na 65 °C

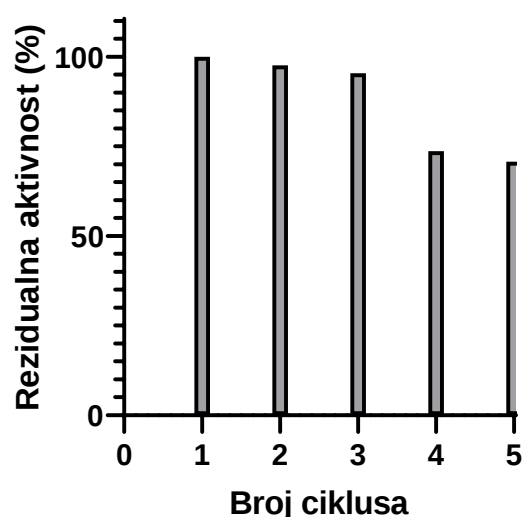
Nakon inkubiranja uzoraka u SDS, a potom inkubiranja na 65 °C tokom 1 sata, razlike u termostabilnosti uzoraka bile su manje izražene, što se može pripisati uklanjanju površinski vezanog enzima. Preostala aktivnost (~50-55% za enkapsulirane hemijski modifikovane enzime) ukazuje na bolju enkapsulaciju a time i bolju termostabilnost u odnosu na imobilizovani nativni enzim. Dobijeni podaci rezidualnih aktivnosti su prikazani na Slici 34.



Slika 34. Temperaturna stabilnost različitih biokompozita (različiti odnosi cinka i 2-metilimidazola) ispranih destilovanom vodom i 10% (w/v) SDS nakon inkubiranja 1 sat na 65 °C

5.3.6. Operativna stabilnost H-GOx@ZIF-8 biokompozita

Kako bi se odredila operativna stabilnost hemijski modifikovanih enzima imobilizovanih u ZIF-8, ispitivana je ponovna upotreba najefikasnijeg biokompozita, H-GOx@ZIF-8, pripremljenog tako da je odnos cinka i 2-metilimidazola u reakcionoj smeši bio 1:10, dok je finalna koncentracija rastvora cinka bila 10 mM. Eksperiment je izveden tokom pet uzastopnih katalitičkih ciklusa, što je prikazano na Slici 35.



Slika 35. Ponovna upotreba H-GOx@ZIF-8 biokompozita

Rezidualna aktivnost je izražena u procentima i definisana je kao odnos specifične aktivnosti izmerene nakon određenog ciklusa i specifične aktivnosti izmerene u prvom ciklusu.

Nakon svakog ispitivanog ciklusa, biokompozit je izdvojen centrifugiranjem, ispran destilovanom vodom i korišćen ponovo pri istim reakcionim uslovima. Dobijeni rezultati pokazuju da ispitivani biokompozit zadržava značaj deo početne aktivnosti, što dalje implicira da ovako enkapsuliran enzim ostaje aktivan i tokom ponovljenih ciklusa.

5.4. Uticaj vrste i koncentracije imidazolatnog liganda na imobilizaciju GOx u ZIF

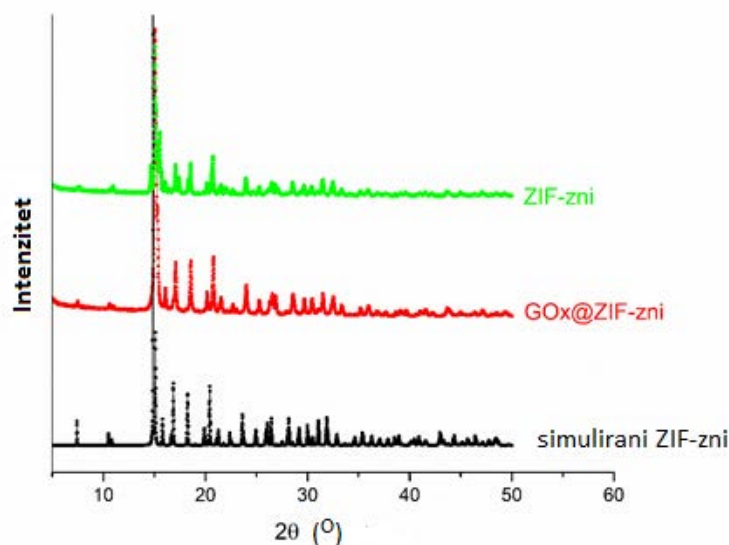
Prethodno dobijeni rezultati su pokazali da hemijska modifikacija i imobilizacija glikoproteina kao što su GOx i HRP u ZIF-8 značajno utiče aktivnost i stabilnost dobijenih biokompozita na povišenoj temperaturi i u prisustvu deterdženta SDS. Takođe smo pokazali da način i redosled mešanja reaktanata kao i koncentracija i odnos koncentracija cinka i liganda značajno da utiču na aktivnost i stabilnost biokompozita. U literaturi je takođe navedeno da se neki enzimi, kao što je lakaza, mogu imobilizovati i u drugim ZIF strukturama gde su korišćeni slični ligandi: imidazol, i koje imaju različitu topologiju i poroznost od *sod* topologije, koja je karakteristična za ZIF-8. Tako je, lakaza imobilizovana u ZIF koristeći Zn^{2+} i imidazol, pri čemu je dobijen ZIF sa *zni* topologijom. [138]

Da bismo ispitali koliki je uticaj vrste liganda, a koliki koncentracija i odnosa koncentracija cinka i liganda na aktivnost i stabilnost biokompozita u ovom delu istraživanja smo optimizovali odnos koncentracija cinka i imidazola i uporedili aktivnost i stabilnost dobijenih biokompozita (ZIF-zni) sa biokompozitima gde je optimizovana koncentracija i odnos koncentracija cinka i 2-metil imidazola (ZIF-8).

5.4.1. Uticaj koncentracije liganda na fizičko-hemijske osobine GOx@ZIF-zni biokompozita

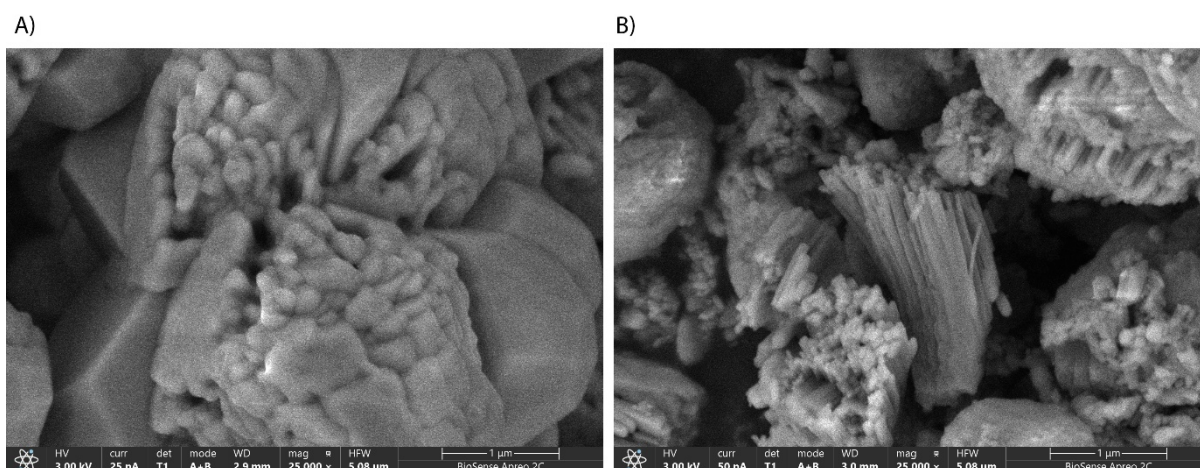
Kako bi se utvrdili najoptimalniji uslovi imobilizacije GOx u ZIF-ove različite topologije od *sod* rađeni su eksperimenti biomineralizacije sa Zn^{2+} i imidazolom, pri čemu su finalne koncentracije rastvora cinka u eksperimentima biomineralizacije bile 10, 20 i 60 mM. Takođe, ispitivan je i uticaj različitih odnosa cinka i imidazola na imobilizaciju, pa su eksperimenti rađeni pri 1:10, 1:20, 1:50 i 1:100 odnosa cinka i imidazola. Finalna koncentracija glukoza-oksidade u svim eksperimentima je bila ista i iznosila je 0,35 mg/mL. Eksperimenti su rađeni kao i u našim prethodnim istraživanjima, tako što je najpre homogenizovan rastvor cinka i enzima tokom 1 minuta, a nakon dodatka rastvora imidazola, reakciona smeša je homogenizovana još pola sata i ostavljena da stoji tokom narednih 12 sati. Ovakav redosled dodavanja komponenti zasniva se na pretpostavljenoj tezi da cinkovi joni najpre ostvaruju elektrostatičke interakcije sa površinom proteina, nakon čega, dodatkom imidazola, dolazi do formiranja koordinativno kovalentnih veza između imidazola i cinka.

Nakon sinteze, biokompoziti su isprani destilovanom vodom i okarakterisani PXRD, SEM i BET metodom, kako bi se utvrdila njihova topologija.



Slika 36. Simulirani PXRD difraktogrami uzoraka (simulirani ZIF-zni, ZIF-zni i GOx@ZIF-zni) biokompozita (20 mM Zn^{2+} i, Zn:Im 1:50)

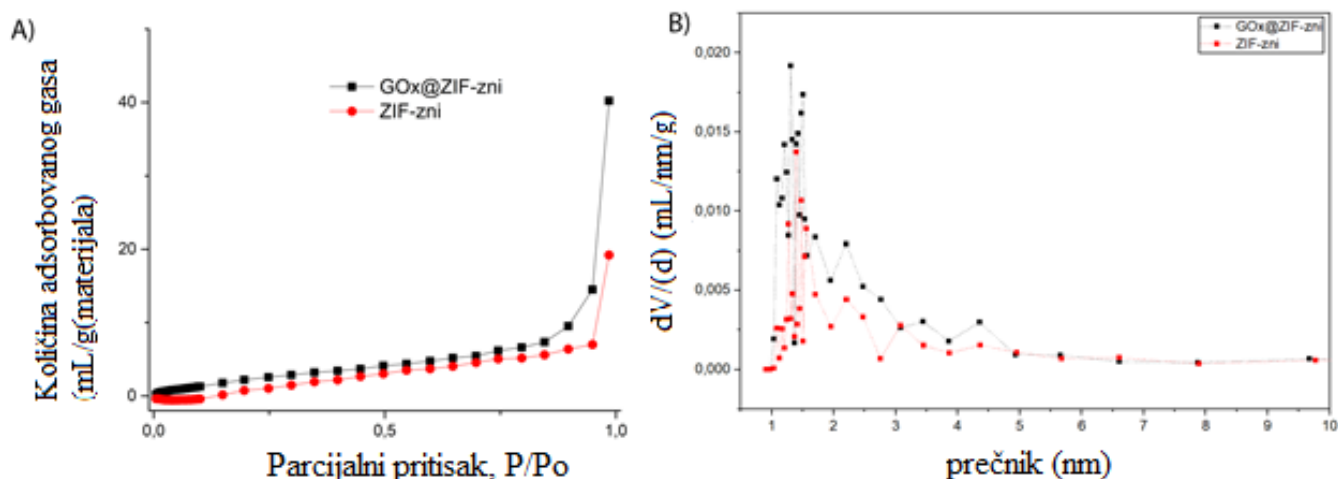
PXRD analiza je potvrdila da uzorci imaju zni topologiju, što je potvrđeno difrakcionim obrascima koji odgovaraju simuliranom ZIF-zni (Slika 36). Dobijeni difraktogrami, sa karakterističnim pikovima na približno $15,2^\circ$ (2θ) u slučaju GOx@ZIF-zni kao i ZIF-zni bez enzima odgovaraju teorijski potvrđenom difraktogramu ZIF-zni. [139] Dobijeni difraktogrami, takođe, potvrđuju da pri enkapsulaciji enzima na ovaj način nije došlo do narušavanja kristalne strukture ZIF-a. U poređenju sa ZIF-zni bez enzima, GOx@ZIF-zni pokazuje blago smanjenje intenziteta pikova i njihovo delimično proširenje, što se može objasniti blagim smanjenjem kristaličnosti usled imobilizacije enzima tokom biomineralizacije.



Slika 37. SEM fotografije ZIF-zni (A) i GOx@ZIF-zni (B) biokompozita (20 mM Zn^{2+} , Zn²⁺: Im 1:50)

SEM analiza je pokazala da su ispitivani uzorci (ZIF-zni i GOx@ZIF-zni) uniformne, gusto pakovane prizmatične morfolologije, sa glatkim površinama i oštrim ivicama (Slika 37). Pomenuta prizmatična morfolologija je specifična za zni topologiju. Međutim, čestice GOx@ZIF-zni su nešto manje i

pokazuju izraženije nepravilnosti na površini u poređenju sa ZIF-zni, što sugerše da prisustvo glukoza-oksidade tokom sinteze utiče na dinamiku rasta kristala i dovodi do delimične hrapavosti površine. Ova zapažanja su u skladu sa PXRD rezultatima koji takođe ukazuju na blago smanjenje kristaličnosti nakon enkapsulacije enzima.



Slika 38. A) N_2 adsorpcija-desorpcija izoterme uzoraka (77 K), B) BJH veličina pora ZIF-zni i GOx@ZIF-zni u mezoporoznom opsegu (1-10 nm)

Izoterme adsorpcije-desorpcije azota potvrđuju mikroporoznu prirodu oba materijala (Slika38 A), pri čemu je specifična površina GOx@ZIF-zni iznosila $5,32 \text{ m}^2/\text{g}$, dok za kompozit ZIF-zni nije bilo moguće primeniti BET analizu za određivanje pora, zbog niske adsorpcije. Veća zapremina pora kod GOx@ZIF-zni ukazuje na prisustvo defekta i među-čestičnih šupljina nastalih tokom biomimetičke biomineralizacije. BJH analiza je potvrdila dodatnu mezoporoznost i veći broj manjih pora ($\sim 1\text{-}2 \text{ nm}$), što upućuje na promene u mehanizmu kristalizacije usled inkorporacije enzima.

5.4.2. Kinetički parametri GOx@ZIF-zni biokompozita

Budući da su dobijeni GOx@ZIF-zni biokompoziti heterogene strukture za njihovu karakterizaciju su korišćeni već opisani parametri u prethodnim poglavljima.

Uočeno je da kod uzoraka pripremljenih pri višim koncentracijama imidazola, tj. pri odnosu cinka i imidazola 1:100, određivanje koncentracije proteina nakon biomineralizacije nije bilo pouzdano, zbog interferencije imidazola pri spektrofotometrijskom merenju apsorbance na 280 nm. Iz tog razloga, efikasnost imobilizacije u ovim eksperimentima procenjavana je prvenstveno na osnovu katalitičke aktivnosti i stabilnosti dobijenih biokompozita.

Dobijeni rezultati pokazuju da specifična aktivnost biokompozita raste sa smanjenjem odnosa cinka i imidazola, što je najverovatnije posledica previsoke koncentracije imidazola u smeši. Iz literature je ranije poznato da povišene koncentracije imidazola i njegovih derivata dovode do denaturacije enzima usled protonacije i/ili kompetitivne koordinacije ovih jedinjenja. [140] Zbog toga je biokompozit gde je za reakciju biomineralizacije korišćen rastvor cinka u finalnoj koncentraciji 60 mM, pri odnosu cinka i imidazola 1:100, pokazao najnižu specifičnu aktivnost (Tabela 18, 19, 20).

Tabela 18. Ključni parametri imobilizacije za različite biokompozite GOx@ZIF-zni (10 mM Zn²⁺)

Parametar/odnos Zn:imidazol	1:100	1:50	1:20	1:10
Y _A (%)	91,51±7,52	88,53±11,05	85,79±10,95	90,81±4,79
Y _P (%)	88,85±14,62	82,72±15,06	90,31±9,68	96,08±3,67
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	223,30±62,15	463,65±14,71	210,91±76,44	219,43±25,70
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O(U/g _{kompozita})	1243,19±163,44	622,30±360,11	1839,31±277,49	2051,45±218,79
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	4,92±2,52	1,33±0,73	9,69±4,09	12,50±6,53
Factor efikasnosti (η) x 100 (%)	4,44±2,08	1,64±1,28	9,04±1,73	7,45±1,58
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O i 10% SDS(U/g _{kompozita})	548,63±48,31	177,77±39,68	285,87±46,67	357,78±97,28

Tabela 19. Ključni parametri imobilizacije za različite biokompozite GOx@ZIF-zni (20 mM Zn²⁺)

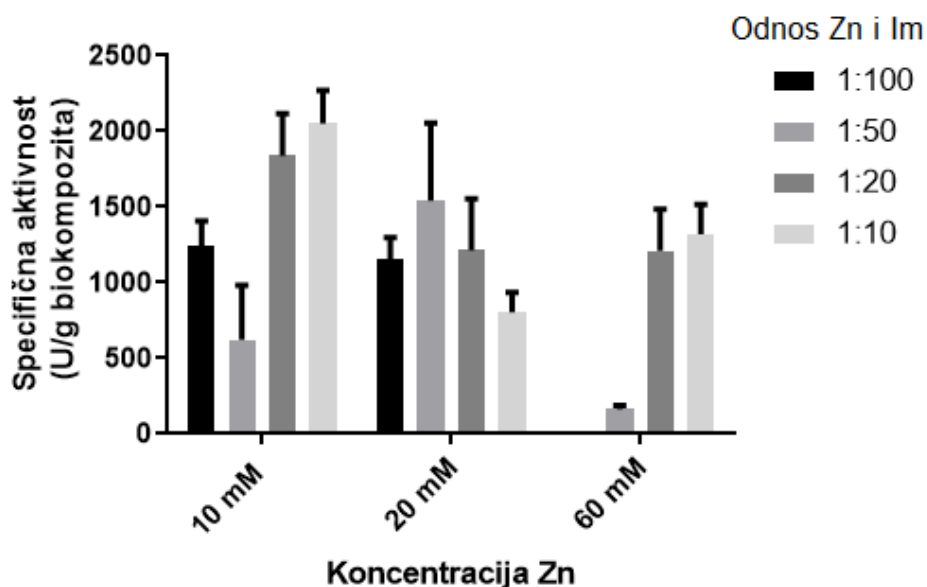
Parametar/odnos Zn:imidazol	1:100	1:50	1:20	1:10
Y _A (%)	99,37±0,55	99,07±1,30	92,99±6,85	79,58±13,05
Y _P (%)	n. i.	95,15±4,04	98,61±2,41	96,32±3,17
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	n. i.	189,30±19,53	157,57±34,69	125,06±9,28
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O(U/g _{kompozita})	1155,93±142,79	1539,75±514,97	1214,01±341,89	802,92±131,89
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	n. i.	8,14±2,55	7,79±1,76	9,58±5,44
Factor efikasnosti (η) x 100 (%)	n. i.	8,84±1,94	8,38±2,03	9,85±4,00
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O i 10% SDS(U/g _{kompozita})	1304,88±447,30	379,96±89,23	998,60±354,05	848,05±160,03

n. i. – nije izmerena vrednost

Tabela 20. Ključni parametri imobilizacije za različite biokompozite GOx@ZIF-zni (60 mM Zn²⁺)

Parametar/odnos Zn:imidazol	1:100	1:50	1:20	1:10
Y _A (%)	100±0	100±0	99,63±0,13	96,72±4,58
Y _P (%)	n. i.	n. i.	n. i.	25,70±3,05
Kapacitet vezivanja proteina (mg/g nosača)	n. i.	n. i.	n. i.	18,28±0,18
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O (U/g _{kompozita})	0,05±0,06	162,84±26,02	1212,34±275,06	1319,96±197,34
Specifična aktivnost (U/mg _{vezanog enzima})	n. i.	n. i.	n. i.	28,01±0,48
Factor efikasnosti (η) x 100 (%)	n. i.	n. i.	n. i.	31,96±9,53
Specifična aktivnost biokompozita nakon ispiranja dH ₂ O i 10% SDS (U/g _{kompozita})	0,16±0,05	135,68±17,15	313,71±68,71	792,35±114,03

n. i. – nije izmerena vrednost



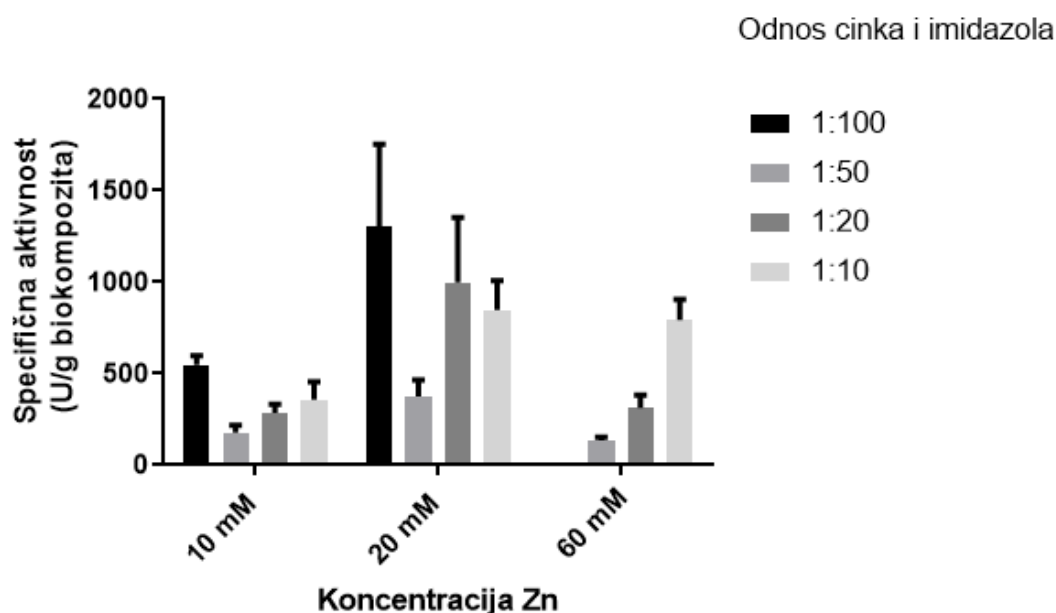
Slika 39. Specifična aktivnost ispitivanih biokompozita nakon ispiranja destilovanom vodom

Ipak, kako se vidi sa Slike 39, najbolji rezultati za specifičnu aktivnost biokompozita dobijeni su pri odnosu cinka i imidazola 1:10, pri čemu je finalna koncentracija cinka u reakcionoj smeši bila 10 mM. Za razliku od vrednosti za specifičnu aktivnost biokompozita, najveća specifična aktivnost vezanog enzima je primećena kod biokompozita koji su sintetisani pri odnosu cinka i imidazola 1:10, dok je finalna koncentracija cinka u reakcionoj smeši bila 60 mM. Sličan trend je primećen i za faktor efikasnosti.

U poređenju sa biokompozitima GOx@ZIF-8, pri istim uslovima tj. pri odnosu cinka i imidazola 1:50 i finalnoj koncentraciji cinka 20 mM, ovi biokompoziti pokazuju dvostruko veću specifičnu aktivnost.

Daljom optimizacijom koncentracije cinka (10 mM) i odnosa cinka i imidazola (1:10) dobijeni su biokompoziti sa specifičnom aktivnošću koja je ~3 puta veća u odnosu na GOx@ZIF-8. Ostali kinetički parametri (Y_A , Y_P i kapacitet vezivanja proteina) su slični u poređenju sa prethodno dobijenim rezultatima.

Da bi se uklonili površinski adsorbovani enzimi i utvrdilo koliko je enzima enkapsulirano unutar ZIF-zni strukture, biokompoziti su inkubirani u 10% (w/v) SDS tokom 30 minuta. Nakon toga su biokompoziti isprani vodom i etanolom i izmerena im je specifična aktivnost na već opisan način. Budući da SDS uklanja površinski adsorbovane proteine, zaostala aktivnost nakon inkubiranja u rastvoru SDS-a se može pripisati samo enzimu enkapsuliranom unutar ZIF-zni. Veća rezidualna aktivnost GOx@ZIF-zni u poređenju sa GOx@ZIF-8 ukazuje da gušća **zni** topologija omogućava efikasnije fizičko zarobljavanje i zaštitu enzima unutar ZIF-zni. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim tvrdnjama da jače interakcije između enzima i matriksa, kao i smanjena dostupnost pora, doprinose povećanoj stabilnosti enzima u neprirodnim uslovima za enzim kao što su povišena temperatura ili neoptimalan pH rastvora.

