

Stabilizacija magnetnih čestica polianilinom i imobilizacija α -amilaze

Mirjana N. Radovanović¹, Milan P. Nikolić¹, Vesna M. Đurović¹, Branimir Z. Jugović²,
Milica M. Gvozdenović³, Branimir N. Grgur³, Zorica D. Knežević-Jugović³

¹Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku

²Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, Beograd

³Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd

Izvod

U ovom radu sintetisane su magnetne čestice metodom koprecipitacije, a zatim je izvršena polimerizacija anilina na njihovoj površini. Dobijene čestice upotrebene su kao nosač za imobilizaciju α -amilaze iz *Bacillus licheniformis*. FTIR spektroskopskom analizom pokazane su promene spektara magnetnih čestica usled stvaranja polianilinske prevlake i imobilizacije α -amilaze na magnetnim česticama sa i bez polimernog sloja. Kod magnetnih čestica je prisutna bimodalna, a kod magnetnih čestica sa polianilinskom prevlakom trimodalna raspodela veličine čestica. Merenjemetoda potencijala magnetnih čestica sa i bez polianilina utvrđeno je da dolazi do stabilizacije čestica nakon stvaranja polianilinske prevlake. Oblaganje magnetnih čestica polianilinom doprinelo je i poboljšanju kinetičkih svojstava imobilisanog enzima, jer je Mihaelisova konstanta hidrolize skroba, K_m , imobilisane α -amilaze na magnetnim česticama $1,91 \text{ g L}^{-1}$ i imobilisane α -amilaze na magnetnim česticama presvučenim polianilinom $1,48 \text{ g L}^{-1}$. Adsorpcija enzima na magnetnim česticama presvučenim polianilinom doprinela je pH i temperaturnoj stabilizaciji α -amilaze. U protočnom reaktoru sa pakovanim slojem sa povratnim tokom u prvom ciklusu već nakon 20 min hidrolizovalo je 98,8% skroba, dok je tokom petog ciklusa bio potreban približno pet puta duži vremenski period da hidrolizuje 93,5% skroba. U kontinualnim uslovima rada reaktora stepen hidrolize skroba se nije menjao značajnije u toku 4 h i iznosio je $88,8 \pm 1,6\%$, a vreme polu-života biokatalizatora bilo je 6,2 h.

Ključne reči: adsorpcija, α -amilaza, magnetne čestice, polianilin, ceta potencijal, FTIR.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Klasična hemijska kataliza u savremenim industrijskim procesima je delimično ili potpuno zamenjena biokatalizom. Smanjena potrošnja hemikalija i odsustvo štetnih nusprodukata u proizvodnji, biokatalizu čini ekološki prihvatljivom i svrstava u grupu tzv. „zelenih hemija“. Međutim, visoka cena enzima, njihova nedovoljna stabilnost, nemogućnost ponovne upotrebe i osetljivost na reakcione uslove dovodi u pitanje isplativost korišćenja nativnih enzima. Glavni zahtevi industrije su jeftini i stabilni biokatalizatorski sistemi za višekratnu upotrebu. Jedan od načina dobijanja biokatalizatora navedenih osobina je imobilizacija enzima.

Adsorpcija enzima na čvrstim nosačima je najjednostavniji i najjeftiniji vid imobilizacije. Ovom metodom dobijeni su biokatalizatorski sistemi za prehrambenu industriju [1–3], za bioremedijaciju toksičnih jedinjenja [4], biosenzori [5], sistemi za bioseparaciju i farmaciju [6], kao i za proizvodnju biodizela [7,8]. Adsorpcija se zasniva na fizičkim interakcijama između molekula enzima i nosača: polarnim, hidrofobnim i jonskim [9–11].

Preписка: M.N. Radovanović, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, Čačak, Cara Dušana 34, 32000 Čačak.

E-pošta: mira.radovanovic@kg.ac.rs

Rad primljen: 13. decembar 2016.

Rad prihvaćen: 17. oktobar 2017.

<https://doi.org/10.2298/HEMIND161213016R>

NAUČNI RAD

UDK 66.081.2:544.23:62

Hem. Ind. 72 (1) 1–12 (2018)

Relativni doprinos vrste međumolekulske interakcije zavisi od hemijske prirode nosača i enzimskih grupa, kao i od uslova odvijanja imobilizacije. Ove sile uglavnom su nespecifične i nisu orijentisane, usled čega izostaje kontrolisana orijentacija ostataka aminokiselina enzima tokom vezivanja za nosač. Adsorbovani enzimi čestoformiraju heterogene slojeve pri čemu je kapacitet vezivanja ograničen sternim smetnjama. Molekuli enzima se mogu lako desorbovati u prisustvu jonskih supstanci i proteina u rastvoru.