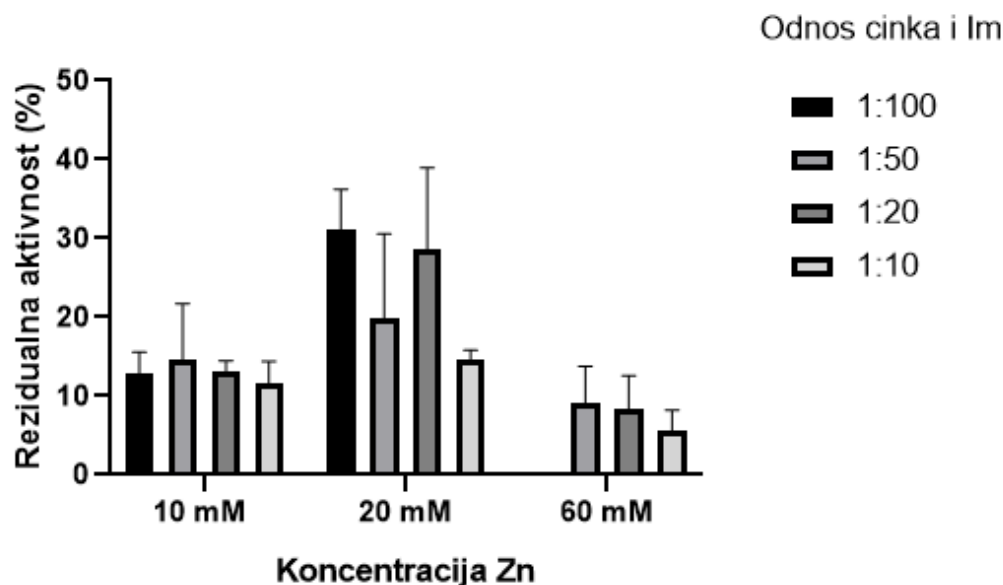


Slika 40. Specifična aktivnost ispitivanih biokompozita nakon ispiranja destilovanom vodom i 10% (w/v) SDS

5.4.3. Termostabilnost biokompozita GOx@ZIF-zni

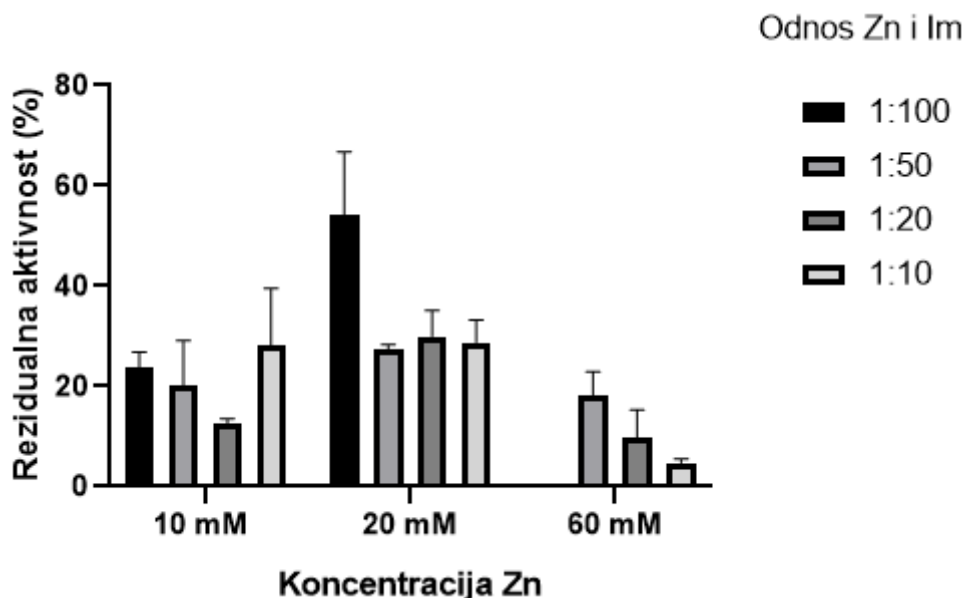
Termostabilnost svih biokompozita izražena je preko rezidualne aktivnosti, koja predstavlja odnos specifične aktivnosti biokompozita nakon inkubacije na 65 °C tokom 1 sata i specifične aktivnosti neinkubiranog enzima. Termostabilnost je određena za biokompozite isprane destilovanom vodom (Slika 41) i za biokompozite koji su dodatno isprani 10% (w/v) SDS.

Rezultati pokazuju da je najveća termostabilnost postignuta kod biokompozita koji su sintetisani pri finalnoj koncentraciji cinka od 20 mM i odnosu cinka i imidazola 1:100, koji nakon inkubiranja na 65 °C tokom 1 sata zadržava 30% početne specifične aktivnosti. Takođe, uočava se da smanjenje koncentracije imidazola dovodi do smanjenja termostabilnosti. Kako su slični trendovi primećeni i za specifičnu aktivnost nakon inkubiranja u rastvoru SDS-a, može se pretpostaviti da je značajan deo enzima adsorbovan na površini biokompozita.



Slika 41. Termostabilnost biokompozita ispranih destilovanom vodom na 65°C

Nakon inkubiranja biokompozita u SDS-u, zabeležene su veće vrednosti termostabilnosti u poređenju sa biokompozitima ispranih samo destilovanom vodom. Naime, biokompoziti koji su sintetisani pri finalnoj koncentraciji cinka 20 mM i odnosu cinka i imidazola 1:100, i isprani rastvorom SDS-a, su nakon inkubiranja na 65°C zadržali 50% svoje specifične aktivnosti (Slika 42).



Slika 42. Termostabilnost biokompozita ispranih destilovanom vodom i 10% (w/v) SDS na 65°C

Povećana rezidualna aktivnost nakon inkubiranja na povišenoj temperaturi ukazuje da ZIF-zni struktura obezbeđuje stabilizujuće mikrookruženje u odnosu na ZIF-8. Ovaj efekat se može objasniti smanjenom konformacionom fleksibilnošću enzima unutar gusto pakovane strukture, kao i zaštitom enzima od denaturacije izazvane rastvaračem.

5.5. Ekspresija i karakterizacija mutanata glukoza-oksidade u *Pichia pastoris* KM71H

U delu istraživanja koji uključuje proteinski inženjering, cilj nam je bio da bioinformatičkim metodama kao što je metoda informacionih spektara (ISM), dobijemo mutante HRP i GOx povećane aktivnosti i stabilnosti kako u rastvornom obliku tako i u imobilizovanom u ZIF-8 biokompozitima. Ovo je planirano da bude samo prvi korak u budućoj imobilizaciji dobijenih mutanata u drugim MOF strukturama i pokušaj razumevanja uticaja površinskih mutacija na stabilnost i aktivnost dobijenih biokompozita.

Kao prvi deo ovih istraživanja dobijeni su mutanti GOx, i njihovi biokompoziti u ZIF-8 i kinetički okarakterisani.

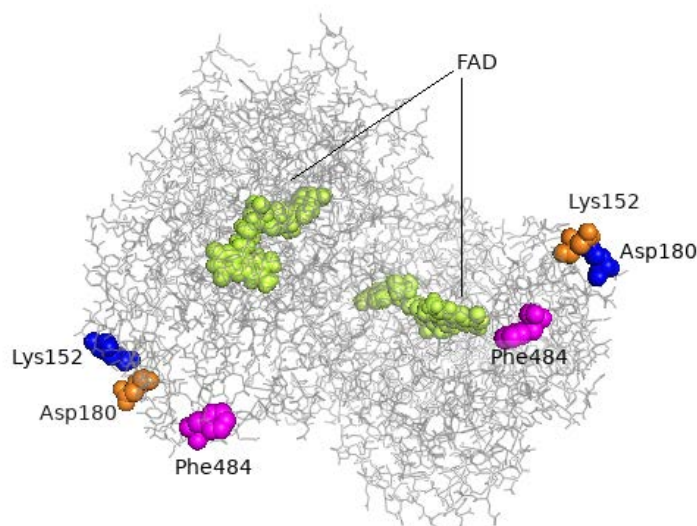
5.5.1. Bioinformatička analiza GOx i predviđanje mutanata GOx ISM metodom

ISM metoda korišćena je za bioinformatičku analizu glukoza-oksidade (GOx) i perokside iz rena (HRP) sa ciljem identifikacije funkcionalno značajnih regiona i predviđanja potencijalno korisnih mutacija enzima. Analiza je obuhvatila određivanje dominantnih frekvencija informacionog spektra, kao i analizu pokretnog prozora radi identifikacije regiona (u našem slučaju region od 106 do 302 pozicije) sa najvećim doprinosom funkcionalnim frekvencijama (u našem slučaju frekvencija 0,088). Na osnovu dobijenih rezultata odabrane su pozicije za mutagenezu, a potencijalne aminokiselinske zamene analizirane su praćenjem promena amplituda dominantnih frekvencija nakon in silico mutacija. Na ovaj način ISM metoda korišćena je kao alat za racionalni dizajn mutantnih varijanti GOx i HRP enzima pogodnih za dalju eksperimentalnu karakterizaciju i imobilizaciju u biokompozitnim sistemima.

Bioinformatička analiza mutanata glukoza-oksidade izvršena je metodom informacionog spektra (ISM), pri čemu su analizirane promene amplituda karakterističnih frekvencija F(0,088) i F(0,159) kod različitih mutantnih varijanti GOx enzima.

Analiza potencijalno funkcionalno značajnih aminokiselinskih ostataka GOx enzima izvršena je kombinovanjem ISM metode, analize amplituda karakterističnih frekvencija i strukturnih podataka dobijenih iz kristalne strukture proteina (PDB: 3QVP). Posebna pažnja posvećena je aminokiselinskim ostacima koji ostvaruju različite nekovalentne interakcije, uključujući vodonične veze, π - π stacking, π -sigma, π -alkyl i katjon- π interakcije, kao i njihovom potencijalnom uticaju na katalitičku aktivnost i interakciju enzima sa MOF nosačem.

Dobijeni rezultati pokazali su da pojedine pozicije imaju značajan uticaj na amplitude dominantnih ISM frekvencija, što ukazuje na njihovu moguću funkcionalnu ulogu. Posebno se izdvajaju ostaci Asp180, Phe484 i Lys152, kod kojih su mutacije dovele do značajnih promena amplituda informacionog spektra i kinetičkih parametara enzima.

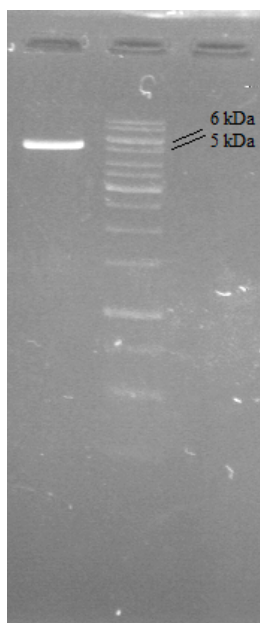


Slika 43. Trodimenzionalna struktura dimera GOx na kojoj su prikazane pozicije aminokiselinskih ostataka Lys152, Asp180 i Phe484

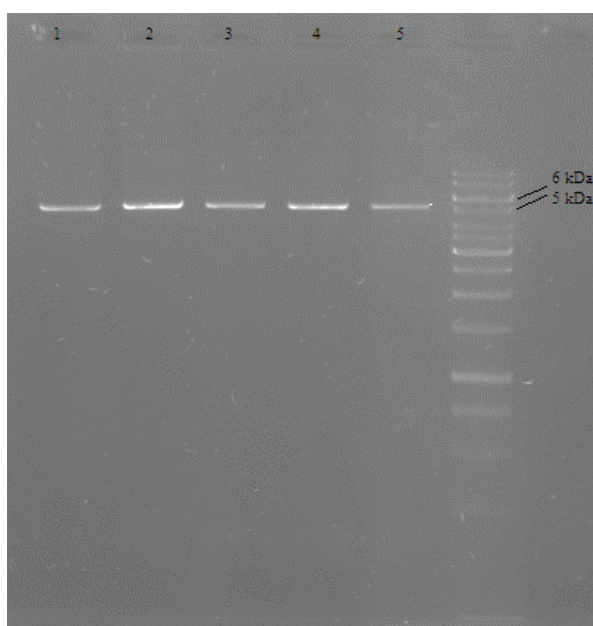
5.5.2. Izolovanje plazmida odgovarajućih mutanata i linearizacija plazmida

Plazmidi koji nose gen za GOx sa mutacijama predviđenim ISM metodom uklonirani u pPICZ α A vektor su kupljeni od kompanije *GenScript*. Dobijeni plazmidi su iskorišćeni za transformaciju kompetentnih ćelija *E. coli* XL10gold. Iz transformisanih bakterija su izolovani plazmidi po već opisanom protokolu.

Dobijeni plazmidi su linearizovani pomoću *PmeI* restrikcionog enzima i nakon toga je njihova masa proverena na agaroznoj elektroforezi za mutant K152D (Slika 44), kao i za ostale mutante K152C, D180E, D180L, F484N i F484H (Slika 45). Budući su dobijeni plazmidi na odgovarajućoj masi (~5,5 kDa) dalje su elektrokompetentne *P. pastoris* KM71H ćelije transformisane odgovarajućim linearizovanim plazmidima.



Slika 44. Linearizovani plazmid K152D mutant GOx u pPICZ α A vektoru i markeri-GeneRuler 1 kb DNA Ladder SM0311

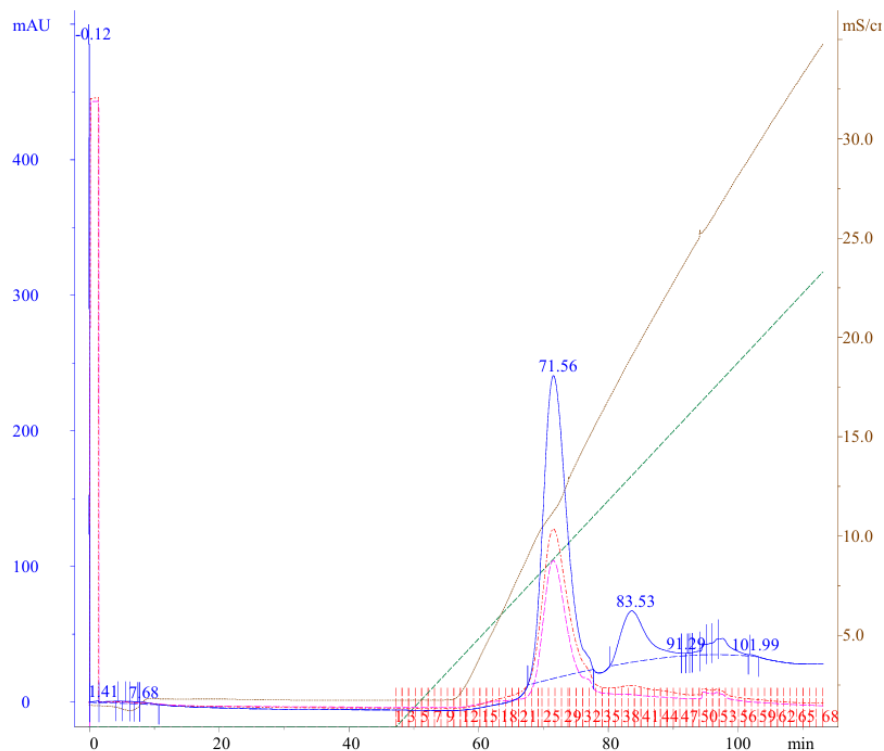


Slika 45. Linearizovani plazmidi mutanata GOx u pPICZ α A vektoru (1-K152C; 2-D180E; 3-D180L; 4-F484N; 5-F484H) i markeri-GeneRuler 1 kb DNA Ladder SM0311

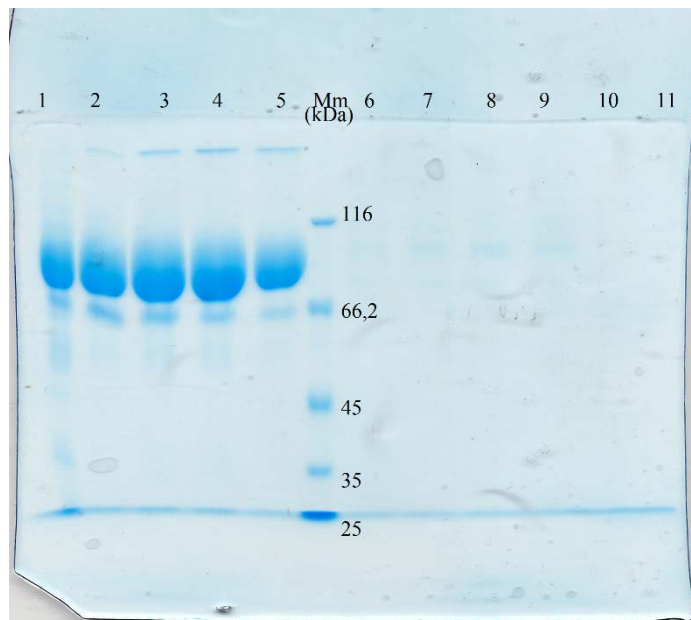
5.5.3. Ekspresija i prečišćavanje K152D mutanta glukoza-oksidade

Ekspresija K152D mutanta je rađena tako što su prvo ćelije kvasca gajene u glicerolnom BMG medijumu tokom dva dana dok optička gustina ćelija merena na 600 nm nije dostigla vrednost 5-6. Nakon toga, ćelije su centrifugirane i resuspendovane u 10 puta manjoj zapremini BMM medijuma. Fermentacija je rađena sa 0,5% (v/v) koncentracijom metanola za indukciju ekspresije enzima.

Eksprimirani enzim je prečišćen na DEAE jonoizmenjivačkoj hromatografiji (Slika 46), a nakon toga je prečišćeni uzorak analiziran SDS elektroforezom (Slika 47).



Slika 46. Hromatogram nakon prečišćavanja K152D mutanta na DEAE koloni jonoizmenjivačkom hromatografijom (plavo-280 nm; magenta-420 nm; crveno-450 nm)



Slika 47. SDS elektroforeza uzoraka nakon prečišćavanja na DEAE koloni (1-alikvot pre HPLC-a; 2- Frakcija 24; 3- frakcija 25; 4-frakcija 26; 5-frakcija 29; 7-frakcija 37; 8-frakcija 38; 9-frakcija 39; 10-frakcija 41; 11-nevezane frakcije)

Nakon provere čistoće eksprimiranog proteina SDS elektroforezom, frakcije koje su pokazale prisustvo trake na oko 85 kDa (frakcije 24-29) su spojene i korišćene za kinetičku karakterizaciju i biomineralizaciju.

Kako bismo detaljnije okarakterisali K152D mutant proizveden u *P. pastoris* određivani su kinetički parametri kao što su K_m i V_{max} , pH optimum i supstratna specifičnost.

5.5.3.1. Kinetička karakterizacija K152D mutanta GOx

Prečišćene frakcije mutanta K152D glukoza-oksidade su korišćene za određivanje K_m i k_{cat} na pH 5,5 i upoređeni sa prethodno dobijenim rezultatima za *wild type* glukoza-oksidadu eksprimiranu u *P. pastoris* (Tabela 21).

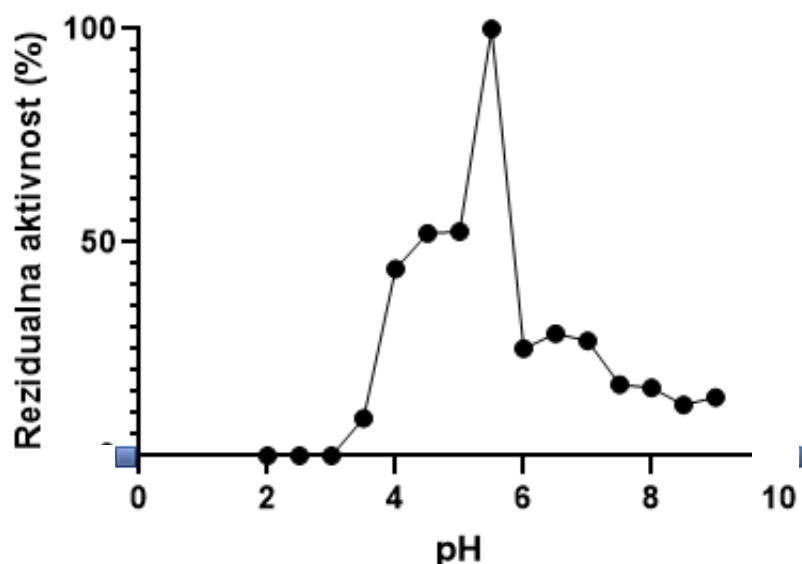
Tabela 21. Kinetičke konstante K152D mutanta glukoza-oksidade eksprimiranog u *P. pastoris* KM71H

	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Sp (U/mg)
K152D mutant glukoza-oksidade	29,2	607,1	20,8	214,3

Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da mutant K152D glukoza-oksidade eksprimiran u *P. pastoris* pokazuje oko tri puta veću konstantu specifičnosti (k_{cat}/K_m) nego *wild type* glukoza-oksida (6,7 mM⁻¹s⁻¹) takođe eksprimiran u *P. pastoris*. [141]

5.5.3.2. Određivanje pH optimuma K152D mutanta GOx

pH optimum je određivan u opsegu pufera od 2 do 9. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je optimalan pH za merenje aktivnosti ovog mutanta 5,5.



Slika 48. Aktivnost K152D glukoza- oksidaza mutanta proizvedenog u *P. pastoris* KM71H na različitim pH vrednostima

5.5.3.3. Određivanje supstratne specifičnosti K152D mutanta GOx

Znajući da se glukoza-oksidaza koristi za praćenje glukoze u krvi, važno je da ovaj enzim ima visoku specifičnost prema glukozi u odnosu na druge šećere. Da bismo ispitali specifičnost K152D mutanta glukoza-oksidaze merena je njegova aktivnost sa drugim šećerima kao što su galaktoza i maltoza (Tabela 22) na pH 5,5 i pH 7,4.

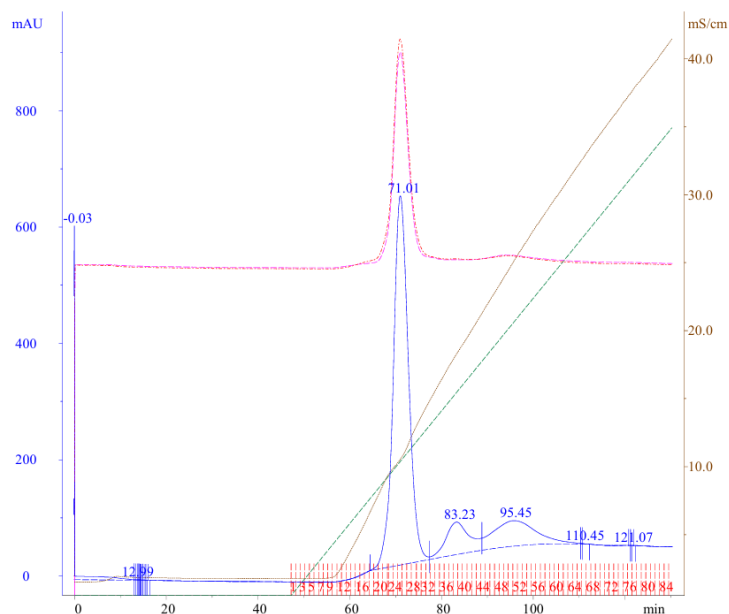
Tabela 22. Relativna aktivnost K152D mutanta glukoza-oksidaze sa različitim šećerima u poređenju sa glukozom (%) u PBS puferu pH 7,4 i natrijum acetatnom puferu pH 5,5

pH 5,5		pH 7,4	
5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)	5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)
0,52	1,65	0,30	1,56
250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)	250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)
0,67	10,1	1,74	28,83

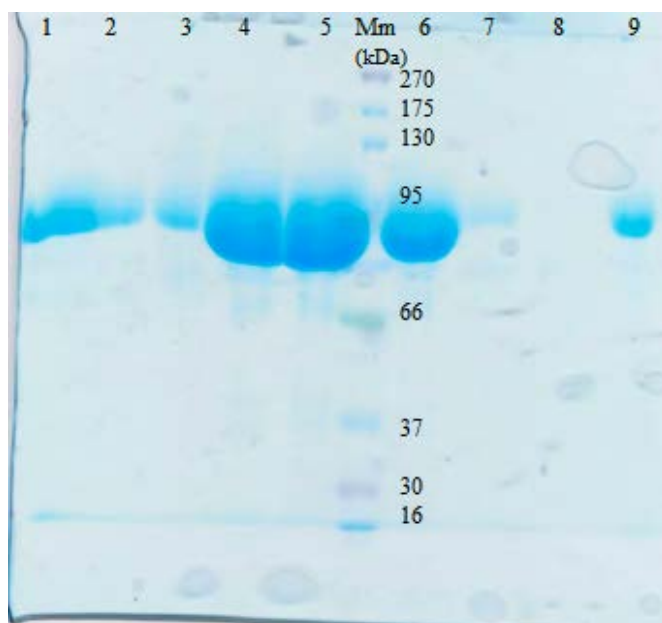
Mutant K152D je zadržao visoku specifičnost ka glukozi, ali ima veću aktivnost sa galaktozom (0,30%) u odnosu na *wild type* (0,18%) na pH 7,4 za 5 mM koncentracije šećera. Aktivnost sa maltozom za *wild type* na ovoj pH vrednosti nije ranije detektovana. U slučaju 250 mM rastvora šećera, takođe na pH 7,4 je detektovana manja aktivnost sa galaktozom (1,74) u odnosu na *wild type* (10%). [141]

5.5.4. Ekspresija i prečišćavanje K152C mutanta GOx

Ekspresija K152C mutanta je rađena na prethodno opisan način. Ekspimirani protein je prečišćen na DEAE jonoizmenjivačkoj hromatografiji (Slika 49), a nakon toga je prečišćeni uzorak analiziran SDS elektroforezom (Slika 50).



Slika 49. Hromatogram nakon prečišćavanja K152D mutanta na DEAE koloni jonoizmenjivačkom hromatografijom (plavo-280 nm; magenta-420 nm; crveno-450 nm)



Slika 50. SDS elektroforeza uzoraka nakon prečišćavanja na DEAE koloni (1-alikvot pre HPLC-a; 2- Frakcija 20; 3- frakcija 21; 4-frakcija 24; 5-frakcija 25; 6-frakcija 37; 7-frakcija 27; 8-frakcija 31; 9-frakcija 39)

Nakon provere čistoće eksprimiranog proteina SDS elektroforezom, frakcije koje su pokazale prisustvo trake na oko 85 kDa (frakcije 21-31) su spojene i korišćene za dalja analiziranja.

Kako bismo detaljnije okarakterisali K152C mutant koji je proizveden u *P. pastoris* određivani su kinetički parametri kao što su K_m i V_{max} , pH optimum i supstratna specifičnost.

5.5.4.1. Kinetička karakterizacija K152C mutanta GOx

Prečišćene frakcije mutanta K152C glukoza-oksidade su korišćene za određivanje kinetičkih parametara odnosno K_m i k_{cat} na pH 5,5 i upoređeni sa prethodno dobijenim rezultatima za *wild type* glukoza-oksidadu eksprimiranu u *P. pastoris* (Tabela 23).

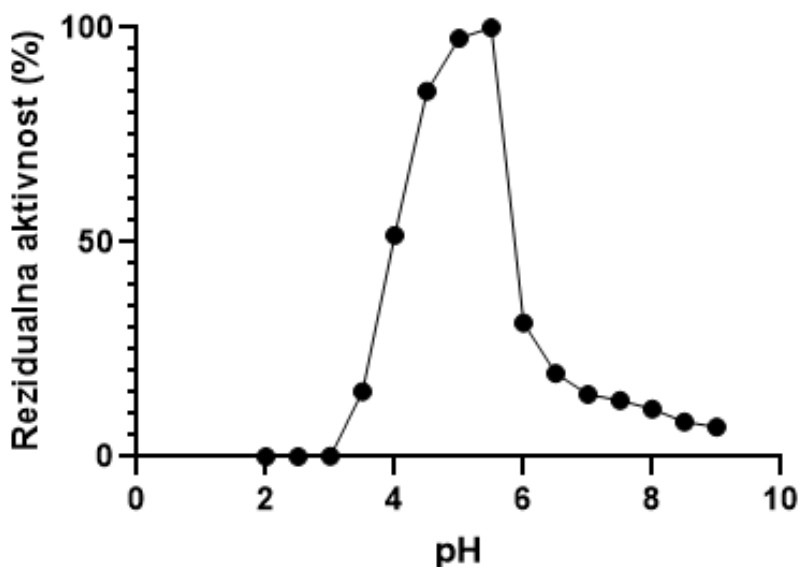
Tabela 23. Kinetičke konstante K152D mutanta glukoza-oksidade eksprimiranog u *P. pastoris* KM71H

	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Sp (U/mg)
K152C mutant glukoza-oksidade	11,5	493,0	42,9	174

Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da mutant K152C glukoza-oksidade eksprimiran u *P. pastoris* pokazuje oko šest puta veću konstantu specifičnosti (k_{cat}/K_m) nego *wild type* glukoza-oksida (6,7 mM⁻¹s⁻¹) takođe eksprimiran u *P. pastoris*. [141]

5.5.4.2. Određivanje pH optimuma K152C mutanta GOx

pH optimum je određivan u opsegu pufera od 2 do 9. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je optimalan pH za merenje aktivnosti i kod ovog mutanta 5,5.



Slika 51. Aktivnost K152C glukoza- oksidaza mutanta proizvedenog u *P. pastoris* KM71H na različitim pH vrednostima

5.5.4.3. Određivanje supstratne specifičnosti K152C mutanta GOx

Za ispitivanje specifičnosti K152C mutanta glukoza-oksidade merena je njegova aktivnost sa drugim šećerima kao što su galaktoza i maltoza (Tabela 24) na pH 5,5 i pH 7,4.

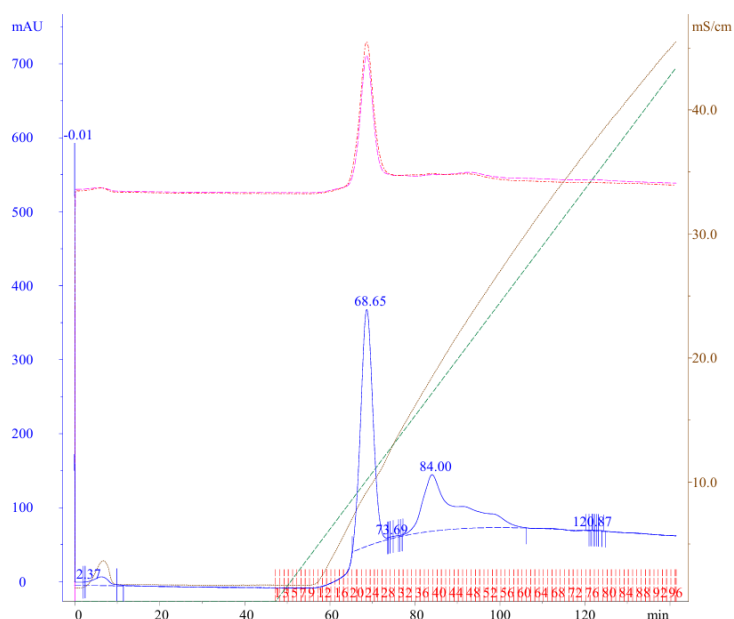
Tabela 24. Relativna aktivnost K152D mutanta glukoza-oksidaze sa različitim šećerima u poređenju sa glukozom (%) u PBS puferu pH 7,4 i natrijum acetatnom puferu pH 5,5

pH 5,5		pH 7,4	
5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)	5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)
48,84	16,87	4,31	8,32
250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)	250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)
4,66	33,27	20,04	70,82

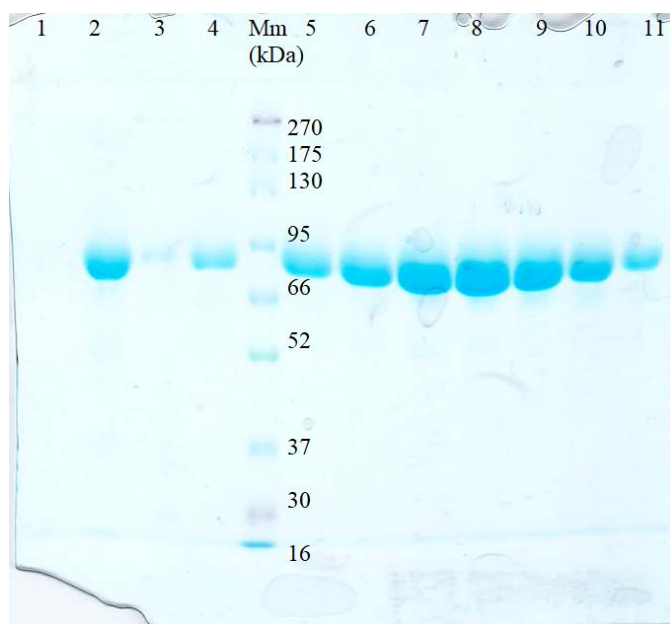
Mutant K152D je zadržao visoku specifičnost ka glukozu, ali ima značajno veću aktivnost sa galaktozom (4,31%) u odnosu na *wild type* (0,18%) na pH 7,4 za 5 mM koncentracije šećera. Aktivnost sa maltozom za *wild type* na ovoj pH vrednosti nije ranije detektovana. U slučaju 250 mM rastvora šećera, je takođe na pH 7,4 detektovana veća aktivnost sa galaktozom (20,04%) u odnosu na *wild type* (10%). [141]

5.5.5. Ekspresija i prečišćavanje D180E mutanta GOx

Ekspresija mutanta D180E je urađena na prethodno opisan način. Dobijeni protein je zatim prečišćen primenom DEAE jonoizmenjivačke hromatografije (Slika 52), a kvalitet i čistoća uzorka provereni su SDS-PAGE analizom (Slika 53).



Slika 52. Hromatogram nakon prečišćavanja D180E mutanta na DEAE koloni jonoizmenjivačkom hromatografijom (plavo-280 nm; magenta-420 nm; crveno-450 nm)



Slika 53. SDS elektroforeza uzoraka nakon prečišćavanja na DEAE koloni (1-nevezane frakcije; 2-alikvot pre HPLC-a; 3- frakcija 18; 4-frakcija 19; 5-frakcija 20; 6-frakcija 21; 7-frakcija 22; 8-frakcija 23; 9-frakcija 24;10- frakcija 25; 11- frakcija 26)

Nakon provere čistoće eksprimiranog proteina SDS elektroforezom, frakcije koje su pokazale prisustvo trake na oko 85 kDa (frakcije 18-26) su spojene i korišćene za dalja istraživanja.

U cilju detaljnije karakterizacije D180E mutanta proizvedenog u *P. pastoris*, određeni su ključni kinetički parametri kao što su K_m i V_{max} , optimalna pH vrednost, kao i specifičnost prema različitim šećerima.

5.5.5.1. Kinetička karakterizacija D180E mutanta GOx

Prečišćene frakcije mutanta D180E glukoza-oksidade korišćene su za određivanje kinetičkih parametara, odnosno K_m i k_{cat} , pri pH 5,5, nakon čega su dobijeni rezultati upoređeni sa prethodno određenim vrednostima za *wild type* glukoza-oksidadu eksprimiranu u *P. pastoris* (Tabela 25).

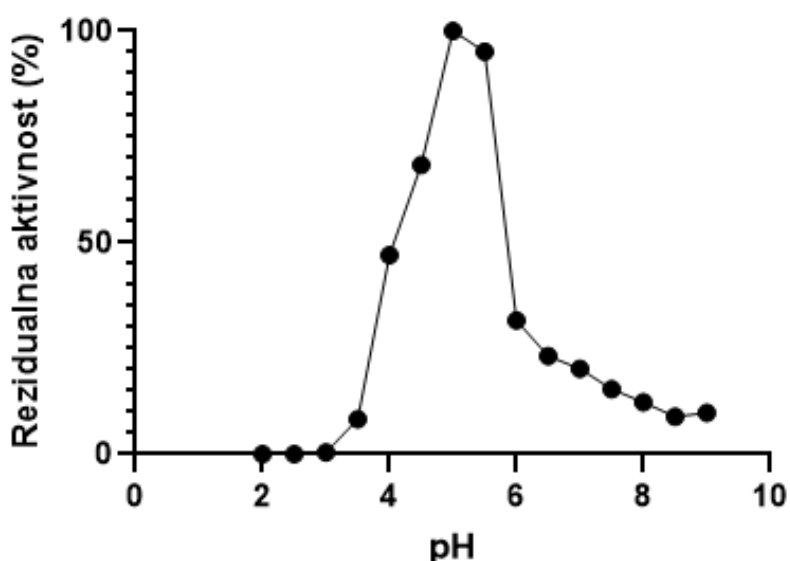
Tabela 25. Kinetičke konstante D180E mutanta glukoza-oksidade eksprimiranog u *P. pastoris* KM71H

	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)	Sp (U/mg)
D180E mutant glukoza-oksidade	32,7	623,3	19,06	220

Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da mutant D180E glukoza-oksidade eksprimiran u *P. pastoris* pokazuje oko tri puta veću konstantu specifičnosti (k_{cat}/K_m) nego *wild type* glukoza-oksidaza ($6,7 mM^{-1}s^{-1}$) takođe eksprimiran u *P. pastoris*. [141]

5.5.5.2. Određivanje pH optimuma D180E mutanta GOx

pH optimum je određivan u opsegu pH od 2 do 9. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da optimalna pH vrednost za merenje aktivnosti ovog mutanta iznosi 5.



Slika 54. Aktivnost D180E glukoza- oksidaza mutanta proizvedenog u *P. pastoris* KM71H na različitim pH vrednostima

5.5.5.3. Određivanje supstratne specifičnosti D180E mutanta GOx

Za ispitivanje specifičnosti D180E mutanta glukoza-oksidade merena je njegova aktivnost sa drugim šećerima kao što su galaktoza i maltoza (Tabela 26) na pH 5,5 i pH 7,4.

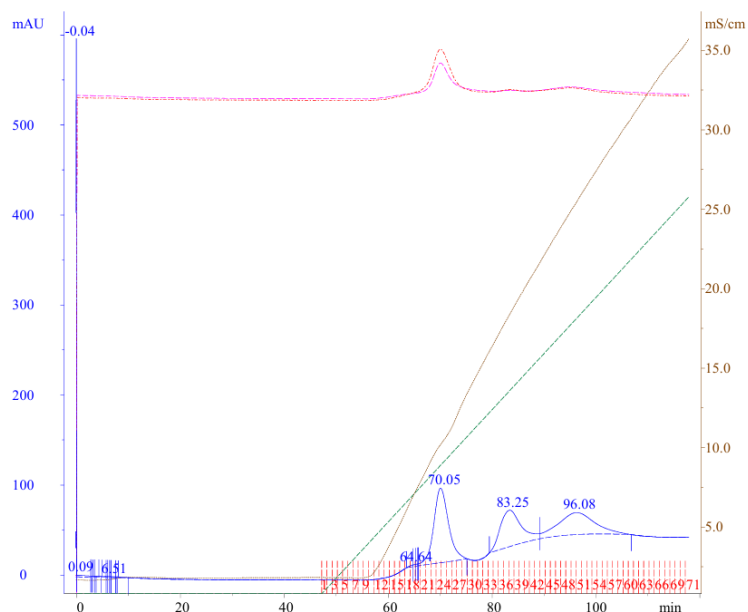
Tabela 26. Relativna aktivnost D180E mutanta glukoza-oksidade sa različitim šećerima u poređenju sa glukozom (%) u PBS puferu pH 7,4 i natrijum acetatnom puferu pH 5,5

pH 5,5		pH 7,4	
5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)	5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)
10,93	18,05	1,53	6,12
250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)	250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)
2,76	9,13	17,40	68,10

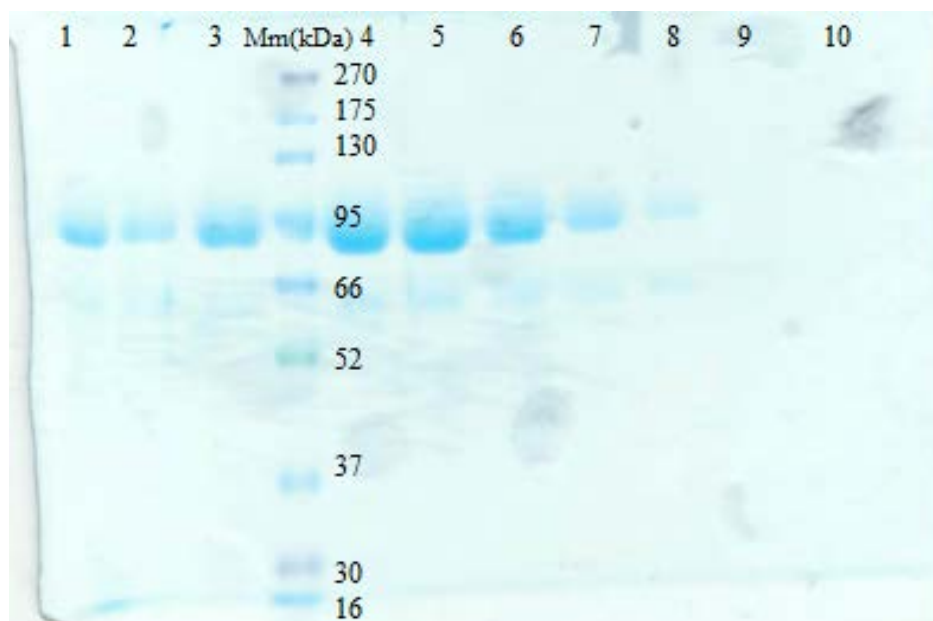
Mutant D180E je zadržao visoku specifičnost ka glukozu, ali ima veću aktivnost sa galaktozom (1,53%) u odnosu na *wild type* (0,18%) na pH 7,4 za 5 mM koncentracije šećera. Aktivnost sa maltozom za *wild type* na ovoj pH vrednosti nije ranije detektovana. U slučaju 250 mM rastvora šećera, takođe na pH 7,4 je detektovana veća aktivnost sa galaktozom (17,4%) u odnosu na *wild type* (10%). [141]

5.5.6. Ekspresija i prečišćavanje D180L mutanta GOx

Ekspresija mutanta D180L je urađena na prethodno opisan način. Dobijeni protein je zatim prečišćen primenom DEAE jonoizmenjivačke hromatografije (Slika 55), a kvalitet i čistoća uzorka provereni su SDS-PAGE analizom. (Slika 56)



Slika 55. Hromatogram nakon prečišćavanja D180L mutanta na DEAE koloni jonoizmenjivačkom hromatografijom (plavo-280 nm; magenta-420 nm; crveno-450 nm)



Slika 56. SDS elektroforeza uzoraka nakon prečišćavanja na DEAE koloni (1-alikvot pre HPLC-a; 2- Frakcija 21; 3- frakcija 22; 4-frakcija 23; 5-frakcija 24; 6-frakcija 25; 7-frakcija 26; 8-frakcija 27; 9- frakcija 37)

Nakon provere čistoće eksprimiranog proteina SDS elektroforezom, frakcije koje su pokazale prisustvo trake na oko 85 kDa (frakcije 21-27) su spojene i korišćene za dalja istraživanja.

U cilju detaljnije karakterizacije D180L mutanta proizvedenog u *P. pastoris*, određeni su ključni kinetički parametri, optimalna pH vrednost, kao i specifičnost prema različitim šećerima.

5.5.6.1. Kinetička karakterizacija D180L mutanta GOx

Prečišćene frakcije mutanta D180L glukoza-oksidade korišćene su za određivanje kinetičkih parametara, odnosno K_m i k_{cat} , na pH 5,5, nakon čega su dobijeni rezultati upoređeni sa prethodno određenim vrednostima za *wild type* glukoza-oksidadu eksprimiranu u *P. pastoris* (Tabela 27).

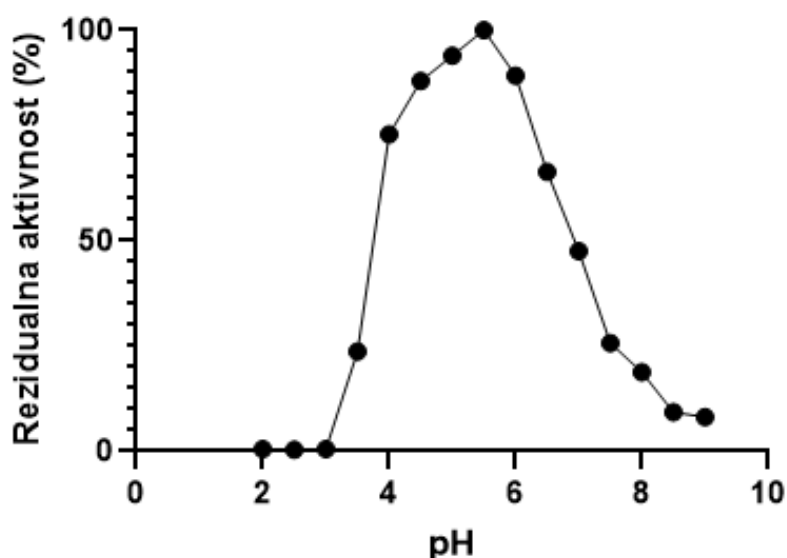
Tabela 27. Kinetičke konstante D180L mutanta glukoza-oksidade eksprimiranog u *P. pastoris* KM71H

	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Sp (U/mg)
D180L mutant glukoza-oksidade	16,9	99,99	5,92	35,30

Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da mutant D180L glukoza-oksidade eksprimiran u *P. pastoris* pokazuje manje konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) nego *wild type* glukoza-oksida (6,7 mM⁻¹s⁻¹) takođe eksprimiran u *P. pastoris*. [141]

5.5.6.2. pH optimum D180L mutanta GOx

pH optimum je određivan u opsegu pH od 2 do 9. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da optimalna pH vrednost za merenje aktivnosti ovog mutanta iznosi 5,5.



Slika 57. Aktivnost D180L glukoza- oksidaza mutanta proizvedenog u *P. pastoris* KM71H na različitim pH vrednostima

5.5.6.3. Određivanje supstratne specifičnosti D180L mutanta GOx

Za ispitivanje specifičnosti D180L mutanta glukoza-oksidade merena je njegova aktivnost sa drugim šećerima kao što su galaktoza i maltoza (Tabela 28) na pH 5,5 i pH 7,4.