Međutim, adsorpcija se može unaprediti pravilnim izborom i modifikacijom nosača i optimizacijom uslova imobilizacije. Tokom adsorpcije enzim uglavnom ne menja nativnu strukturu i zadržava visok procenat početne aktivnosti, što je prednost u odnosu na ostale metode. Površina nosača može se tretirati supstancama koje sadrže veći broj funkcionalnih grupa sposobnih da reaguju sa grupama u molekulu enzima i na taj način omogućiti jače i specifičnije vezivanje enzima.

Laka i potpuna separacija imobilizata iz reakcionog sistema postiže se upotrebom nosača magnetnih svojstava. Imobilizat izdvojen pod dejstvom spoljašnjeg magnetnog polja izložen je manjem mehaničkom stresu u odnosu na separaciju centrifugiranjem [12]. U viskozim rastvorima intenzivno mešanje magnetnim česticama omogućava bolji prenos mase [13].

Danas, pažnju istraživača privlači imobilizacija enzima na magnetnim česticama presvučenim polimernim materijalima kao što su polianilin [14,15], silika [16], hitozan [17], itd. Polimerna prevlaka magnetnih čestica obezbeđuje povoljnu mikrookolinu za imobilizaciju enzima. Polimersprečava suviše otvaranje molekula enzima, štiti ga od konformacionih promena i time pozitivno utiče na enzimsku aktivnost [18].

Polianilin (PANI) je zahvaljujući lakoj sintezi, niskoj ceni, mehaničkoj fleksibilnosti, električnoj provodljivosti i hemijskoj stabilnosti našao široku primenu u različitim oblastima. Sintetisani su različiti materijali sa polianilinskom prevlakom. Zbog dobre mehaničke i hemijske stabilnosti kao i male podložnosti mikrobiološkim kontaminacijama, polianilin ima potencijal za primenu u biotehnologiji kao nosač za imobilizaciju enzima [19,20].

Danas se u industriji prerade skroba kataliza odvija uz amilaze, a klasični kiselinski postupak je gotovo potpuno potisnut. Faza utečnjavanja (likvefakcije) skroba odvija se na visokoj temperaturi u prisustvu termostabilnih α -amilaza. Druga faza poznata kao saharifikacija, gde se završava potpuna razgradnja skroba do glukoznih jedinica, vrši se pomoću enzima glukoamilaza. α -Amilaze (E.C.3.2.1.1; 1,4- α -D-glukan-glukanohidrolaze) katalizuju hidrolizu skroba i sličnih ugljenohidratnih makromolekula. Raskidaju α ,1-4 glikozidne veze po endo-mehanizmu nasumično delovanjem unutar makromolekula, a kao proizvod nastaju maltodekstrini sa različitim brojem glukoznih ostataka. α -Amilaze se primenjuju u prehrambenoj industriji, tekstilnoj, industriji papira, detergenata, itd [21]. Veliki broj istraživača je ispitivao imobilizaciju α -amilaza na modifikovanim i nedomodifikovanim magnetnim česticama [2–24], ali su veoma retki podaci o primeni polianilina za njihovu stabilizaciju i uticaju na katalitičku aktivnost α -amilaze [25]. Generalno, imobilizacija α -amilaze na polianilinu je nedovoljno proučena i pored nekih očiglednih prednosti koje je dati polimer pokazao pri imobilizaciji tripsina, β -galaktozidaze, glukoza-oksidadze, lipaze i drugih enzima [20,26–28].

U ovom radu sintetisane su magnetne čestice (MAG) metodom koprecipitacije, a zatim je izvršena polimerizacija anilina na njihovoj površini (MAG-PANI). Dobijene čestice MAG i MAG-PANI upotrebljene su kao nosač za imobilizaciju α -amilaze iz *Bacillus licheniformis* i njihova katalitička aktivnost je ispitana na model reakciji hidrolize skroba. Čestice MAG i MAG-PANI su okarakterisane, kao i interakcije polianilinske prevlake sa MAG i enzima sa MAG i MAG-PANI da bi se utvrdio uticaj veličine ceta potencijala čestica kao i hemijskih grupa na površini na katalitička svojstva enzima. Operativna stabilnost imobilisanih sistema ispitana je u protoknom reaktoru sa pakovanim slojem sa povratnim

tokom i u kontinualnim uslovima u reaktoru bez povratnog toka.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijali