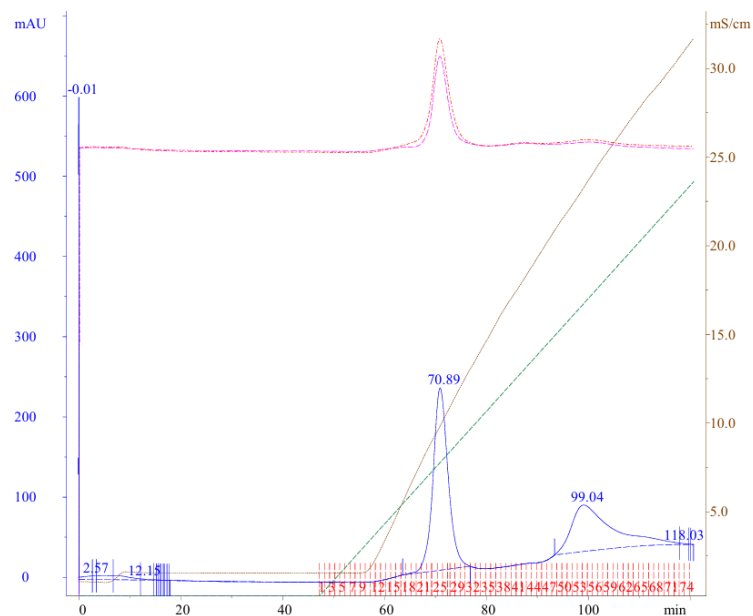
Tabela 28. Relativna aktivnost D180L mutanta glukoza-oksidade sa različitim šećerima u poređenju sa glukozom (%) u PBS puferu pH 7,4 i natrijum acetatnom puferu pH 5,5

pH 5,5		pH 7,4	
5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)	5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)
41,67	17,00	4,86	7,59
250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)	250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)
16,97	285,29	7,12	33,01

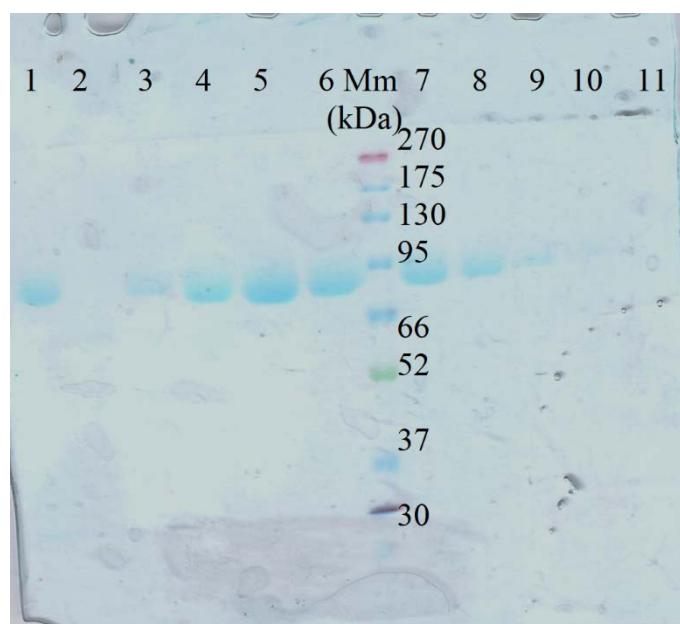
Mutant D180L je zadržao visoku specifičnost ka glukozi, ali ima mnogo veću aktivnost sa galaktozom u odnosu na *wild type* (0,18%) na pH 7,4 za 5 mM koncentracije šećera. Aktivnost sa maltozom za *wild type* na ovoj pH vrednosti nije ranije detektovana. U slučaju 250 mM rastvora šećera, takođe na pH 7,4 je detektovana manja aktivnost sa galaktozom (7,12%) u odnosu na *wild type* (10%). [141]

5.5.7. Ekspresija i prečišćavanje F484N mutanta GOx

Ekspresija mutanta F484N je urađena na prethodno opisan način. Prečišćavanje proteina izvršeno je primenom DEAE jonoizmenjivačke hromatografije (Slika 58), dok su kvalitet i stepen čistoće dobijenog uzorka potvrđeni SDS-PAGE analizom (Slika 59).



Slika 58. Hromatogram nakon prečišćavanja F484N mutanta na DEAE koloni jonoizmenjivačkom hromatografijom (plavo-280 nm; magenta-420 nm; crveno-450 nm)



Slika 59. SDS elektroforeza uzoraka nakon prečišćavanja na DEAE koloni (1-alikvot pre HPLC-a; 2- nevezane frakcije; 3-frakcija 22; 4-frakcija 24; 5-frakcija 25; 6-frakcija 26; 7-frakcija 27; 8-frakcija 28; 9- frakcija 29; 10-frakcija 30; 11-frakcija 55)

Nakon provere čistoće eksprimiranog proteina SDS-PAGE analizom, frakcije u kojima je uočena proteinska traka na približno 85 kDa (frakcije 22–30) spojene su i korišćene za dalju analizu.

5.5.7.1. Kinetička karakterizacija F484N mutanta GOx

Prečišćene frakcije mutanta F484N glukoza-oksidge korišćene su za određivanje kinetičkih parametara, odnosno K_m i k_{cat} , na pH 5,5, nakon čega su dobijeni rezultati upoređeni sa prethodno određenim vrednostima za *wild type* glukoza-oksidgeu eksprimiranu u *P. pastoris* (Tabela 29).

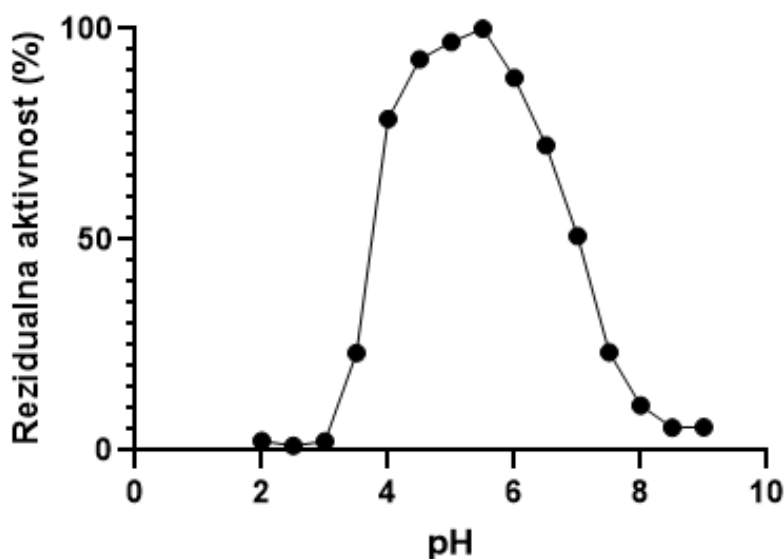
Tabela 29. Kinetičke konstante F484N mutanta glukoza-oksidge eksprimiranog u *P. pastoris* KM71H

	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Sp (U/mg)
F484N mutant glukoza-oksidge	20,61	$2,17 \times 10^{-4}$	$1,05 \times 10^{-5}$	2,22

Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da mutant F484N glukoza-oksidge eksprimiran u *P. pastoris* pokazuje mnogo manje konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) nego *wild type* glukoza-oksidgea ($6,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) takođe eksprimiran u *P. pastoris*. [141]

5.5.7.2. pH optimum F484N mutanta GOx

pH optimum je određivan u opsegu pH od 2 do 9. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da optimalna pH vrednost za merenje aktivnosti ovog mutanta iznosi 5,5.



Slika 60. Aktivnost F484N glukoza- oksidgea mutanta proizvedenog u *P. pastoris* KM71H na različitim pH vrednostima

5.5.7.3. Određivanje supstratne specifičnosti F484N mutanta GOx

Za ispitivanje specifičnosti F484N mutanta glukoza-oksidge merena je njegova aktivnost sa drugim šećerima kao što su galaktoza i maltoza (Tabela 30) na pH 5,5 i pH 7,4.

Tabela 30. Relativna aktivnost F484N mutanta glukoza-oksidade sa različitim šećerima u poređenju sa glukozom (%) u PBS puferu pH 7,4 i natrijum acetatnom puferu pH 5,5

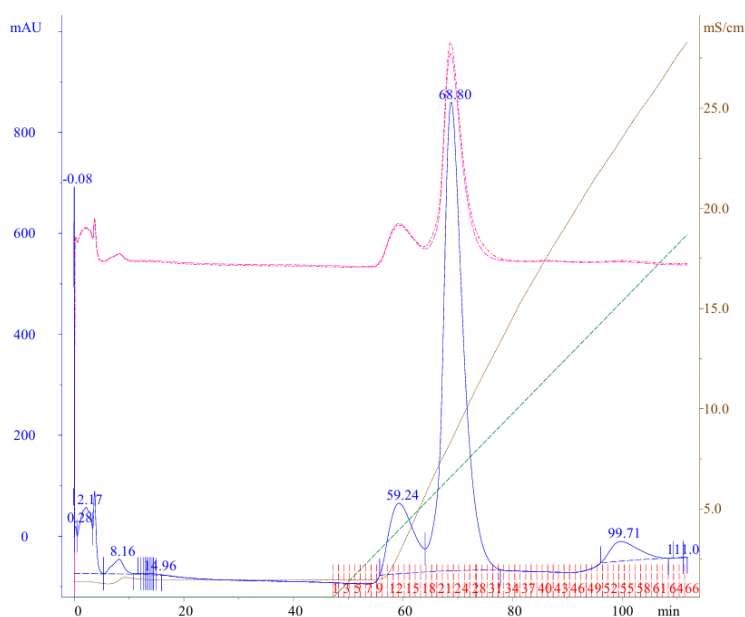
pH 5,5		pH 7,4	
5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)	5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)
7,09	22,16	n. d.	n. d.
250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)	250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)
23,06	n. d.	n. d.	n. d.

n. d. -nije detektovana aktivnost

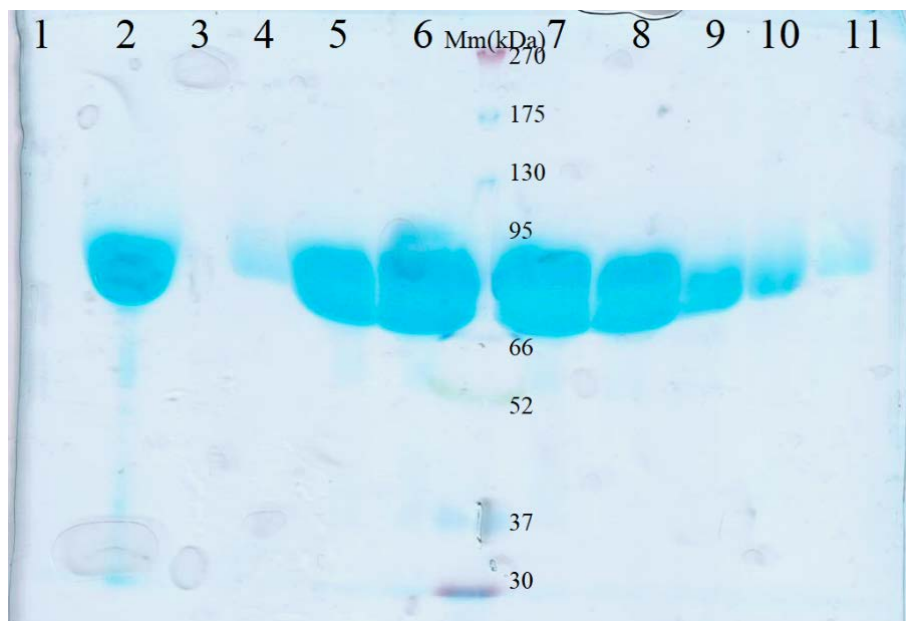
Mutant F484N je zadržao visoku specifičnost ka glukozu, ali aktivnost sa galaktozom nije detektovana na pH 7,4 za 5 mM koncentracije šećera. Aktivnost sa maltozom za *wild type* na ovoj pH vrednosti nije ranije detektovana, kao ni sada. U slučaju 250 mM rastvora šećera, takođe na pH 7,4 aktivnost sa galaktozom i maltozom nije detektovana za ovaj mutant, a ni ranije za *wild type*. [141]

5.5.8. Ekspresija i prečišćavanje F484H mutanta GOx

Ekspresija mutanta F484H je urađena na prethodno opisan način. Prečišćavanje proteina izvršeno je primenom DEAE jonoizmenjivačke hromatografije (Slika 61), dok su kvalitet i stepen čistoće dobijenog uzorka potvrđeni SDS-PAGE analizom (Slika 62).



Slika 61. Hromatogram nakon prečišćavanja F484H mutanta na DEAE koloni jonoizmenjivačkom hromatografijom (plavo-280 nm; magenta-420 nm; crveno-450 nm)



Slika 62. SDS elektroforeza uzoraka nakon prečišćavanja na DEAE koloni (1- frakcija 13; 2-alikvot pre HPLC-a; 3- nevezane frakcije; 4-frakcija 19; 5-frakcija 21; 6-frakcija 22; 7-frakcija 23; 8-frakcija 24; 9-frakcija 25; 10- frakcija 26; 11-frakcija 29)

Nakon provere čistoće eksprimiranog proteina SDS-PAGE analizom, frakcije u kojima je uočena proteinska traka na približno 85 kDa (frakcije 19–29) su spojene i korišćene za dalju analizu.

5.5.8.1. Kinetička karakterizacija F484H mutanta GOx

Prečišćene frakcije mutanta F484H glukoza-oksidade korišćene su za određivanje kinetičkih parametara, odnosno K_m i k_{cat} , na pH 5,5, nakon čega su dobijeni rezultati upoređeni sa prethodno određenim vrednostima za *wild type* glukoza-oksidadu eksprimiranu u *P. pastoris* (Tabela 31).

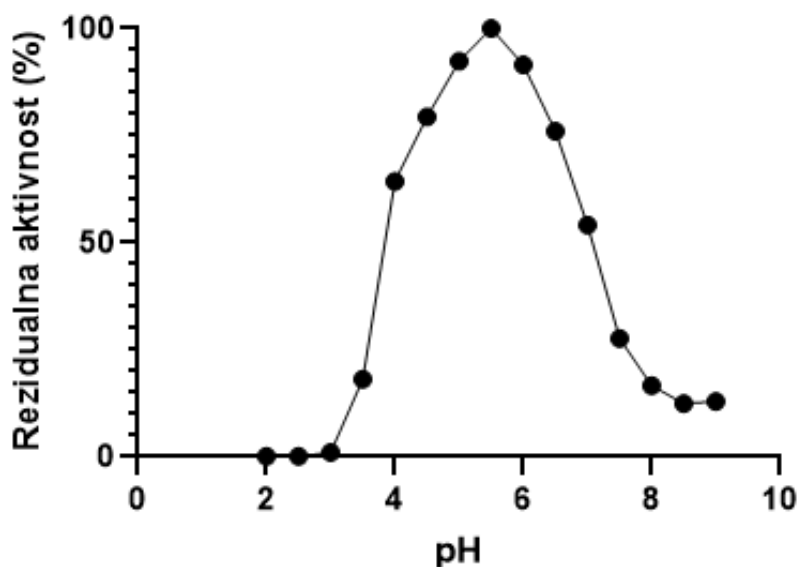
Tabela 31. Kinetičke konstante F484H mutanta glukoza-oksidade eksprimiranog u *P. pastoris* KM71H

	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)	Sp (U/mg)
F484H mutant glukoza-oksidade	21,33	18,59	0,87	6,56

Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da mutant F484H glukoza-oksidade eksprimiran u *P. pastoris* pokazuje mnogo manje konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) nego *wild type* glukoza-oksidaza ($6,7 \text{ mM}^{-1}s^{-1}$) takođe eksprimiran u *P. pastoris*. [141]

5.5.8.2. pH optimum F484H mutanta GOx

pH optimum je određivan u opsegu pH od 2 do 9. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da optimalna pH vrednost za merenje aktivnosti ovog mutanta iznosi 5,5.



Slika 63. Aktivnost F484H glukoza- oksidaza mutanta proizvedenog u *P. pastoris* KM71H na različitim pH vrednostima

5.5.8.3. Određivanje supstratne specifičnosti F484H mutanta GOx

Za ispitivanje specifičnosti F484H mutanta glukoza-oksidade merena je njegova aktivnost sa drugim šećerima kao što su galaktoza i maltoza (Tabela 32) na pH 5,5 i pH 7,4.

Tabela 32. Relativna aktivnost F484H mutanta glukoza-oksidade sa različitim šećerima u poređenju sa glukozom (%) u PBS puferu pH 7,4 i natrijum acetatnom puferu pH 5,5

pH 5,5		pH 7,4	
5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)	5 mM Gal/Glc (%)	5 mM Mal/Glc (%)
32,57	17,07	11,65	27,42
250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)	250 mM Gal/Glc (%)	250 mM Mal/Glc (%)
1,52	10,18	0,16	9,85

Mutant F484H je pokazuje specifičnost ka glukozi, ali ima značajno veću aktivnost sa galaktozom (11,65%) u odnosu na *wild type* (0,18%) na pH 7,4 za 5 mM koncentracije šećera. Aktivnost sa maltozom za *wild type* na ovoj pH vrednosti nije ranije detektovana. U slučaju 250 mM rastvora šećera, takođe na pH 7,4 je detektovana manja aktivnost sa galaktozom (0,16%) u odnosu na *wild type* (10 %). [141]

5.5.9. Uporedni pregled kinetičkih parametara za mutante GOx

U ovom poglavlju su predstavljene vrednosti kinetičkih parametara za prethodno opisane mutante glukoza-oksidadom, čije su mutacije predviđene ISM metodom (Tabela 33).

Tabela 33. Usporedni pregled kinetičkih parametara za mutante glukoza-oksidade predviđene ISM metodom

Pozicija mutacije	Mutacija	Kinetički parametri			Specifična aktivnost (U/mg)
		K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
wt	wt	28,3	189,4	6,70	69
152	Lys (K) → Asp (D)	29,2	607,15	20,79	214,29
152	Lys (K) → Cys (C)	11,5	493	42,9	174
180	Asp (D) → Glu (E)	32,7	623,33	19,06	220
180	Asp (D) → Leu (L)	16,9	99,99	5,92	35,29
484	Phe (F) → Asn (N)	20,61	$2,17 \times 10^{-4}$	$1,05 \times 10^{-5}$	2,22
484	Phe (F) → His (H)	21,33	18,59	0,87	6,56

Opisanim mutantima je takođe određena i termostabilnost inkubiranjem na 65 °C tokom jednog sata. Termostabilnost je izražena kao rezidualna aktivnost koja predstavlja odnos specifične aktivnosti biokompozita nakon inkubiranja na povišenoj temperaturi (1h, 65 °C) i specifične aktivnosti neinkubiranih enzima.

Tabela 34. Rezidualna aktivnost *wild type* i mutanata glukoza-oksidade nakon inkubiranja na 65 °C tokom 1 sata

Uzorak	Rezidualna aktivnost (%)
<i>wild type</i> GOx	0,001
(K152D) GOx	0,079
(K152C) GOx	0,870
(D180E) GOx	0,066
(D180L) GOx	0,160
(F484N) GOx	3,18
(F484H) GOx	0,168

Prema podacima iz Tabele 33 se vidi da iako imaju niske vrednosti rezidualnih aktivnosti mutanti nakon inkubiranja, ipak imaju višu termostabilnost u poređenju sa *wild type* glukoza-oksidadom, posebno F484N GOx.

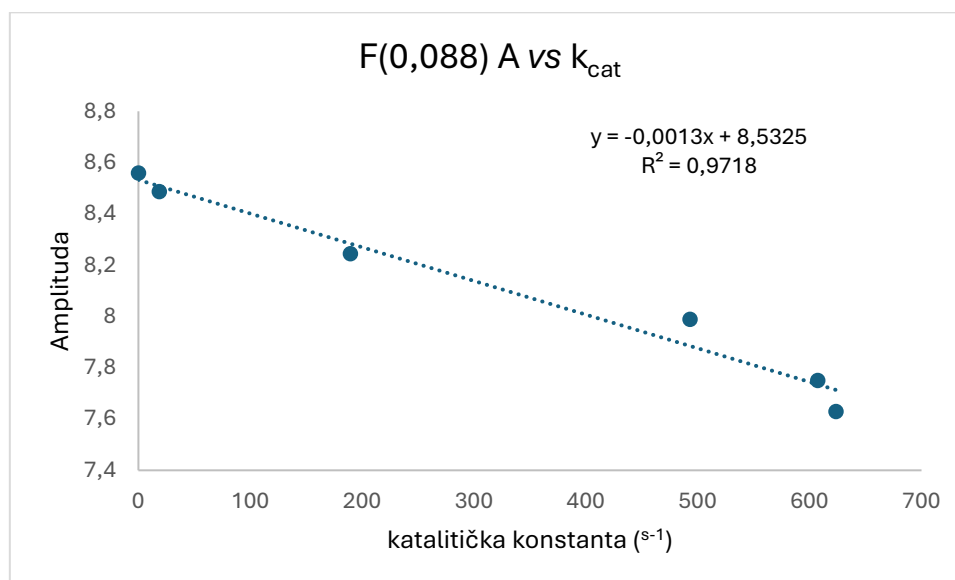
5.5.10. Korelacija kinetičkih parametara mutanata GOx sa ISM metodom

U Tabeli 34 prikazane su vrednosti kinetičkih parametara dobijenih mutanata glukoza-oksidade, kao i amplitude karakterističnih frekvencija F(0,088) i F(0,159) određene ISM metodom.

Tabela 35. Vrednosti kinetičkih parametara i amplitude frekvencija F (0,088) i F (0,159) određene ISM metodom. S/N se definiše kao odnos signal – šum tj. količnik vrednosti amplitude i šuma, gde je šum po definiciji ½ sume svih vrednosti amplitude (po svim frekvencijama u ISM spektru). Vrednost amplitude interpretira jačinu dalekosežnih interakcija, a S/N predstavlja specifičnost.

			F (0,088)		F (0,159)	
Mutant	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	A	S/N	A	S/N
WT	189,4	28,3	8,2448	8,486	7,7498	7,9185
D180L	99,99	16,9	7,6007	7,8672	6,7729	7,0104
D180E	623,33	32,7	7,6296	7,9007	6,7434	6,983
F484N	0,00021	20,6	8,5587	8,8215	5,7527	5,9293
F484H	18,59	21,3	8,4863	8,7572	5,8398	6,0262
K152C	493	11,3	7,9888	8,2083	6,3489	6,5234
K152D	607,155	29,2	7,7498	7,9185	6,5462	6,6886

Analiza dominantne funkcionalne frekvencije F(0,088) pokazala je postojanje negativne korelacije između amplitude ove frekvencije i katalitičke konstante k_{cat} . Kada su u analizu uključeni svi mutanti, dobijena je umerena korelacija ($R^2 = 0,4582$), što ukazuje na odstupanja kod pojedinih varijanti enzima. Mutant D180L posmatran je kao strukturno odstupajuća varijanta, jer zamena polarne asparaginske kiseline hidrofobnim leucinom može dovesti do narušavanja lokalne mreže vodoničnih veza. Nakon njegovog izuzimanja iz linearne korelacije, dobijena je veoma jaka zavisnost između amplitude frekvencije F(0,088) i k_{cat} vrednosti ($R^2 = 0,9718$), što je prikazano na Slici 63. Za razliku od F(0,088), frekvencija F(0,159) nije pokazala jasnu povezanost sa katalitičkom konstantom, pa je dalja interpretacija zasnovana prvenstveno na frekvenciji F(0,088).



Slika 64. Korelacija katalitičke konstante k_{cat} i amplitude frekvencije F(0,088).

Dobijeni rezultati ukazuju da povećanje katalitičke aktivnosti GOx mutanata uglavnom prati smanjenje amplitude frekvencije F(0,088), što potvrđuje povezanost ISM parametara sa

funkcionalnim osobinama enzima. Posebno se izdvajaju mutanti D180E, K152D i K152C, koji su pokazali povećane k_{cat} vrednosti u odnosu na *wild type* GOx, uz smanjenje amplitude F(0,088). Nasuprot tome, mutacije F484N i F484H dovele su do povećanja amplitude ove frekvencije i značajnog smanjenja katalitičke aktivnosti.

Među analiziranim aminokiselinskim ostacima posebno su se izdvojile pozicije Asp180, Phe484 i Lys152, koje ostvaruju različite nekovalentne interakcije i mogu značajno uticati na funkcionalne karakteristike enzima. Ostatak Asp180 učestvuje u formiranju vodoničnih veza sa Lys152. Mutant D180E pokazao je povećanu katalitičku aktivnost uz smanjenje amplitude F(0,088). Efekat je posledica velike razlike u EIIP (Asp je na samom vrhu i ima EIIP 0,1263 dok je Glu pri dnu liste i ima vrednost samo 0,0058) ove dve amino kiseline iako su strukturno slične i ne bi se očekivala ovakva razlike u aktivnosti. To je još jedan dokaz da EIIP potencijal amino kiselina ima veliki uticaj na dalekosežne interakcije enzim – supstrat, a time i na k_{cat} , dok je mutant D180L, uprkos smanjenju amplitude iste frekvencije, pokazao nižu k_{cat} vrednost u odnosu na *wild type* enzim. Ovo odstupanje ukazuje da zamena polarne aminokiseline hidrofobnim leucinom verovatno narušava lokalnu strukturu i destabilizuje funkcionalno značajan region proteina.

Phe484, koji ostvaruje π -sigma interakcije, identifikovan je kao jedan od najosetljivijih regiona proteina. Mutacije F484N i F484H dovele su do povećanja amplitude F(0,088) i značajnog smanjenja katalitičke aktivnosti, što ukazuje da aromatični karakter i volumen bočnog lanca na ovoj poziciji imaju važnu ulogu u očuvanju katalitičke funkcije GOx. U kristalnoj strukturi 1CF3, F484 je u kontaktu sa G486 i N476, gde N476 pripada susednoj petlji. Eventualno narušavanje sigma-aromatičnih interakcija bi se primetilo pri zameni sa N, ali ne toliko sa H. Čak bi sa N moglo doći do formiranja vodoničnih veza sa N476, što je i moguće i u slučaju zamene H. Sa strukturnog stanovišta, moguće je da je ovo inače labilna struktura, ali da se "zaključava" zamenom amino kiselina koje favorizuju vodonične veze, pa time i postaje rigidnija, što se odražava na prometni (*turnover*) broj. F484 je takođe na površini proteina, sa iste strane FAD-a, kao i K152.

Lys152, koji učestvuje u π -alkyl interakcijama, takođe je identifikovan kao funkcionalno značajna pozicija. Mutanti K152D i K152C pokazali su povećanu katalitičku aktivnost u odnosu na *wild type* GOx, pri čemu je kod K152D uvođenje negativnog naelektrisanja verovatno doprinelo povoljnijoj lokalnoj organizaciji i očuvanju funkcionalne konformacije enzima. K152 je u kontaktu sa D180 i D177, tako da uvođenje suprotnog naelektrisanja dovodi verovatno do destabilizacije te petlje. Zbog toga može doći do boljeg "protoka" reaktanta i proizvoda, budući da se K152, iako na površini proteina, nalazi sa strane redoks jezgra FAD-a.

Dobijeni rezultati potvrđuju da kombinacija ISM analize, strukturnih podataka i eksperimentalne kinetičke karakterizacije omogućava racionalan izbor pozicija za mutagenezu GOx. Uočena povezanost između amplitude frekvencije F(0,088) i kinetičkih parametara podržava primenu ISM metode kao alata za usmereni dizajn mutantnih varijanti glukoza-oksidade sa unapređenim katalitičkim osobinama.

5.5.11. Imobilizacija mutanata glukoza-oksidade u ZIF-8 metodom biomimetičke mineralizacije

Nakon što su eksprimirani i prečišćeni, mutanti glukoza-oksidade su liofilizovani. Kako bi se poboljšala njihova stabilnost na povišenim temperaturama, mutanti su imobilizovani u ZIF-8 metodom biomimetičke biomineralizacije. Vodeni rastvor mutanata glukoza-oksidade kao i *wild type* glukoza-oksida su homogenizovani sa rastvorom cink acetata dihidrata tokom 1 minuta. Nakon toga je suspenziji dodat rastvor 2-metil imidazola i reakciona smeša je homogenizovana tokom 30

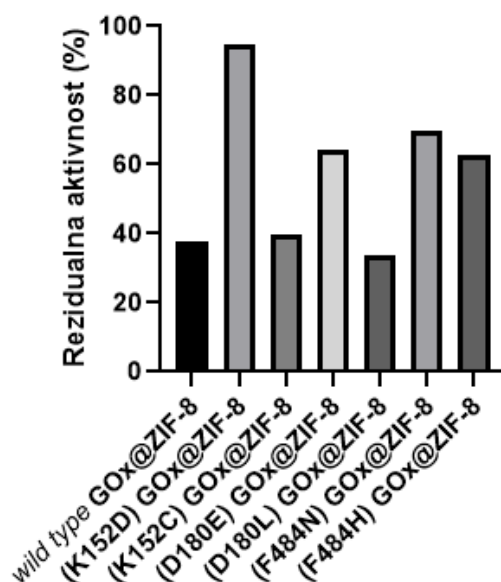
minuta, a zatim su ostavljene na sobnoj temperaturi tokom 12 sati kako bi sazeo talog. Finalne koncentracije rastvora enzima, cink acetata dihidrata su bile 0,35 mg/ml, odnosno 20 mM, dok je odnos cink acetate dihidrata i 2-metilimidazola u reakcionoj smeši bio 1:50. Po isteku 12 sati, suspenziju su centrifugirane, a talog dodatno ispran destilovanom vodom tri puta. Nakon toga je izmerena specifična aktivnost biokompozita, po suvoj masi. Osim toga, uzorci su inkubirani tokom 1 sata na 65 °C, kako bi se ispitala njihova termostabilnost.

Tabela 36. Specifična aktivnost različitih biokompozita ispranih vodom

Biokompozit	Specifična aktivnost biokompozita (U/g)
<i>wild type</i> GOx@ZIF-8	24,66±0,22
(K152D) GOx@ZIF-8	158,23±7,78
(K152C) GOx@ZIF-8	62,92±1,01
(D180E) GOx@ZIF-8	50,07±1,31
(D180L) GOx@ZIF-8	9,13±0,20
(F484N) GOx@ZIF-8	41,61±0,44
(F484H) GOx@ZIF-8	85,00±0,84

Kako se iz rezultata (Tabela 36) može jasno videti svi biokompoziti nakon ispiranja vodom pokazuju veću aktivnost od *wild type* glukoza-oksidge imobilizovane u ZIF-8, osim mutanta D180L, što se može objasniti boljom interakcijom mutiranih enzima sa ZIF-8 kao nosačem, čime je omogućena bolja enkapsulacija enzima, a time i formiranje stabilnijih biokompozita, kao i većom specifičnom aktivnošću enkapsuliranog enzima.

Termostabilnost biokompozita je izražena kao rezidualna aktivnost koja predstavlja odnos specifične aktivnosti biokompozita nakon inkubiranja na 65 °C tokom 1 sata i specifične aktivnosti biokompozita pre inkubiranja (Slika 64).



Slika 65. Grafik termostabilnosti biokompozita, izražene kao rezidualna aktivnost, nakon ispiranja vodom

Sa prikazanog grafika (Slika 65) se može zaključiti da imobilizovani biokompoziti pokazuju veću termostabilnost u odnosu na *wild type* imobilizovan u ZIF-8, osim mutanta D180L, koji je takođe pokazao i manju specifičnu aktivnost. Ovakvi rezultati pokazuju da pojedinačne mutacije mogu u velikoj meri uticati na stabilnost biokompozita, odnosno sintezu biokompozita koji su otporniji na povišene temperature. Takođe u poređenju sa podacima iz Tabele 36 se jasno vidi da imobilizovani enzimi pokazuju desetinu puta veću termostabilnost u odnosu na neimobilizovane enzime.

5.6. Ekspresija i karakterizacija *wild type* i mutanata peroksidaze iz rena

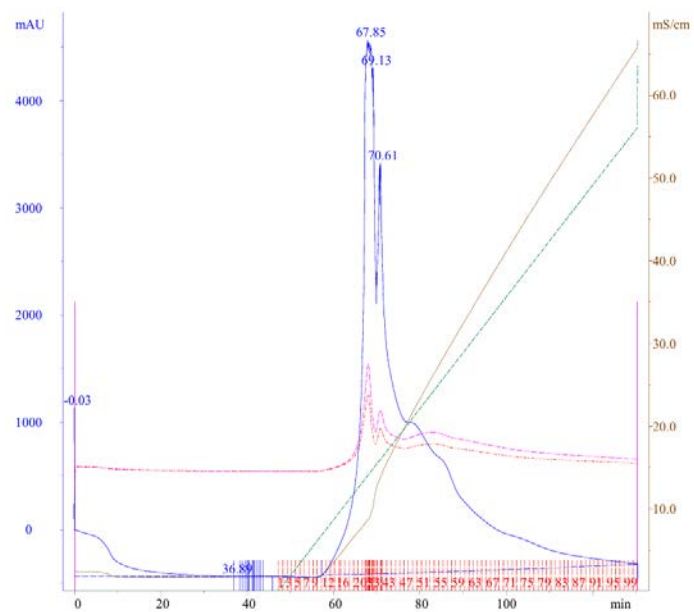
U drugom delu istraživanja gde je korišćen proteinski inženjering dobijeni su mutanti HRP, i njihovi biokompoziti u ZIF-8 i kinetički okarakterisani.

Mutacije I297T i R302I odabrane su na osnovu prethodne ISM analize HRP sekvence, kojom su identifikovane pozicije koje mogu doprineti promeni funkcionalno relevantnih frekvencija i potencijalno uticati na katalitičku aktivnost i stabilnost enzima. U ovoj disertaciji korišćeni su prethodno konstruisani plazmidi koji nose gene za *wild type* HRP i navedene mutantne varijante, a eksperimenti su bili usmereni na njihovu ekspresiju, prečišćavanje, kinetičku karakterizaciju i imobilizaciju u ZIF-8.

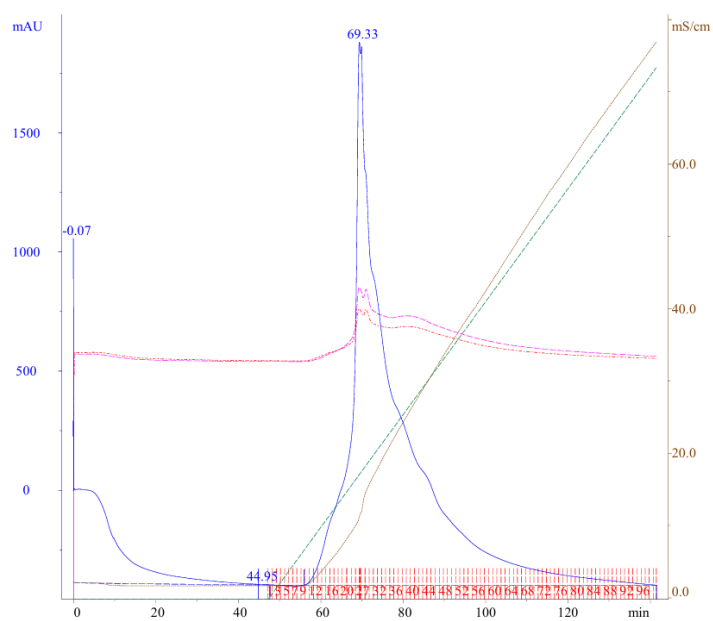
Elektrokompetentne ćelije *P. pastoris* KM71H su transformisane odgovarajućim plazmidima za *wild type* i mutante peroksidaze iz rena i uskladišteni u glicerolskim štokovima. Pozicije mutacija su predviđene ISM metodom i uvedene su na poziciji 297 gde je aminokiselina izoleucin zamenjena aminokiselinom treonin (mutant I297T) i na poziciji 302 gde je aminokiselina arginin zamenjena aminokiselinom leucin (mutant R302I). [142, 143]

Transformisane ćelije *P. pastoris* KM71H su gajene u tečnom kompleksnom medijumu tokom 48 sati dok optička gustina ćelija merena na 600 nm nije dostigla 5-6. Nakon toga, prekonoćne kulture su centrifugirane na 3000 rpm tokom 20 minuta, a potom su ćelije resuspendovane u deset puta manjoj zapremini tečne kompleksne podloge za ekspresiju proteina. Za indukciju ekspresije proteina, koja je trajala pet dana, je korišćen 0,5% metanol. Oko četiri sata po dodatku metanola je dodavan hemin, tako da finalna koncentracija u ćelijskoj suspenziji bude 3 mM. Redosled dodavanja je bio ovakav kako bi se najpre metanolom obezbedila ekspresija proteina, a nakon četiri sata po dodatku hema formirao funkcionalan protein, sa hemom kao prostetičnom grupom.

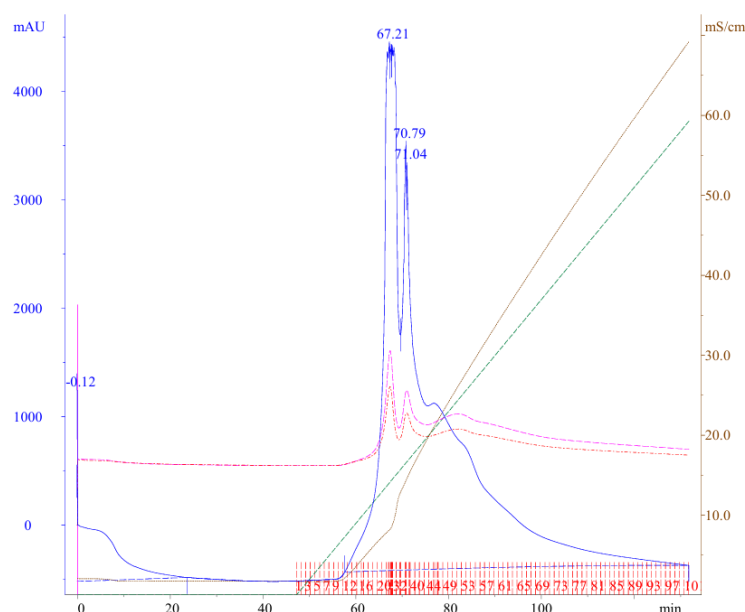
Po isteku pet dana, ćelijska suspenzija je centrifugirana, ćelije su odbačene a supernatant skoncentrovan i postavljen na dijalizu naspram 5 mM Na₂HPO₄ pufera pH 7,4 tokom noći na 4 °C. Nakon toga su *wild type* i mutanti I297T i R302 prečišćeni jonoizmenjivačkom hromatografijom na DEAE koloni (Slike 66, 67 i 68). Kao ekvilibracioni pufer je korišćen 10 mM Na₂HPO₄ pufer pH 7,4, a kao elucioni 10 mM Na₂HPO₄ pufer pH 7,4 sa 1 M NaCl.



Slika 66. Hromatogram nakon prečišćavanja *wild type* HRP na DEAE koloni (plavo-280 nm; magenta-420 nm; plavo-450 nm)

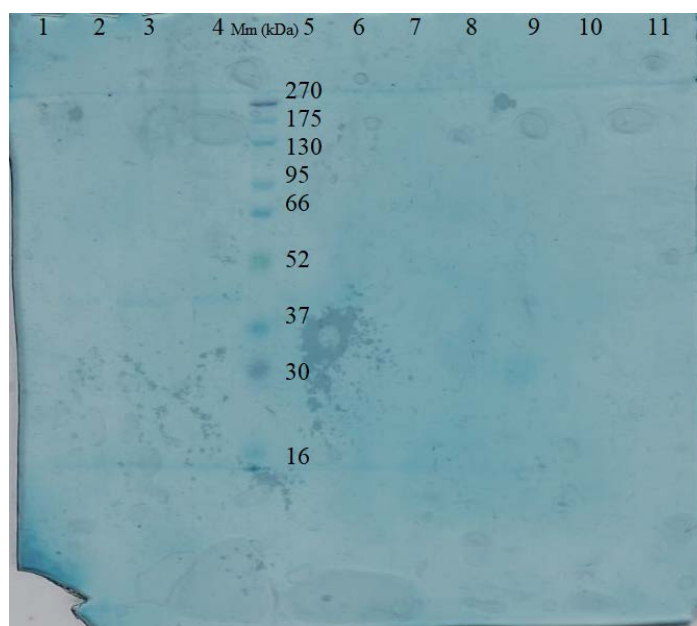


Slika 67. Hromatogram nakon prečišćavanja I297T HRP mutanta na DEAE koloni (plavo-280 nm; magenta-420 nm; plavo-450 nm)



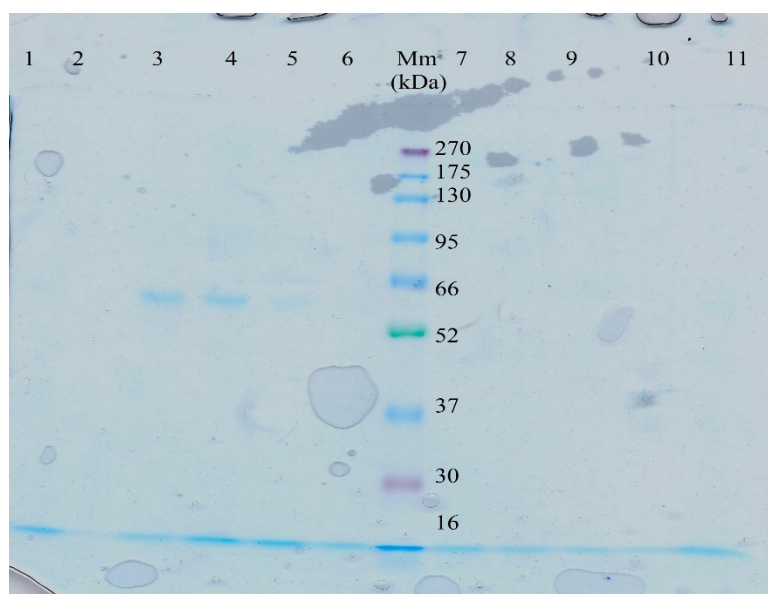
Slika 68. Hromatogram nakon prečišćavanja R302I HRP mutanta na DEAE koloni (plavo-280 nm; magenta-420 nm; plavo-450 nm)

Nakon prečišćavanja frakcije su analizirane SDS elektroforezom (Slike 69, 70 i 71).



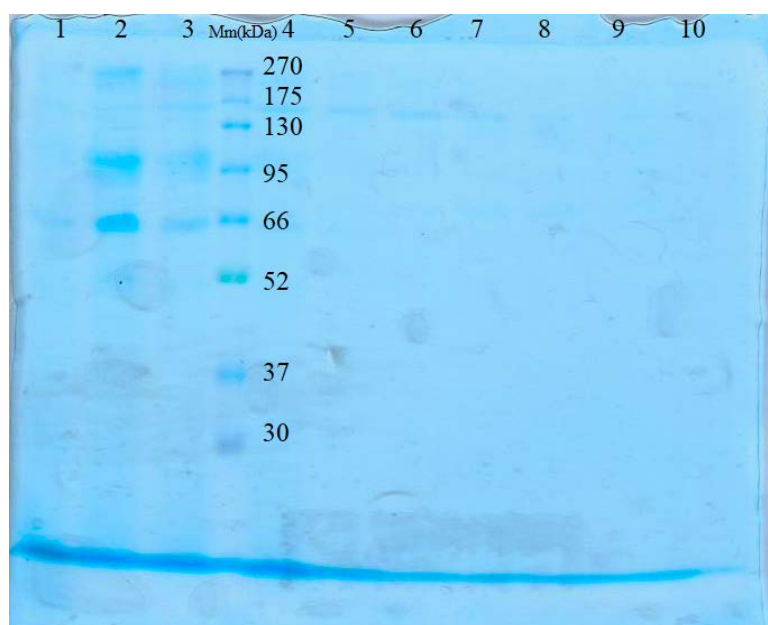
Slika 69. SDS elektroforeza nakon prečišćavanja *wild type* HRP-a na DEAE koloni (1-nevezane frakcije; 2-frakcija 23; 3-frakcija 25; 4-frakcija 26; 5-frakcija 27; 6-frakcija 28; 7-frakcija 29; 8- frakcija 30; 9- frakcija 31; 10- frakcija 32; 11- frakcija 33)

Prisustvo karakterističnih proteinskih traka na ~50 kDa i najveće enzimске aktivnosti u frakcijama broj 23, 24 i 25 ukazuje na to da je *wild type* peroksidaza iz rena uspešno eksprimirana i prečišćena. Za dalja analiziranja su korišćene samo ove frakcije.



Slika 70. SDS elektroforeza nakon prečišćavanja I297T mutanta HRPa na DEAE koloni (1-uzorak pre HPLC-a; 2-nevezane frakcije; 3-frakcija 22; 4-frakcija 23; 5-frakcija 26; 6-frakcija 27; 7-frakcija 28; 8- frakcija 29; 9- frakcija 30; 10- frakcija 31; 11-ostatak nakon nanošenja proteina na kolonu)

U frakcijama 22 i 23 se uočava prisustvo proteinske trake na ~ 60 kDa, sa najvećom enzimskom aktivnošću pa su za dalju karakterizaciju mutanta I297T HRP i eksperimente korišćene samo ove frakcije.



Slika 71. SDS elektroforeza nakon prečišćavanja R302I mutanta HRPa na DEAE koloni (1-frakcija 20; 2-frakcija 21; 3-frakcija 23; 4-frakcija 25; 5-frakcija 26; 6-frakcija 27; 7-frakcija 29; 8- frakcija 31; 9- frakcija 32; 10- frakcija 33)

U frakcijama 20, 21 i 23 se uočava prisustvo proteinske trake na ~ 60 kDa, sa najvećom enzimskom aktivnošću, pa su za dalju karakterizaciju mutanta R302I HRP i eksperimente korišćene samo ove frakcije.

Prečišćene varijante peroksidaze iz rena (*wild type*, I297T i R302I mutanti) su dalje okarakterisani određivanjem K_m i V_{max} , kao i pH optimuma.

5.6.1. Kinetička karakterizacija mutanata HRP

Kinetički parametri (K_m i k_{cat}) mutanata I297T i R302I, kao *wild type* peroksidaze iz rena su određivani na pH 4,5, a kao substrat je korišćen ABTS u pet različitih koncentracija: 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM i 4 mM. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 37.

Tabela 37. Kinetički parametri prečišćenih *wild type* i mutanata HRP na pH 4,5

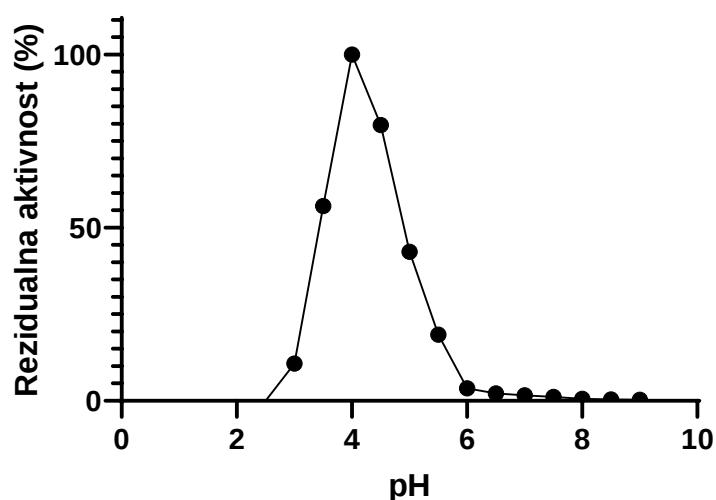
HRP varijanta	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Specifična aktivnost (U/mg)
<i>wild type</i>	0,13	0,006	0,046	0,008
I297T	0,43	0,131	0,30	0,175
R302I	0,51	0,021	0,04	0,028

Na osnovu prikazanih rezultata može se uočiti da oba mutanta imaju povećane vrednosti K_m u odnosu na *wild type* enzim, što ukazuje na smanjen prividni afinitet prema ABTS-u. Međutim, mutant I297T pokazuje izrazito povećanje k_{cat} vrednosti, sa 0,006 s⁻¹ kod *wild type* enzima na 0,131 s⁻¹, što rezultuje približno 6,5 puta većom katalitičkom efikasnošću izraženom kao k_{cat}/K_m . Ovo povećanje je u skladu i sa znatno višom specifičnom aktivnošću I297T mutanta. Sa druge strane, mutant R302I, iako pokazuje povećanje k_{cat} i specifične aktivnosti u odnosu na *wild type*, ima i povećan K_m , zbog čega njegova katalitička efikasnost ostaje približno na nivou *wild type* enzima.