Za sintezu i tretman MAG i MAG-PANI korišćeni su $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, Republika Češka), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KMnO_4 i limunska kiselina monohidrat (Centrochem, Stara Pazova, Srbija), 25% amonijak (NRK Inženjering, Beograd, Srbija), anilin (Merck, Nemačka), predestilisan u atmosferi argona i azotna kiselina (Zorka Pharma, Šabac, Srbija). Imobilisana je α -amilaza (EC 3.2.1.1) iz *Bacillus licheniformis* (Termamyl, Novozymes, A/S, Danska). Za ispitivanje aktivnosti α -amilaze korišćeni su: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 i rastvorni skrob (Centrochem, Stara Pazova, Srbija), KJ (T.T.T. d.o.o., Hrvatska), J_2 (NRK Inženjering, Beograd, Srbija), HCl (Zorka Pharma, Šabac, Srbija).

Sinteza MAG i MAG-PANI

Čestice MAG sintetisane su metodom koprecipitacije Fe^{2+} i Fe^{3+} u višku amonijaka po postupku opisanom u literaturi [25,26]. Rastvoreno je 5,6 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 10,8 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u 300 mL destilovane vode. Dobijeni rastvor zagrejan je na 80 °C, a zatim pomešan sa 200 mL 25% rastvora NH_4OH . Rastvor je neprestano i energično mešan 60 min. Čestice MAG profiltrirane su i temeljno isprane destilovanom vodom do pH 7, ostavljene da se suše preko noći na 105 °C, a nakon toga prosejane (<100 μm). Čestice su zatim ostavljene u rastvoru 0,1 M KMnO_4 na 50 °C tokom noći, nakon čega su isprane destilovanom vodom. Dobijene čestice (4,50 g) uronjene su u 100 mL 0,5 M rastvora anilina u 0,1 M rastvoru HNO_3 . Rastvor je ostavljen 2 h da se izvrši polimerizacija anilina. Nastale MAG-PANI ispirane su sukcesivno destilovanom vodom, 0,1 M rastvorom limunske kiseline i destilovanom vodom.

Karakterizacija nosača

Spektri α -amilaze, nosača i imobilizata snimljeni su pomoću Infracrvne spektroskopije sa Furijeovim transformacijama (FTIR) na FTIR spektroskopu (Bomem Hartman Braun, Nemačka). Osušeni uzorak pomešan je sa KBr (0,1 g, IR grade), presovan u formi peleta, a zatim je snimljen spektar.

Ceta potencijal i raspodela veličine čestica merena je metodom dinamičkog rasipanja svetlosti (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK). Pre svakog merenja uzorci su dispergovani u dejonizovanoj vodi. Srednja vrednost hidrodinamičkog radijusa, R_h , i polidisperznost određeni su na osnovu Stoks–Ajnštajnovne (Stokes–Einstein) jednačine:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (1)$$

gde je k Bolcmanova konstanta, T apsolutna temperatura pri kojoj se izvode merenja, η viskozitet medijuma i D koeficijent difuzije.

Imobilizacija α -amilaze

α -Amilaza je imobilisana metodom adsorpcije na MAG/MAG-PANI. 10 mL rastvora enzima (3 mg mL^{-1}) u fosfatnom puferu (pH 6,9) mešano je sa 0,1 g nosača MAG/MAG-PANI i ostavljano u tresilici (250 o min^{-1}) da se izvrši imobilizacija 1 h. Nakon toga, dejstvom spoljašnjeg magnetnog polja, imobilisani enzim izdvajan je iz rastvora i ispiran tri puta sa po 5 mL pufera. Supernatanti i filtrati su sakupljeni za merenje preostale aktivnosti enzima.

Za određivanje operativne aktivnosti imobilizata MAG-PANI-A korišćen je imobilizat prethodno dobijen mešanjem 0,82 g nosača i 10 mL enzima koncentracije $5,5 \text{ mg mL}^{-1}$, nakon čega je ispran 3 puta sa po 5 mL 0,04 M fosfatnog pufera pH 6,9. Imobilizat je čuvan u fosfatnom puferu na 4°C .