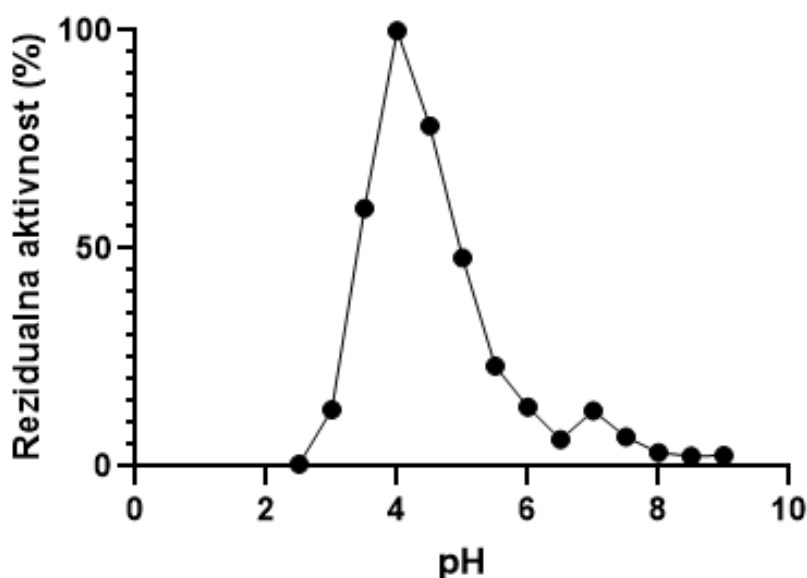
Treba imati u vidu da su prinosi prečišćenih enzima bili relativno niski, i u ovoj tezi, i u tezama istraživača naše laboratorije koji su prethodno napravili mutante gena za HRP. što može uticati na preciznost određivanja specifične aktivnosti. Pored toga, kod rekombinantne HRP moguća je heterogenost usled različitog stepena glikozilacije, što može dovesti do promena u prividnoj molekulskoj masi enzima, ali i uticati na njegovu stabilnost i katalitička svojstva. Zbog toga se razlike u specifičnoj aktivnosti između varijanti moraju tumačiti oprezno. Za pouzdanije poređenje mutanata i *wild type* enzima neophodno je obezbediti veće prinose rekombinantnih proteina, što bi se moglo postići selekcijom transformanata *Pichia pastoris* sa većim brojem kopija gena ili optimizacijom alternativnih ekspresionih sistema. Ipak svi rezultati u ovoj tezi i prethodnim našim istraživanjima ukazuju na veću specifičnu aktivnost dobijenih mutanata u odnosu na *wild type* HRP.

5.6.2. Određivanje pH optimuma mutanata HRP

pH optimum je određivan u različitim puferima u opsegu pH vrednosti od 2-9 (Slika 72 i 73).



Slika 72. Aktivnost I297T HRP mutanta proizvedenim u *P. pastoris* KM71H na različitim pH vrednostima



Slika 73. Aktivnost R302I HRP mutanta proizvedenim u *P. pastoris* KM71H na različitim pH vrednostima

Na osnovu rezultata se može zaključiti da je pH optimum uglavnom ostao nepromenjen i za oba mutanta je pH 4 u odnosu na *wild type*, čiji je pH optimum na 4,5.

5.6.3. Imobilizacija *wild type* i mutanata HRP u ZIF-8

Nakon što su eksprimirani i prečišćeni *wild type* i mutanti peroksidaze iz rena su imobilizovani u ZIF-8 metodom biomimetičke biomineralizacije. Rastvor mutanata i *wild type* peroksidaze su homogenizovani sa rastvorom cink acetata dihidrata tokom 1 minuta. Nakon toga je suspenziji dodat rastvor 2-metil imidazola i reakciona smeša je homogenizovana tokom 30 minuta, a zatim su ostavljene na sobnoj temperaturi tokom 1 sata kako bi sazreo talog. Finalne koncentracije rastvora enzima i cink acetata dihidrata su bile 0,5 mg/ml, odnosno 20 mM, dok je odnos cink acetata dihidrata

i 2-metilimidazola u reakcionoj smeši bio 1:50. Po isteku jednog sata, suspenzije su centrifugirane, a talog dodatno ispran destilovanom vodom tri puta. Nakon toga je izmerena specifična aktivnost biokompozita, po suvoj masi.

Tabela 38. Specifična aktivnost različitih biokompozita ispranih vodom

Biokompozit	Specifična aktivnost biokompozita (U/g)
<i>wild type</i> HRP@ZIF-8	7,67146E-04±6,15535E-05
(I297T) HRP@ZIF-8	7,48571 E-04±8,41459E-05
(R302I) HRP@ZIF-8	1,015142 E-03±4,08526E-05

Podaci iz tabele 38 pokazuju određene razlike u zavisnosti od enzima enkapsuliranog u ZIF-8. U slučaju imobilizacije *wild type* i I297T HRP se dobijaju slične vrednosti specifične aktivnosti, što ukazuje da ova mutacija nema značajan uticaj na katalitičku aktivnost imobilizovanog enzima.

Međutim, u slučaju R302I HRP mutanta se dobijaju više vrednosti za specifičnu aktivnost što se može objasniti činjenicom da zamena arginina izoleucinom dovodi do promena u lokalnoj strukturi enzima, a samim tim i drugačijim interakcijama sa nosačem, pri čemu nastaju stabilniji i aktivniji biokompoziti.

Osim određivanja specifičnih aktivnosti, sintetisanim biokompozita je određena i termostabilnost koja je izražena kao rezidualna aktivnost, koja predstavlja odnos specifičnih aktivnosti biokompozita nakon inkubiranja 1 h na 60 °C i specifične aktivnosti biokompozita koji nisu inkubirani (Tabela 39).

Tabela 39. Termostabilnost različitih biokompozita, nakon inkubiranja 1h na 60 °C

Biokompozit	Termostabilnost (%)
<i>wild type</i> HRP@ZIF-8	99,04±37,51
(I297T) HRP@ZIF-8	124,76±29,56
(R302I) HRP@ZIF-8	206,72±37,24

Iz prikazanih rezultata u Tabeli 38 se može zaključiti da je enkapsulacija enzima u ZIF-8 bila uspešna, budući da su biokompoziti u velikoj meri zadržali svoju aktivnost i nakon inkubiranja na povišenoj temperaturi. Osim toga, više vrednosti termostabilnosti za biokompozite koje imaju enkapsuliran mutirani enzim ukazuju na bolje interakcije enzima sa nosačem, a samim tim i uspešniju biomineralizaciju.

5.7. Imobilizacija HRP u hibridnim biokompozitima u ZIF-8 i alginatu

U poslednjem delu istraživanja nam je cilj bio da ispitamo na primeru HRP da li se dobijeni biokompoziti enzima u ZIF-8 mogu učini upotrebljivijim u realnim biokatalitičkim sistemima, dodatnom imobilizacijom u alginatnim mikrokuglicama, kako bi se olakšalo njihovo uklanjanje iz reakcione smese i ponovna upotreba.

U tu svrhu je optimizovana koncentracija enzima u ZIF-8, kao i koncentracija HRP@ZIF-8 biokompozita u 2% alginatnim kuglicama kako bi se dobio što efikasniji hibridni biokompozit (HRP@ZIF-8@Alginat) pogodan za uklanjanje fenola.

5.7.1. Optimizacija koncentracije HRP u HRP@ZIF-8 biokompozitima

Nakon biomimetičke mineralizacije HRP u ZIF-8 dobijeni su biokompoziti različitih koncentracija enzima. Masa dobijenih taloga povećavala se sa povećanjem početne koncentracije HRP i iznosila je 41,1 mg, 48,3 mg i 53 mg za uzorke sintetisane sa 0,05; 0,1 i 0,33 mg/mL HRP, respektivno.

Tabela 40. Dobijene mase i koncentracije biokompozita

	0,05 mg/mL HRP@ZIF-8	0,1 mg/mL HRP@ZIF-8	0,33 mg/mL HRP@ZIF-8
Masa	41,1 mg	48,3 mg	53 mg

Nakon resuspenzije u 1 mL vode dobijene su suspenzije koncentracija 41,1; 48,3 i 53 mg/mL.

Spektrofotometrijskim određivanjem aktivnosti pokazano je da povećanje početne koncentracije HRP dovodi do povećanja aktivnosti imobilizovanog enzima. Najveća specifična aktivnost zabeležena je kod uzorka sintetisanog sa 0,33 mg/mL HRP i iznosila je približno 26 U/g biokompozita, dok su uzorci sa nižim koncentracijama HRP pokazivali značajno niže aktivnosti (~6–7 U/g).

Analizom supernatanta nakon sinteze određena je nevezana enzimska aktivnost. Uočeno je da procenat nevezane aktivnosti opada sa povećanjem početne koncentracije enzima. Kod uzorka sintetisanog sa 0,33 mg/mL HRP procenat nevezane aktivnosti bio je veoma nizak (<1%), što ukazuje na visoku efikasnost enkapsulacije enzima u ZIF-8 strukturu. Nasuprot tome, kod uzoraka sa nižom koncentracijom enzima registrovan je značajno veći procenat nevezane aktivnosti.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da povećanje koncentracije HRP tokom biomimetičke mineralizacije dovodi do efikasnijeg ugrađivanja enzima u ZIF-8 strukturu i povećanja specifične aktivnosti biokompozita.

5.7.2. Optimizacija koncentracije HRP@ZIF-8 u alginatnim mikrokuglicama

HRP@ZIF-8 biokompoziti dalje su enkapsulirani u alginatne mikro-kuglice radi dobijanja stabilnijeg hidrogelnog sistema pogodnog za praktičnu primenu i višekratnu upotrebu. Formirane kuglice bile su približno sfernog oblika i prečnika oko 2 mm.

Tabela 41. Koncentracije suspenzije, alginata i njihov odnos u biokompozitnim kuglicama

Koncentracija HRP pri biomineralizaciji	0,05 mg/mL	0,1 mg/mL	0,33 mg/mL
Koncentracija ZIF-8@HRP	41,1 mg/mL	48,3 mg/mL	53 mg/mL
Koncentracija ALG	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL
Odnos vlažnog ZIF-8@HRP prema suvom ALG	41,1 mg/mL : 20 mg/mL = 1:2	48,3 mg/mL : 20 mg/mL = 1:2	53 mg/mL : 20 mg/mL = 1 :2
Specifična aktivnost HRP@ZIF-8@ALG	1,23 U/g	4,6 U/g	10,6 U/g

Aktivnost HRP@ZIF-8@ALG biokompozita određivana je korišćenjem ABTS/H₂O₂ sistema. Dobijeni rezultati pokazali su da aktivnost hidrogelnih kuglica raste sa povećanjem koncentracije HRP u početnom HRP@ZIF-8 biokompozitu. Najveća aktivnost zabeležena je kod uzorka sintetisanog sa 0,33 mg/mL HRP, pri čemu je specifična aktivnost iznosila približno 10,6 U/g biokompozita.

Na osnovu ovih rezultata odabran je uzorak sa 0,33 mg/mL HRP za dalju optimizaciju odnosa HRP@ZIF-8 i alginata. Promenom zapremine vode tokom resuspenzije dobijene su suspenzije koncentracija 57,6 mg/mL i 15,4 mg/mL, koje su potom korišćene za sintezu mikro-kuglica.

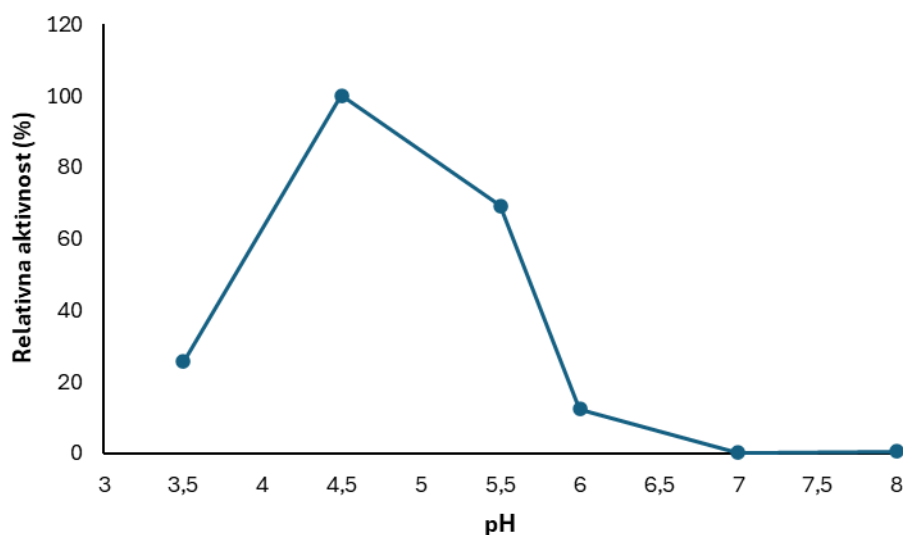
Oba uzorka pokazala su visoku aktivnost u ABTS testu. Specifična aktivnost kuglica sintetisanih iz koncentrovanije suspenzije (57,6 mg/mL) iznosila je približno 7,9 U/g biokompozita, dok je kod uzorka koncentracije 15,4 mg/mL iznosila oko 7,2 U/mg. To je ukazivalo na to da je enzim difuziono ograničen u alginatu i da je maksimalna specifična aktivnost hibridnog biokompozita dobijena već pri koncentraciji HR@ZIF-8 biokompozita od 15,4 mg/mL (odnos 1:1 vlažnog biokompozita prema suvom alginatu)

Dobijeni rezultati ukazuju da enkapsulacija HRP@ZIF-8 biokompozita u alginatni hidrogel omogućava očuvanje enzimske aktivnosti uz dodatnu mehaničku stabilizaciju sistema. Takođe, povećanje koncentracije HRP@ZIF-8 u alginatnoj matrici dovodi do povećanja ukupne aktivnosti hidrogelnog biokompozita, što ukazuje na uspešnu integraciju MOF-biokompozita u hidrogelnu mrežu.

5.7.1. Karakterizacija hibridnih HRP@ZIF-8@ALG biokompozita

5.7.1.1. Određivanje pH optimuma hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG

U cilju ispitivanja stabilnosti i katalitičkih performansi sintetisanog hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG, praćena je kinetika oksidacije ABTS supstrata u prisustvu vodonik peroksida u širokom opsegu pH vrednosti (od 3,5 do 9,0). Reakcija je praćena in situ tokom 20 minuta merenjem promene apsorbancije na 420 nm, pri čemu je brzina reakcije korigovana u odnosu na tačnu masu primenjenih biokompozitnih kuglica u svakom pojedinačnom puferskom sistemu. Dobijene kinetičke krive zavisnosti apsorbancije od vremena, kao i rezultujući profil pH optimuma hibridnog biokompozita, prikazani su na Slici 73.

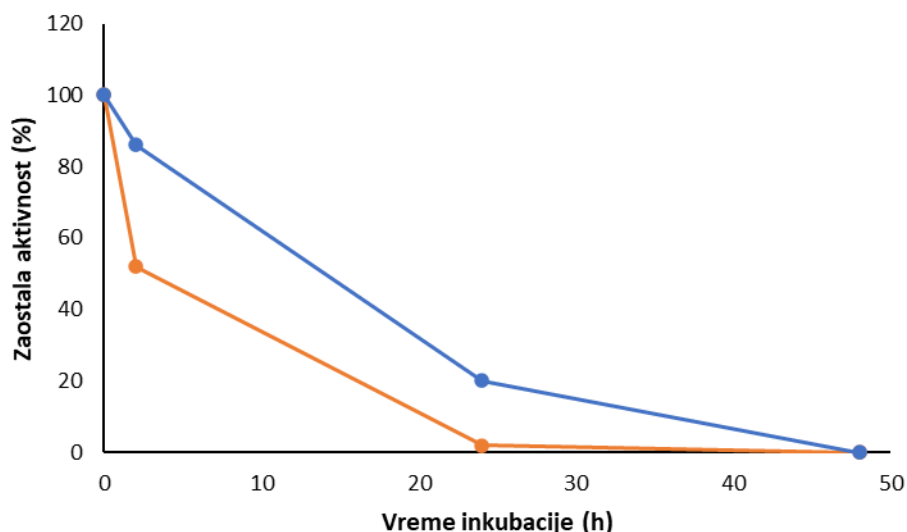


Slika 74. Zavisnost aktivnosti hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG od pH

Uočava se da hibridni biokompozit HRP@ZIF-8@ALG pokazuje izrazitu zavisnost katalitičke aktivnosti od pH vrednosti reakcione sredine. Maksimalna brzina reakcije i najstrmiji porast apsorbancije zabeleženi su u blago kiseloj sredini, sa jasno definisanim pH optimumom na vrednosti 4,5. Biokompozit zadržava značajan deo aktivnosti i na pH 5,5, dok se u neutralnoj i alkalnoj sredini uočava drastičan pad katalitičke aktivnosti.

5.7.1.2. Određivanje stabilnosti u dioksanu hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG

S obzirom na to da je primena enzima u organskim rastvaračima često ograničena njihovom brзом denaturacijom, ispitana je katalitička stabilnost slobodne HRP i hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG tokom inkubacije u 80%-om dioksanu u trajanju do 48 sati. Preostala aktivnost oba preparata merena je u vodenoj sredini praćenjem promene apsorbancije na 420 nm u funkciji vremena, a dobijeni uporedni rezultati kinetike i zadržane aktivnosti prikazani su na Slici 74.



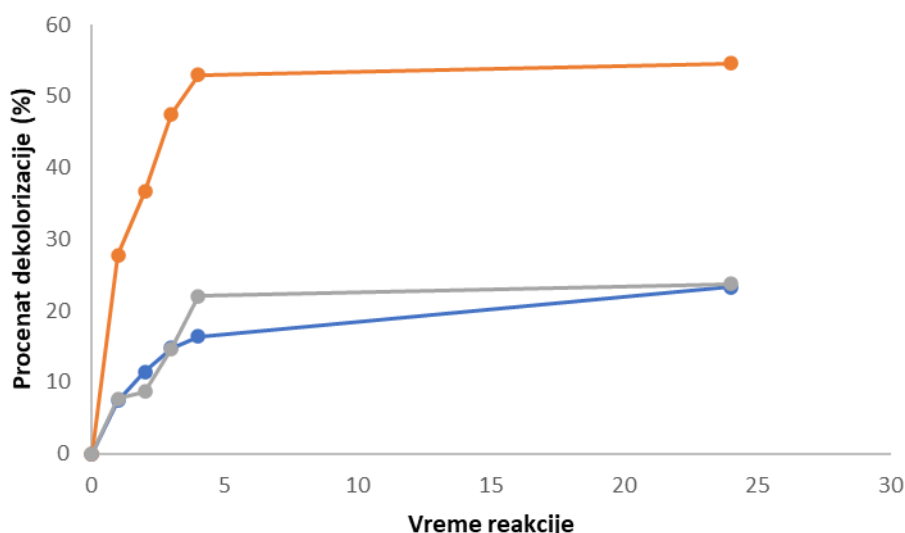
Slika 75. Zaostala aktivnost rastvorne HRP (narandžasta) i hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG (plava) nakon inkubacije u 80% dioksanu na sobnoj temperaturi

Uočava se značajna razlika u stabilnosti između dva ispitivana preparata. Slobodni enzim (rastvorna HRP) gubi gotovo celokupnu aktivnost nakon 24 sata inkubacije u 80%-tnom dioksanu, što potvrđuje visoku osetljivost native strukture peroksidaze na molekule organskog rastvarača.

Nasuprot tome, hibridni biokompozit HRP@ZIF-8@ALG pokazuje izuzetnu otpornost na prisustvo dioksana. Nakon 2 sata inkubacije, biokompozit zadržava visoku katalitičku aktivnost sa strmim porastom apsorbanije. Posebno je značajno da čak i nakon dugotrajnog izlaganja od 24 sata, imobilizovana HRP zadržava sposobnost efikasne oksidacije ABTS supstrata. Ovakav značajan porast stabilnosti u organskom rastvaraču direktna je posledica uspešne enkapsulacije enzima unutar zaštitne ZIF-8 mikrokristalne strukture i alginatnog hidrogela, koji efikasno sprečavaju konformacione promene i denaturaciju aktivnog centra HRP-a.

5.7.2. Obezbojavanje sintetičkih boja hibridnim HRP@ZIF-8@Alginat biokompozitima

U cilju procene potencijalne primene hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG u uklanjanju sintetičkih boja, ispitana je dekolorizacija boje *Evans Blue* u prisustvu vodonik-peroksida. Reakciona smeša je sadržala razblaženi rastvor *Evans Blue* boje koncentracije 0,0167 mM, čija je početna apsorbanca bila približno 1, i 5 mM H₂O₂, dok je kao biokatalizator korišćeno pet kuglica hibridnog biokompozita. Promena apsorbanice praćena je na 620 nm tokom 48 h, pri čemu su ispitana dva uslova: bez mešanja i uz mešanje na šejkeru. Eksperimentalni uslovi i početne vrednosti apsorbanice definisani su tako da omogućavaju praćenje relativnog smanjenja intenziteta boje tokom vremena, Slika 75.



Slika 76. Dekolorizacija *Evans Blue* boje (plave tačke) i *Methyl Orange* (prvi ciklus narandžaste i drugi ciklus sive tačke) u prisustvu HRP@ZIF-8@ALG biokompozita i H_2O_2 tokom vremena.

Kao što se vidi došlo je do dekolorizacije *Evans Blue* i *Methyl Orange* boje u prisustvu HRP@ZIF-8@ALG biokompozita. Najveći stepen dekolorizacije je dobijen za boju *Methyl Orange* u prvom ciklusu gde je nakon 4 h stepen dekolorizacije iznosio 53 % i nije se mnogo promenio nakon 24 h.

Procenat dekolorizacije boje *Evans blue* je iznosio 23 % nakon 24 h. U drugom ciklusu je dobijen manji stepen dekolorizacije za boju *Methyl Orange*. Ovi rezultati potvrđuju da hibridni biokompozit zadržava peroksidaznu aktivnost i nakon ugradnje u ZIF-8@alginatnu matricu, ali istovremeno ukazuju da *Evans Blue* nije optimalan model-supstrat za peroksidazu iz rena. Relativno niska dekolorizacija i spora kinetika mogu se pripisati slabijoj podložnosti ove boje oksidaciji pomoću HRP/ H_2O_2 sistema, kao i mogućim difuzionim ograničenjima usled veličine i strukture molekula boje u odnosu na porozno-hidrogelnu biokompozitnu matricu. Izgled kuglica hibridnog biokompozita nakon drugog ciklusa dekolorizacije boje *Methyl Orange* se može videti na Slici 77.



Slika 77 Izgled kuglica hibridnog biokompozita HRP@ZIF-8@ALG nakon drugog ciklusa dekolorizacije boje *Methyl Orange*

Za potpuniju procenu potencijala HRP@ZIF-8@ALG sistema bilo bi poželjno ispitati dodatno uslove reakcije i načine dodavanja vodonik peroksida ali i druge fenolne ili aromatične boje koje su pogodniji supstrati za HRP, kao što su azo, antrahinonske ili fenolne boje, kod kojih se može očekivati izraženija oksidativna degradacija.

6. Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji razvijeni su novi biokompoziti zasnovani na enzimima glukoza-oksidadzi iz *Aspergillus niger* i peroksidazi iz rena (*Azorhiza niger*), sa ciljem unapređenja njihove aktivnosti, stabilnosti, efikasnosti imobilizacije i mogućnosti višekratne upotrebe. Ispitivani su komercijalni, hemijski modifikovani i mutantni oblici enzima, koji su imobilizovani u okviru zeolitnih imidazolatnih okvira, prvenstveno ZIF-8 i ZIF-90, kao i dodatno enkapsulirani u alginatne hidrogelove radi dobijanja hibridnih biokompozitnih sistema.

1. Rezultati su pokazali da hemijska modifikacija GOx perjodatnom oksidacijom predstavlja efikasnu strategiju za promenu površinskog naelektrisanja enzima bez značajnog narušavanja njegove proteinske strukture. Perjodatno oksidovana GOx pokazala je izraženije negativno površinsko naelektrisanje u odnosu na nativni enzim, što je omogućilo povoljnije interakcije sa Zn^{2+} jonima tokom biomimetičke mineralizacije. Na taj način je poboljšana ugradnja enzima u ZIF-8 strukturu, smanjen udeo površinski adsorbovanog enzima i povećana stabilnost dobijenih biokompozita nakon tretmana SDS-om i inkubacije na povišenoj temperaturi.
2. Sličan princip primenjen je i kod peroksidaze iz rena. Prečišćavanjem komercijalnog preparata izolovana je HRP-C izoforma, čime je smanjen uticaj heterogenosti izoenzimskog sastava na proces biomineralizacije. Perjodatna oksidacija HRP i HRP-C izoforme dovela je takođe do povećanja negativnog površinskog naelektrisanja, što je unapredilo interakcije enzima sa prekursorima ZIF-8 strukture. Dobijeni oxHRP@ZIF-8 i oxHRP-C@ZIF-8 biokompoziti su pokazali bolju efikasnost imobilizacije, veću zadržanu aktivnost i povoljnije operativne osobine u poređenju sa odgovarajućim biokompozitima dobijenim od neoksidovanih enzima. Posebno je značajno da je perjodatno oksidovana HRP-C izoforma nakon imobilizacije pokazala izraženu termostabilnost, što potvrđuje zaštitni efekat ZIF-8 matriksa na strukturu i funkciju enzima.
3. Dodatna hemijska modifikacija GOx L-aspartatom i L-histidinom omogućila je ispitivanje uticaja različitih funkcionalnih grupa na biomineralizaciju i performanse GOx@ZIF-8 biokompozita. Modifikacija L-aspartatom povećala je negativno naelektrisanje enzima, dok je modifikacija L-histidinom omogućila dodatne koordinacione interakcije sa Zn^{2+} jonima. Dobijeni rezultati su pokazali da hemijska funkcionalizacija ugljenohidratne komponente GOx značajno utiče na tok biomineralizacije, količinu imobilizovanog enzima, specifičnu aktivnost i stabilnost biokompozita. Posebno su se izdvojili H-GOx@ZIF-8 biokompoziti, koji su pokazali dobre operativne performanse i stabilnost tokom ponovljene upotrebe.
4. Ispitivanje uticaja vrste i koncentracije imidazolatnog liganda na imobilizaciju GOx pokazalo je da uslovi sinteze značajno određuju strukturu i funkcionalne osobine nastalih GOx@ZIF biokompozita. U sistemima zasnovanim na imidazolu formirana je ZIF-90 struktura, čije su fizičko-hemijske i katalitičke osobine zavisile od odnosa koncentracija Zn^{2+} jona i imidazolnog liganda. Dobijeni rezultati ukazuju da izbor liganda i uslovi biomimetičke mineralizacije mogu biti korišćeni za podešavanje strukture enzim@ZIF biokompozita, dostupnosti aktivnog mesta enzima i ukupnih biokatalitičkih performansi.
5. U okviru proteinskog inženjeringa, primenom metode informacionog spektra (ISM) identifikovane su funkcionalno značajne pozicije u sekvenci GOx, na osnovu čega su konstruisani i eksperimentalno ispitani mutanti K152D, K152C, D180E, D180L, F484N i F484H. Kinetička karakterizacija pokazala je da pojedine mutacije značajno poboljšavaju katalitičke osobine enzima. Mutanti D180E, K152D i K152C pokazali su povećane vrednosti katalitičke konstante i specifične aktivnosti u odnosu na wild type GOx, dok su mutacije na

poziciji Phe484 dovele do značajnog smanjenja aktivnosti, što ukazuje na važnu ulogu aromatičnog karaktera i volumena bočnog lanca ovog ostatka u očuvanju funkcionalne konformacije enzima.

6. Poređenje kinetičkih parametara GOx mutanata sa amplitudama karakterističnih ISM frekvencija pokazalo je povezanost između bioinformatički predviđenih promena i eksperimentalno određenih katalitičkih osobina. Posebno je značajna negativna korelacija između amplitude frekvencije $F(0,088)$ i katalitičke konstante k_{cat} , pri čemu je nakon izdvajanja mutanta D180L kao strukturno odstupajuće varijante dobijena veoma jaka linearna zavisnost. Ovi rezultati potvrđuju da ISM analiza, u kombinaciji sa strukturnim podacima i eksperimentalnom karakterizacijom, može biti koristan alat za racionalni izbor pozicija za mutagenezu i dizajn enzima sa unapređenim katalitičkim osobinama.
7. U okviru istraživanja HRP mutanata pokazano je da se rekombinantne varijante ovog enzima mogu uspešno eksprimirati, prečistiti, kinetički okarakterisati i imobilizovati u ZIF-8. Mutantne varijante HRP pokazale su poboljšane kinetičke parametre u odnosu na prirodan oblik enzima, što potvrđuje da proteinski inženjering može značajno uticati na funkcionalne osobine enzima i njegovu pogodnost za formiranje enzim@ZIF biokompozita.
8. Imobilizacija mutantnih varijanti GOx i HRP u ZIF-8 pokazala je da osobine samog enzima, uključujući površinsko naelektrisanje, lokalna struktura i prisustvo funkcionalnih grupa, značajno utiču na efikasnost biomimetičke mineralizacije i aktivnost dobijenih biokompozita. Time je potvrđeno da optimizacija enzimskog dela sistema predstavlja jednako važan faktor kao i izbor metalnog jona, organskog liganda i uslova sinteze ZIF strukture.
9. Najaktivniji HRP@ZIF-8 biokompoziti dodatno su enkapsulirani u alginatne hidrogelove, čime su dobijeni hibridni HRP@ZIF-8@ALG biokompoziti sa poboljšanom manipulativnošću, mehaničkom stabilnošću i mogućnošću lakšeg izdvajanja iz reakcione smeše. Ovi hibridni sistemi pokazali su očuvanu katalitičku aktivnost i znatno bolju stabilnost u prisustvu organskog rastvarača u odnosu na rastvorni enzim. Posebno je značajno da je HRP@ZIF-8@ALG biokompozit zadržao aktivnost nakon inkubacije u 80% dioksanu, dok je rastvorna HRP gotovo potpuno izgubila aktivnost nakon dužeg izlaganja istom rastvaraču. Time je potvrđen zaštitni efekat kombinovane ZIF-8 i alginatne matrice na konformacionu stabilnost enzima.

Ukupno posmatrano, rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da se kombinovanjem hemijske modifikacije, proteinskog inženjeringa i biomimetičke mineralizacije mogu dobiti biokompozitni sistemi sa unapređenim katalitičkim i operativnim osobinama. Perjodatna oksidacija i dalja funkcionalizacija glikoproteina pokazale su se kao efikasne strategije za poboljšanje interakcija enzima sa ZIF nosačima, dok je ISM metoda omogućila racionalan izbor mutacija sa potencijalnim uticajem na aktivnost i stabilnost enzima. Dodatna enkapsulacija enzim@ZIF biokompozita u alginatne hidrogelove omogućila je razvoj stabilnih, lakše upotrebljivih i potencijalno višekratno primenljivih biokatalitičkih sistema.

Dobijeni rezultati doprinose boljem razumevanju odnosa između strukture enzima, površinskog naelektrisanja, hemijske modifikacije, mutageneze, uslova biomineralizacije i funkcionalnih osobina enzim@ZIF i enzim@ZIF@hidrogel biokompozita. Razvijeni sistemi predstavljaju značajan doprinos racionalnom dizajnu stabilnih i efikasnih imobilizovanih biokatalizatora, sa potencijalnom primenom u biokatalizi, biosenzorima, tretmanu otpadnih voda i drugim biotehnološkim procesima.

7. Literatura

1. Yang, F.; Jing, X.; Dong, R.; Zhou, L.; Xu, X.; Dong, Y.; Zhang, L.; Zheng, L.; Lai, Y.; Chen, Y.; et al. Glucose Oxidase of a Crucifer-Specialized Insect: A Potential Role in Suppressing Plant Defense via Modulating Antagonistic Plant Hormones. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, doi:10.1021/acs.jafc.3c06401.
2. Li, S.; Zhang, Q.; Li, M.; Liu, X.; Peng, J.; Lin, B.; Huang, J.; Huang, Y. UV/Green Rust/Glucose Oxidase-Based Fenton-like Systems for Algal Removal: Mechanisms of Sustained Oxidative Capacity in UV-Enhanced Systems. *J. Environ. Chem. Eng.* **2025**, *13*, doi:10.1016/j.jece.2025.118566.
3. Bean, R.C.; Porter, G.G.; Steinberg, B.M. *Carbohydrate Metabolism of Citrus Fruits II. OXIDATION OF SUGARS BY AN AERODEHYDROGENASE FROM YOUNG ORANGE FRUITS**; 1961; Vol. 236;.
4. Mano, N. Engineering Glucose Oxidase for Bioelectrochemical Applications. *Bioelectrochemistry* **2019**, *128*, 218–240, doi:10.1016/j.bioelechem.2019.04.015.
5. Wong, C.M.; Wong, K.H.; Chen, X.D. Glucose Oxidase: Natural Occurrence, Function, Properties and Industrial Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 927–938.
6. Semi-Plant-Scale-Production-of-Gluconic-Acid-by-Mold-Fermentation.
7. Av, U., I. E.; Van Dijken, J.P.; Veenhuis, M. *Cytochemical Localization of Glucose Oxidase in Peroxisomes of Aspergillus Niger*; 1980; Vol. 9;.
8. Clarke, K.G.; Johnstone-Robertson, M.; Price, B.; Harrison, S.T.L. Location of Glucose Oxidase during Production by *Aspergillus Niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 72–77, doi:10.1007/s00253-005-0031-9.
9. Witteveen, C.F.B.; Veenhuis, M.; Visser, J. *Localization of Glucose Oxidase and Catalase Activities in Aspergillus Niger*; 1992;.
10. Hatzinikolaou, D.G.; Hansen, O.C.; Macris, A.; Tingey, B.J.; Kekos, D.; Goodenough Stougaard, P.P.; Hatzinikolaou, D.G.; Macris, A.; Tingey, B.J.; Kekos, D.G.; Stougaard, P.; Tingey, A.I.; Goodenough, P. *A New Glucose Oxidase from Aspergillus Niger: Characterization and Regulation Studies of Enzyme and Gene*; 1996; Vol. 46;.
11. Wang, F.; Chen, X.; Wang, Y.; Li, X.; Wan, M.; Zhang, G.; Leng, F.; Zhang, H. Insights into the Structures, Inhibitors, and Improvement Strategies of Glucose Oxidase. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*.
12. Ahmed H.; Charles T.; Christian Z.; Patrick T.; Alpert B. Dynamic and structural properties of glucose oxidase enzyme, *Eur Bioph J*, 1998; Vol 27, S002490050106.
13. Dourado, D.F.A.R.; Swart, M.; Carvalho, A.T.P. Why the Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) Cofactor Needs To Be Covalently Linked to Complex II of the Electron-Transport Chain for the Conversion of FADH₂ into FAD. *Chemistry - A European Journal* **2018**, *24*, 5246–5252, doi:10.1002/chem.201704622.
14. Bankar, S.B.; Bule, M. V.; Singhal, R.S.; Ananthanarayan, L. Glucose Oxidase - An Overview. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 489–501.

15. Sriwaiyaphram, K.; Punthong, P.; Sucharitakul, J.; Wongnate, T. Structure and Function Relationships of Sugar Oxidases and Their Potential Use in Biocatalysis. In *Enzymes*; Academic Press, 2020; Vol. 47, pp. 193–230 ISBN 9780128201374.
16. Bauer, J.A.; Zámocká, M.; Majtán, J.; Bauerová-Hlinková, V. Glucose Oxidase, an Enzyme “Ferrari”: Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications. *Biomolecules* **2022**, *12*.
17. Khadivi Derakshan, F.; Darvishi, F.; Dezfulian, M.; Madzak, C. Expression and Characterization of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* in *Yarrowia Lipolytica*. *Mol. Biotechnol.* **2017**, *59*, 307–314, doi:10.1007/s12033-017-0017-8.
18. Yee, Y.C.; Hashim, R.; Mohd Yahya, A.R.; Bustami, Y. Colorimetric Analysis of Glucose Oxidase-magnetic Cellulose Nanocrystals (CNCS) for Glucose Detection. *Sensors (Switzerland)* **2019**, *19*, doi:10.3390/s19112511.
19. Abraheh, K.; Esmaeili, M.; Shans, N.; Ghaffari, S.; Mohammadi, M. A Simple and Cost-Efficient Method for the Production of Recombinant Horseradish Peroxidase in *E. Coli*. *Mol. Biotechnol.* **2025**, *67*, 4271–4279, doi:10.1007/s12033-024-01314-3.
20. Fujiyama, K.; Takemura, H.; Shibayama, S.; KOBAYASHI Mitsuo TAKANO, K.; Yamada, Y.; Okada, H.; CHOI Atsuhiko, J.-K.S.; Okada, H. *Structure of the Horseradish Peroxidase Isozyme C Genes*; 1988; Vol. 173;.
21. Krainer, F.W.; Glieder, A. An Updated View on Horseradish Peroxidases: Recombinant Production and Biotechnological Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 1611–1625.
22. Gundinger, T.; Spadiut, O. A Comparative Approach to Recombinantly Produce the Plant Enzyme Horseradish Peroxidase in *Escherichia Coli*. *J. Biotechnol.* **2017**, *248*, 15–24, doi:10.1016/j.jbiotec.2017.03.003.
23. Aibara, S.; Yamashta, H.; Mori, E.; Kato, M.; Morita, Y. *Isolation and Characterization of Five Neutral Isoenzymes of Horseradish Peroxidase 1*;
24. Vlamis-Gardikas, A.; Smith, A.T.; Clements, J.M.; Burke, J.F. *Expression of Active Horseradish Peroxidase in Saccharomyces Cerevisiae*; 1992; Vol. 1;.
25. Morawski, B.; Lin, Z.; Cirino, P.; Joo, H. *Functional Expression of Horseradish Peroxidase in Saccharomyces Cerevisiae and Pichia Pastoris*; 2000; Vol. 13;.
26. Morawski, B.; Quan, S.; Arnold, F.H. *Functional Expression and Stabilization of Horseradish Peroxidase by Directed Evolution in Saccharomyces Cerevisiae*; 2001;
27. Lin-Cereghino, G.P.; Stark, C.M.; Kim, D.; Chang, J.; Shaheen, N.; Poerwanto, H.; Agari, K.; Moua, P.; Low, L.K.; Tran, N.; et al. The Effect of α -Mating Factor Secretion Signal Mutations on Recombinant Protein Expression in *Pichia Pastoris*. *Gene* **2013**, *519*, 311–317, doi:10.1016/j.gene.2013.01.062.
28. Spadiut, O.; Rossetti, L.; Dietzsch, C.; Herwig, C. Purification of a Recombinant Plant Peroxidase Produced in *Pichia Pastoris* by a Simple 2-Step Strategy. *Protein Expr. Purif.* **2012**, *86*, 89–97, doi:10.1016/j.pep.2012.09.008.
29. Veitch, N.C. Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249–259, doi:10.1016/j.phytochem.2003.10.022.

30. Pereira, A.R.; da Costa, R.S.; Yokoyama, L.; Alhadeff, E.M.; Teixeira, L.A.C. Evaluation of Textile Dye Degradation Due to the Combined Action of Enzyme Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *174*, 2741–2747, doi:10.1007/s12010-014-1222-6.
31. Li, H.; Zhao, H.; Liu, C.; Li, Y.; Cao, H.; Zhang, Y. A Novel Mechanism of Bisphenol A Removal during Electro-Enzymatic Oxidative Process: Chain Reactions from Self-Polymerization to Cross-Coupling Oxidation. *Chemosphere* **2013**, *92*, 1294–1300, doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.071.
32. Sakai, S.; Khanmohammadi, M.; Khoshfetrat, A.B.; Taya, M. Horseradish Peroxidase-Catalyzed Formation of Hydrogels from Chitosan and Poly(Vinyl Alcohol) Derivatives Both Possessing Phenolic Hydroxyl Groups. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *111*, 404–409, doi:10.1016/j.carbpol.2014.05.010.
33. Rennke, H.G.; Venkatachalam, M.A. *THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY Chemical Modification of Horseradish Peroxidase' Preparation and Characterization of Tracer EnzymeS with Different ISoelectric Points*; 1979; Vol. 27;.
34. Gjesing WELINDER, K. *COVALENT STRUCTURE OF THE GLYCOPROTEIN HORSERADISH PEROXIDASE (EC 1.11.1.7)*; 1976;
35. Haschke, R.H.; Friedhoff, J.M. *CALCIUM-RELATED PROPERTIES OF HORSERADISH PEROXIDASE*; 1978; Vol. 80;.
36. Smith', A.T.; Sanders', S.A.; Thorneley', R.N.F.; Burke', J.F.; Bray', R.R.C. *Characterisation of a Haem Active-Site Mutant of Horseradish Peroxidase, Phe41 +Val, with Altered Reactivity towards Hydrogen Peroxide and Reducing Substrates*; Vol. 207;.
37. Munoz-Munoz, J.L.; Garcia-Molina, F.; Varon, R.; Rodriguez-Lopez, J.N.; Garcia-Canovas, F.; Tudela, J. Kinetic Characterization of the Oxidation of Esculetin by Polyphenol Oxidase and Peroxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 390–396, doi:10.1271/bbb.60431.
38. Alshawafi, W.M.; Aldhahri, M.; Almulaiky, Y.Q.; Salah, N.; Moselhy, S.S.; Ibrahim, I.H.; El-Shishtawy, R.M.; Mohamed, S.A. Immobilization of Horseradish Peroxidase on PMMA Nanofibers Incorporated with Nanodiamond. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, S973–S981, doi:10.1080/21691401.2018.1522321.
39. Kawaoka, A.; Kawamoto, T.; Ohta, I.; Sekine, M.; Takano, M.; Shinmyo, A. *Plant Cell Reports Wound-Induced Expression of Horseradish Peroxidase*; 1994; Vol. 13;.
40. Cowan, D.A.; Fernandez-Lafuente, R. Enhancing the Functional Properties of Thermophilic Enzymes by Chemical Modification and Immobilization. *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *49*, 326–346.
41. Rodrigues, R.C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2216–2238.
42. Zhao, P.; Zhang, Z.; Ran, W.; Bai, T.; Cheng, J.; Zhang, J. Recent Advances, Challenges, and Functional Applications of Protein Chemical Modification in the Food Industry. *Foods* **2025**, *14*.

43. Boutureira, O.; Bernardes, G.J.L. Advances in Chemical Protein Modification. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174–2195.
44. Hu, Y.; Lu, S.; Lin, X.; Qin, L.; Xu, Z.; Wang, T. The Chemical Modification of Lysostaphin by Water-Soluble Chitosan and Its Impact on Enzymatic Properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2025**, *330*, doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.148041.
45. Spasojević, D.; Prokopijević, M.; Prodanović, O.; Pirtea, M.G.; Radotić, K.; Prodanović, R. Imobilizacija Hemijski Modifikovane Peroksidaze Iz Rena Unutar Aktiviranih Alginatnih Kuglica. *Hem. Ind.* **2014**, *68*, 117–122, doi:10.2298/HEMIND121122036S.
46. Amer, H.; Nypelö, T.; Sulaeva, I.; Bacher, M.; Henniges, U.; Potthast, A.; Rosenau, T. Synthesis and Characterization of Periodate-Oxidized Polysaccharides: Dialdehyde Xylan (DAX). *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 2972–2980, doi:10.1021/acs.biomac.6b00777.
47. Liu, Y.; Yu, J. Oriented Immobilization of Proteins on Solid Supports for Use in Biosensors and Biochips: A Review. *Microchimica Acta* **2016**, *183*, 1–19.
48. Mau Goh, K.; Poh Hong, G.; Han Chyi, N.; Ng, P.; Kian Piau, C.; Noor Zaliha Raja Abdul Rahman, R. Jurnal Teknologi Trends and Tips in Protein Engineering, A Review. **2012**, 2180–3722.
49. Cheng, W.; Nian, B. Computer-Aided Lipase Engineering for Improving Their Stability and Activity in the Food Industry: State of the Art. *Molecules* **2023**, *28*.
50. Shaw, A.; Bott, R.; Day, A.G. *Protein Engineering of A-Amylase for Low PH Performance*;
51. Martinusen, S.G.; Nelson, S.E.; Slaton, E.W.; Long, L.F.; Pho, R.; Ajayebi, S.; Denard, C.A. Protease Engineering: Approaches, Tools, and Emerging Trends. *Biotechnol. Adv.* **2025**, *82*.
52. Kapoor, S.; Rafiq, A.; Sharma, S. Protein Engineering and Its Applications in Food Industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57*, 2321–2329, doi:10.1080/10408398.2014.1000481.
53. Bolyen, E.; Ram Rideout, J.; Chase, J.; Anders Pitman, T.; Shiffer, A.; Mercurio, W.; R Dillon, M.; Gregory Caporaso, J. An Introduction to Applied Bioinformatics: A Free, Open, and Interactive Text. *Journal of Open Source Education* **2018**, *1*, 27, doi:10.21105/jose.00027.
54. Ogunjobi, T.T.; Okorie, I.C.; Gigam-Ozuzu, C.D.; Olorunleke, J.V.; Ogunleye, F.I.; Irimoren, E.O.; Atanda, D.O.; Okafor, A.M.A.; Agbo, C.E.; Okunbi, F.O.; et al. Bioinformatics Tools in Protein Analysis: Structure Prediction, Interaction Modelling, and Function Relationship. *European Journal of Sustainable Development Research* **2025**, *9*.
55. Xu, Y.; Wang, S.; Hu, Q.; Gao, S.; Ma, X.; Zhang, W.; Shen, Y.; Chen, F.; Lai, L.; Pei, J. CavityPlus: A Web Server for Protein Cavity Detection with Pharmacophore Modelling, Allosteric Site Identification and Covalent Ligand Binding Ability Prediction. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W374–W379, doi:10.1093/nar/gky380.
56. Van Beusekom, B.; Joosten, K.; Hekkelman, M.L.; Joosten, R.P.; Perrakis, A. Homology-Based Loop Modeling Yields More Complete Crystallographic Protein Structures. *IUCrJ* **2018**, *5*, 585–594, doi:10.1107/S2052252518010552.
57. Gao, M.; Zhou, H.; Skolnick, J. DESTINI: A Deep-Learning Approach to Contact-Driven Protein Structure Prediction. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-40314-1.

58. Sun, P.; Tan, X.; Guo, S.; Zhang, J.; Sun, B.; Du, N.; Wang, H.; Sun, H. Protein Function Prediction Using Function Associations in Protein-Protein Interaction Network. *IEEE Access* **2018**, *6*, 30892–30902, doi:10.1109/ACCESS.2018.2806478.
59. Zhang, C.; Zheng, W.; Freddolino, L.; Zhang, Y. MetaGO: Predicting Gene Ontology of Non-Homologous Proteins Through Low-Resolution Protein Structure Prediction and Protein-Protein Network Mapping. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 2256–2265, doi:10.1016/j.jmb.2018.03.004.
60. Khalatbari, L.; Kangavari, M.R.; Hosseini, S.; Yin, H.; Cheung, N.M. MCP: A Multi-Component Learning Machine to Predict Protein Secondary Structure. *Comput. Biol. Med.* **2019**, *110*, 144–155, doi:10.1016/j.combiomed.2019.04.040.
61. Kwon, Y.; Shin, W.H.; Ko, J.; Lee, J. AK-Score: Accurate Protein-Ligand Binding Affinity Prediction Using an Ensemble of 3D-Convolutional Neural Networks. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–16, doi:10.3390/ijms21228424.
62. Volkov, M.; Turk, J.A.; Drizard, N.; Martin, N.; Hoffmann, B.; Gaston-Mathé, Y.; Rognan, D. On the Frustration to Predict Binding Affinities from Protein-Ligand Structures with Deep Neural Networks. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 7946–7958, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00487.
63. Kuhlman, B.; Bradley, P. Advances in Protein Structure Prediction and Design. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 681–697.
64. Weng, G.; Gao, J.; Wang, Z.; Wang, E.; Hu, X.; Yao, X.; Cao, D.; Hou, T. Comprehensive Evaluation of Fourteen Docking Programs on Protein-Peptide Complexes. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16*, 3959–3969, doi:10.1021/acs.jctc.9b01208.
65. Zhang, M.M.; Beno, B.R.; Huang, R.Y.C.; Adhikari, J.; Deyanova, E.G.; Li, J.; Chen, G.; Gross, M.L. An Integrated Approach for Determining a Protein-Protein Binding Interface in Solution and an Evaluation of Hydrogen-Deuterium Exchange Kinetics for Adjudicating Candidate Docking Models. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 15709–15717, doi:10.1021/acs.analchem.9b03879.
66. Chen, K.H.; Wang, T.F.; Hu, Y.J. Protein-Protein Interaction Prediction Using a Hybrid Feature Representation and a Stacked Generalization Scheme. *BMC Bioinformatics* **2019**, *20*, doi:10.1186/s12859-019-2907-1.
67. Veljkovic, V.; Cosic, I.; Dimitrijevic, Lalovic, D. Is It Possible to Analyze DNA and Protein Sequences by the Methods of Digital Signal Processing? *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1985**, *BME-32*, 337–341, doi:10.1109/TBME.1985.325549.
68. Perović, V. Razvoj Multifunkcionalne Bioinformatičke Platforme Zasnovane Na Potencijalu Elektron-Jon Interakcije Bioloških Molekula, Univerzitet u Beogradu - Matematički fakultet: Beograd, 2013.
69. Li, Y.; Ogorzalek, T.L.; Wei, S.; Zhang, X.; Yang, P.; Jasensky, J.; Brooks, C.L.; Marsh, E.N.G.; Chen, Z. Effect of Immobilization Site on the Orientation and Activity of Surface-Tethered Enzymes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20*, 1021–1029, doi:10.1039/c7cp06063g.
70. Hernandez, K.; Fernandez-Lafuente, R. Control of Protein Immobilization: Coupling Immobilization and Site-Directed Mutagenesis to Improve Biocatalyst or Biosensor Performance. *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 107–122.

71. Robescu, M.S.; Bavaro, T. A Comprehensive Guide to Enzyme Immobilization: All You Need to Know. *Molecules* **2025**, *30*.
72. Abad, J.M.; Vélez, M.; Santamaría, C.; Guisán, J.M.; Matheus, P.R.; Vázquez, L.; Gazaryan, I.; Gorton, L.; Gibson, T.; Fernández, V.M. Immobilization of Peroxidase Glycoprotein on Gold Electrodes Modified with Mixed Epoxy-Boronic Acid Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12845–12853, doi:10.1021/ja026658p.
73. Gering, J.P.; Quaroni, L.; Chumanov, G. Immobilization of Antibodies on Glass Surfaces through Sugar Residues. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *252*, 50–56, doi:10.1006/jcis.2002.8415.
74. de Andrade, B.C.; Gennari, A.; Renard, G.; Benvenuto, E.V.; Chies, J.M.; Volpato, G.; Volken de Souza, C.F. Nickel-Functionalized Chitosan for the Oriented Immobilization of Histidine-Tagged Enzymes: A Promising Support for Food Bioprocess Applications. *Catal. Letters* **2022**, *152*, 2956–2970, doi:10.1007/s10562-021-03912-1.
75. Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Boyert, H.W.; Hellingt, R.B. *Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro (R Factor/Restriction Enzyme/Transformation/Endonuclease/Antibiotic Resistance)*; 1973; Vol. 70;.
76. Ojima-Kato, T. Advances in Recombinant Protein Production in Microorganisms and Functional Peptide Tags. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2025**, *89*.
77. Bhat, S.; R, S.; Mahindra Kedare, M.; Patra, S. Revolutionizing Recombinant Protein Production in Prokaryotic Platforms – Methodologies and Advances. *Enzyme Microb. Technol.* **2026**, *193*.
78. Rosano, G.L.; Ceccarelli, E.A. Recombinant Protein Expression in Microbial Systems. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*.
79. Böer, E.; Steinborn, G.; Kunze, G.; Gellissen, G. Yeast Expression Platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *77*, 513–523.
80. Gellissen, Gerd. *Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems*; Wiley-VCH, 2005; ISBN 3527310363.
81. Li, J.; Wang, S.; Vandusen, W.J.; Schultz, L.D.; George, H.A.; Herber, W.K.; Chae, H.J.; Bentley, W.E.; Rao, G. *Green Fluorescent Protein in Saccharomyces Cerevisiae: Real-Time Studies of the GAL1 Promoter*; 2000; Vol. 70;.
82. Karbalaee, M.; Rezaee, S.A.; Farsiani, H. Pichia Pastoris: A Highly Successful Expression System for Optimal Synthesis of Heterologous Proteins. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 5867–5881.
83. Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M.L.; McNeil, B.; Harvey, L.M. Heterologous Protein Production Using the Pichia Pastoris Expression System. *Yeast* **2005**, *22*, 249–270.
84. Wu, S.; Letchworth, G.J. High Efficiency Transformation by Electroporation of Pichia Pastoris Pretreated with Lithium Acetate and Dithiothreitol. *Biotechniques* **2004**, *36*, 152–154, doi:10.2144/04361dd02.
85. Rajamanickam, V.; Metzger, K.; Schmid, C.; Spadiut, O. A Novel Bi-Directional Promoter System Allows Tunable Recombinant Protein Production in Pichia Pastoris. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, doi:10.1186/s12934-017-0768-8.

86. Razzaghi, M.; Homaei, A.; Vianello, F.; Azad, T.; Sharma, T.; Nadda, A.K.; Stevanato, R.; Bilal, M.; Iqbal, H.M.N. Industrial Applications of Immobilized Nano-Biocatalysts. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2022, 45, 237–256.
87. Liu, D.M.; Dong, C. Recent Advances in Nano-Carrier Immobilized Enzymes and Their Applications. *Process Biochemistry* 2020, 92, 464–475.
88. Free, A.H. Analytical Applications of Immobilized Enzymes. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1977**, 7, 479–485.
89. Imam, H.T.; Marr, P.C.; Marr, A.C. Enzyme Entrapment, Biocatalyst Immobilization without Covalent Attachment. *Green Chemistry* 2021, 23, 4980–5005.
90. Lu, S.W.; Thirlway, J.; Micklefield, J. Direct Site-Selective Covalent Protein Immobilization Catalyzed by a Phosphopantetheinyl Transferase. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12456–12464, doi:10.1021/ja8030278.
91. Maghraby, Y.R.; El-Shabasy, R.M.; Ibrahim, A.H.; Azzazy, H.M.E.S. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega* 2023, 8, 5184–5196.
92. Gao, S.; Wang, Y.; Diao, X.; Luo, G.; Dai, Y. Effect of Pore Diameter and Cross-Linking Method on the Immobilization Efficiency of Candida Rugosa Lipase in SBA-15. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 3830–3837, doi:10.1016/j.biortech.2010.01.023.
93. Cao, L.; van Langen, L.; Sheldon, R.A. Immobilised Enzymes: Carrier-Bound or Carrier-Free? *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003, 14, 387–394.
94. Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review. *Adsorption* 2014, 20, 801–821.
95. Brady, D.; Jordaan, J. Advances in Enzyme Immobilisation. *Biotechnol. Lett.* 2009, 31, 1639–1650.
96. Won, K.; Kim, S.; Kim, K.J.; Park, H.W.; Moon, S.J. Optimization of Lipase Entrapment in Ca-Alginate Gel Beads. *Process Biochemistry* **2005**, 40, 2149–2154, doi:10.1016/j.procbio.2004.08.014.
97. Nguyen, H.H.; Kim, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology* **2017**, 26, 157–163, doi:10.5757/ASCT.2017.26.6.157.
98. Wang, X.; Lan, P.C.; Ma, S. Metal-Organic Frameworks for Enzyme Immobilization: Beyond Host Matrix Materials. *ACS Cent. Sci.* **2020**, 6, 1497–1506, doi:10.1021/acscentsci.0c00687.
99. Cai, G.; Yan, P.; Zhang, L.; Zhou, H.C.; Jiang, H.L. Metal-Organic Framework-Based Hierarchically Porous Materials: Synthesis and Applications. *Chem. Rev.* 2021, 121, 12278–12326.
100. Yuan, N.; Gong, X.; Sun, W.; Yu, C. Advanced Applications of Zr-Based MOFs in the Removal of Water Pollutants. *Chemosphere* 2021, 267.
101. Kuang, G.; Wang, Z.; Bilal, M.; Wang, Z.; Feng, Y.; Du, Y.; Cui, J. Metal-Organic Frameworks: A Potential Platform From Enzyme Immobilization to Mimetic Enzyme. *Aggregate* 2025, 6.
102. Shomal, R.; Du, W.; Al-Zuhair, S. Immobilization of Lipase on Metal-Organic Frameworks for Biodiesel Production. *J. Environ. Chem. Eng.* **2022**, 10, doi:10.1016/j.jece.2022.107265.

103. Tudisco, C.; Zolubas, G.; Seoane, B.; Zafarani, H.R.; Kazemzad, M.; Gascon, J.; Hagedoorn, P.-L.; Rassaei, L. Covalent Immobilization of Glucose Oxidase on Amino MOFs via Post-Synthetic Modification. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 108051–108055, doi:10.1039/C6RA19976C.
104. Gao, X.; Pan, H.; Yang, K.; Dang, J.; Qiao, C.; Liu, Y.; Zhou, C. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Hierarchically Porous Magnetic Metal-Organic Frameworks for Visual Detection and Efficient Degradation of 2,4-Dichlorophenol in Simulated Wastewater. *Biochem. Eng. J.* **2023**, *190*, doi:10.1016/j.bej.2022.108760.
105. Chen, B.; Yang, Z.; Zhu, Y.; Xia, Y. Zeolitic Imidazolate Framework Materials: Recent Progress in Synthesis and Applications. *J. Mater. Chem. A Mater.* **2014**, *2*, 16811–16831.
106. Zheng, Z.; Rong, Z.; Nguyen, H.L.; Yaghi, O.M. Structural Chemistry of Zeolitic Imidazolate Frameworks. *Inorg. Chem.* **2023**, *62*, 20861–20873.
107. Huang, X.C.; Lin, Y.Y.; Zhang, J.P.; Chen, X.M. Ligand-Directed Strategy for Zeolite-Type Metal-Organic Frameworks: Zinc(II) Imidazoles with Unusual Zeolitic Topologies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1557–1559, doi:10.1002/anie.200503778.
108. Elaouni, A.; El Ouardi, M.; Zbair, M.; BaQais, A.; Saadi, M.; Ait Ahsaine, H. ZIF-8 Metal Organic Framework Materials as a Superb Platform for the Removal and Photocatalytic Degradation of Organic Pollutants: A Review. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 31801–31817.
109. Liang, K.; Ricco, R.; Doherty, C.M.; Styles, M.J.; Bell, S.; Kirby, N.; Mudie, S.; Haylock, D.; Hill, A.J.; Doonan, C.J.; et al. Biomimetic Mineralization of Metal-Organic Frameworks as Protective Coatings for Biomacromolecules. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, doi:10.1038/ncomms8240.
110. Li, Q.; Wang, Y.; Zhang, G.; Su, R.; Qi, W. Biomimetic Mineralization Based on Self-Assembling Peptides. *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52*, 1549–1590.
111. Frent, O.D.; Vicas, L.G.; Duteanu, N.; Morgovan, C.M.; Jurca, T.; Pallag, A.; Muresan, M.E.; Filip, S.M.; Lucaciu, R.L.; Marian, E. Sodium Alginate—Natural Microencapsulation Material of Polymeric Microparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*.
112. Mørch, Ý.A.; Donati, I.; Strand, B.L.; Skjåk-Bræk, G. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1471–1480, doi:10.1021/bm060010d.
113. Smidsrød, O. Molecular Basis for Some Physical Properties of Alginates in the Gel State. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1974**, *57*, 263–274, doi:10.1039/DC9745700263.
114. Colin, C.; Akpo, E.; Perrin, A.; Cornu, D.; Cambedouzou, J. Encapsulation in Alginates Hydrogels and Controlled Release: An Overview. *Molecules* **2024**, *29*.
115. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2012**, *37*, 106–126.
116. Tomić, S.L.; Babić Radić, M.M.; Vuković, J.S.; Filipović, V. V.; Nikodinovic-Runic, J.; Vukomanović, M. Alginate-Based Hydrogels and Scaffolds for Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2023**, *21*.
117. Baruch, L.; Machluf, M. Alginate-Chitosan Complex Coacervation for Cell Encapsulation: Effect on Mechanical Properties and on Long-Term Viability. *Biopolymers* **2006**, *82*, 570–579, doi:10.1002/bip.20509.

118. Donati, I.; Christensen, B.E. Alginate-Metal Cation Interactions: Macromolecular Approach. *Carbohydr. Polym.* **2023**, *321*.
119. Mahmoud, M.E.; Mohamed, A.K. Novel Derived Pectin Hydrogel from Mandarin Peel Based Metal-Organic Frameworks Composite for Enhanced Cr(VI) and Pb(II) Ions Removal. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 920–931, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.090.
120. Yang, W.; Wang, J.; Han, Y.; Luo, X.; Tang, W.; Yue, T.; Li, Z. Robust MOF Film of Self-Rearranged UiO-66-NO₂ Anchored on Gelatin Hydrogel via Simple Thermal-Treatment for Efficient Pb(II) Removal in Water and Apple Juice. *Food Control* **2021**, *130*, 108409, doi:10.1016/j.foodcont.2021.108409.
121. Ahmadian, M.; Derakhshankhah, H.; Jaymand, M. Recent Advances in Adsorption of Environmental Pollutants Using Metal–Organic Frameworks-Based Hydrogels. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *231*.
122. Feng, Y.; Sawut, A.; Simayi, R.; Maimaitiyiming, X.; Jiao, X. In Situ Self-Assembly of ZIF-8@sodium Alginate Composite Hydrogels for Enhanced Adsorption of Cu²⁺ Ions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2024**, *702*, doi:10.1016/j.colsurfa.2024.135040.
123. Song, Y.; Wang, N.; Yang, L.Y.; Wang, Y.G.; Yu, D.; Ouyang, X.K. Facile Fabrication of ZIF-8/Calcium Alginate Microparticles for Highly Efficient Adsorption of Pb(II) from Aqueous Solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2019**, *58*, 6394–6401, doi:10.1021/acs.iecr.8b05879.
124. Abellanas-Perez, P.; Carballares, D.; Fernandez-Lafuente, R.; Rocha-Martin, J. Glutaraldehyde Modification of Lipases Immobilized on Octyl Agarose Beads: Roles of the Support Enzyme Loading and Chemical Amination of the Enzyme on the Final Enzyme Features. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *248*, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.125853.
125. Nakamura, S.; Hayashi, S.; Koga, K. Effect of Periodate Oxidation on the Structure and Properties of Glucose Oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **1976**, *445*, 294–308, doi:10.1016/0005-2744(76)90084-X.
126. Kalisz, H.M.; Hecht, H.-J.; Schomburg, D.; Schmid, R.D. Effects of Carbohydrate Depletion on the Structure, Stability and Activity of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1991**, *1080*, 138–142, doi:10.1016/0167-4838(91)90140-U.
127. López-Cabrelles, J.; Miguel-Casañ, E.; Esteve-Rochina, M.; Andres-Garcia, E.; Vitorica-Yrezábal, I.J.; Calbo, J.; Mínguez Espallargas, G. Multivariate Sodalite Zeolitic Imidazolate Frameworks: A Direct Solvent-Free Synthesis. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 842–847, doi:10.1039/d1sc04779e.
128. Maddigan, N.K.; Tarzia, A.; Huang, D.M.; Sumby, C.J.; Bell, S.G.; Falcaro, P.; Doonan, C.J. Protein Surface Functionalisation as a General Strategy for Facilitating Biomimetic Mineralisation of ZIF-8. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 4217–4223, doi:10.1039/c8sc00825f.
129. Li, Z.; Zhou, G.; Dai, H.; Yang, M.; Fu, Y.; Ying, Y.; Li, Y. Biomineralization-Mimetic Preparation of Hybrid Membranes with Ultra-High Loading of Pristine Metal–Organic Frameworks Grown on Silk Nanofibers for Hazard Collection in Water. *J. Mater. Chem. A Mater.* **2018**, *6*, 3402–3413, doi:10.1039/C7TA06924C.

130. Liang, W.; Wied, P.; Carraro, F.; Sumby, C.J.; Nidetzky, B.; Tsung, C.K.; Falcaro, P.; Doonan, C.J. Metal-Organic Framework-Based Enzyme Biocomposites. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 1077–1129.
131. Kasinsky, H.E.; Hackett, D.P. Chromatographic Separation of Horseradish Peroxidase Isozymes from Commercial Preparations. *Phytochemistry* **1968**, *7*, 1147–1150, doi:10.1016/S0031-9422(00)88262-X.
132. Zakharova, G.S.; Uporov, I. V.; Tishkov, V.I. Horseradish Peroxidase: Modulation of Properties by Chemical Modification of Protein and Heme. *Biochemistry (Moscow)* **2011**, *76*, 1391–1401.
133. Surudžić, N.; Simić, M.; Popović, M.C.; El Gahwash, R.; Savković, M.S.; Prodanović, R.; Prodanović, O. Immobilization of Periodate-Oxidized Horseradish Peroxidase by Adsorption on Sepiolite. *Journal of the Serbian Chemical Society* **2024**, *89*, 1269–1283, doi:10.2298/JSC231227068S.
134. Liang, W.; Ricco, R.; Maddigan, N.K.; Dickinson, R.P.; Xu, H.; Li, Q.; Sumby, C.J.; Bell, S.G.; Falcaro, P.; Doonan, C.J. Control of Structure Topology and Spatial Distribution of Biomacromolecules in Protein@ZIF-8 Biocomposites. *Chemistry of Materials* **2018**, *30*, 1069–1077, doi:10.1021/acs.chemmater.7b04977.
135. Zou, D.; Yu, L.; Sun, Q.; Hui, Y.; Tengjisi; Liu, Y.; Yang, G.; Wibowo, D.; Zhao, C.X. A General Approach for Biomimetic Mineralization of MOF Particles Using Biomolecules. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *193*, doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111108.
136. Zheng, Q.; Sheng, J.; Liu, J.; Chen, X.; Wang, M. Histidine-Rich Protein Accelerates the Biomineralization of Zeolitic Imidazolate Frameworks for In Vivo Protein Delivery. *Biomacromolecules* **2023**, *24*, 5132–5141, doi:10.1021/acs.biomac.3c00706.
137. Balog, E.; Varga, G.; Kukovecz, Á.; Tóth, Á.; Horváth, D.; Lagzi, I.; Schusztter, G. Polymorph Selection of Zeolitic Imidazolate Frameworks via Kinetic and Thermodynamic Control. *Cryst. Growth Des.* **2022**, *22*, 4268–4276, doi:10.1021/acs.cgd.2c00265.
138. Tocco, D.; Carucci, C.; Todde, D.; Shortall, K.; Otero, F.; Sanjust, E.; Magner, E.; Salis, A. Enzyme Immobilization on Metal Organic Frameworks: Laccase from *Aspergillus* Sp. Is Better Adapted to ZIF-Zni Rather than Fe-BTC. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *208*, doi:10.1016/j.colsurfb.2021.112147.
139. Bumstead, A.M.; Thorne, M.F.; Sapnik, A.F.; Castillo-Blas, C.; Lampronti, G.I.; Bennett, T.D. Investigating the Chemical Sensitivity of Melting in Zeolitic Imidazolate Frameworks. *Dalton Transactions* **2022**, *51*, 13636–13645, doi:10.1039/d2dt02142k.
140. Huang, A.; Tong, L.; Kou, X.; Gao, R.; Li, Z.W.; Huang, S.; Zhu, F.; Chen, G.; Ouyang, G. Structural and Functional Insights into the Biomineralized Zeolite Imidazole Frameworks. *ACS Nano* **2023**, *17*, 24130–24140, doi:10.1021/acsnano.3c09118.
141. Kovačević, G.; Blažić, M.; Draganić, B.; Ostafe, R.; Gavrović-Jankulović, M.; Fischer, R.; Prodanović, R. Cloning, Heterologous Expression, Purification and Characterization of M12 Mutant of *Aspergillus Niger* Glucose Oxidase in Yeast *Pichia Pastoris* KM71H. *Mol. Biotechnol.* **2014**, *56*, 305–311, doi:10.1007/s12033-013-9709-x.
142. Stanojević, N. Heterologna Ekspresija i Prečišćavanje Mutanta R302I Peroksidaze Iz *Rena* Izoforme C1A u Kvascu *Pichia Pastoris* KM71H, Univerzitet u beogradu - Hemijski fakultet: Beograd, 2022.

143. Vlajkov, N. Heterologna Ekspresija i Prečišćavanje Mutanta I297T Peroksidaze Iz Rena Izoforme C1A u Kvascu *Pichia Pastoris* KM71H, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet: Beograd, 2022.

Biografija

Marija D. Stanišić rođena je 15. jula 1996. godine u Užicu. Osnovnu školu „Boško Buha“ u Rudom završila je 2011. godine kao nosilac diploma „Vuk Stefanović-Karadžić“ i „Učenik generacije“, dok je Gimnaziju u Priboju završila 2015. godine kao nosilac diplome „Vuk Stefanović-Karadžić“. Osnovne akademske studije (studijski program Hemija) na Univerzitetu u Beogradu–Hemijskom fakultetu upisala je školske 2015/2016. godine, a diplomirala 2019. godine sa prosečnom ocenom 8,63 i ocenom 10 na završnom radu rađenom pod rukovodstvom prof. dr Radivoja Prodanovića. Iste godine upisala je master akademske studije (studijski program Biohemija) na Univerzitetu u Beogradu–Hemijskom fakultetu, koje je završila 2020. godine sa prosečnom ocenom 9,80 i ocenom 10 na master radu pod mentorstvom prof. dr Radivoja Prodanovića. Doktorske akademske studije na Katedri za biohemiju Univerziteta u Beogradu–Hemijskog fakulteta upisala je 2020. godine pod mentorstvom prof. dr Radivoja Prodanovića.

Od aprila 2021. godine do jula 2022. godine je bila zaposlena kao istraživač-pripravnik na projektu *SYMBIOSIS* (PROMIS, 6066997, rukovodilac projekta: prof. dr Tamara Todorović, Fond za nauku Republike Srbije). Od jula 2022. godine je zaposlena na Univerzitetu u Beogradu–Hemijskom fakultetu kao istraživač-pripravnik, a od jula 2023. kao istraživač-saradnik. Od 1. januara 2024. godine angažovana je na projektu *GlucoAdjust* (PRIZMA, HF-190, rukovodilac projekta: dr Maja Stojiljković, Fond za nauku Republike Srbije).

Od 2020/2021. godine je angažovana kao saradnik u nastavi na predmetima Biotehnologija u životnoj sredini i Hemija prirodnih proizvoda.

Do sada je objavila 6 radova u međunarodnim časopisima (4 kao prvi autor iz teze), jedan revijalni rad i 7 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Марија Д. Станишић

Број индекса: ДБ03/2020

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Имобилизација хемијски модификованих и мутантних варијанти ензима пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) и глукоза-оксидазе из гљиве *Aspergillus niger* синтезом биокомпозитних материјала

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

У Београду,

Потпис аутора

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марија Д. Станишић

Број индекса: ДБ03/2020

Студијски програм: Биохемија

Наслов рада:

Имобилизација хемијски модификованих и мутантних варијанти ензима пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) и глукоза-оксидазе из гљиве *Aspergillus niger* синтезом биокомпозитних материјала

Ментор: проф. др Радивоје Продановић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Имобилизација хемијски модификованих и мутантних варијанти ензима пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) и глукоза-оксидазе из гљиве *Aspergillus niger* синтезом биокомпозитних материјала

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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

Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.