Određivanje aktivnosti α -amilaze i kinetičkih parametara

Aktivnost slobodne i imobilisane α -amilaze merena je metodom skrobno-jodne reakcije [29]. U 2,5 mL 40 mM fosfatnog pufera dodavano je po 0,1 mL rastvora enzima (3 mg mL^{-1})/100 mg imobilizata peinkubiranom rastvoru na 25°C je zatim dodavano po 3 mL rastvora skroba (2%). Reakciona smeša je zatim ostavljena na 25°C u vodenom kupatilu uz mešanje. Iz ovog rastvora izdvajano je po 0,1 mL alikvota u određenim vremenskim intervalima. Alikvot je dodavan u rastvor joda (10,9 mL ukupne zapremine: 5 mL 0,1 M HCl, 5 mL radnog rastvora joda i 0,9 mL fosfatnog pufera pH 6,9). Apsorbancija formirane plave boje merena je na 600 nm (Cary 300 UV-Vis spektrofotometar, Agilent, SAD). Enzimsko aktivnost određena je na osnovu količine skroba dobijene iz prethodno konstruisane kalibracione krive. Sva merenja vršena su najmanje dva puta. Jedinica aktivnosti α -amilaze definisana je kao količina enzima koja hidrolizuje 1 mg skroba u jednom minutu na temperaturi od 25°C i pH 6,9. Za određivanje preostale količine skroba u reakcionom sistemu nakon hidrolize i prevođenje u enzimsko jedinice, konstruisana je kalibraciona kriva za opseg koncentracija od 5,6–13,7 g L^{-1} (slika 1).

Masa adsorbovane α -amilaze određivana je Lori (Lowry) metodom iz razlike koncentracije proteina u rastvoru pre i nakon imobilizacije i ispiranja imobilizata. Početna koncentracija α -amilaze bila je uvek ista.

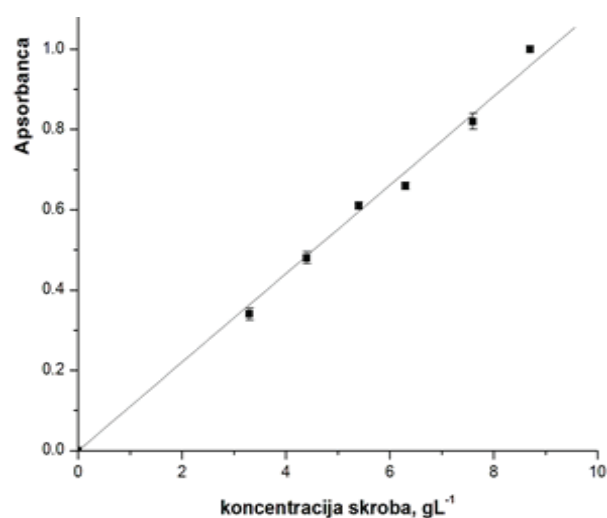
Kinetički parametri slobodne i imobilisane α -amilaze određeni su merenjem početne brzine reakcije za različite koncentracije skroba u opsegu 5,6–13,7 g L^{-1} . Za linearnu transformaciju Mihaelis–Mentenove jednačine i za određivanje kinetičkih parametara Mihaelisove

konstante, K_m , i maksimalne početne brzine reakcije, V_m , korišćena je Hejnsova (Hanes) jednačina:

$$\frac{[S_0]}{V_0} = \frac{1}{V_m} [S_0] + \frac{K_m}{V_m} \quad (2)$$

gde je $[S_0]$ početna koncentracija supstrata u g L^{-1} , a V_0 početna brzina hidrolize skroba u $\text{g L}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Vrednost nagiba predstavlja V_m^{-1} , a odsečka $K_m V_m^{-1}$.



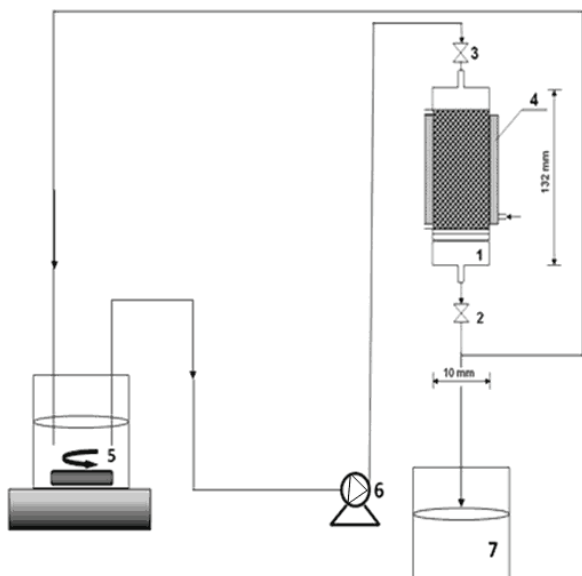
Slika 1. Kalibraciona kriva supstrata (skroba), na pH 6,9 i 25°C .
Figure 1. Calibration curve for substrate (starch) at pH 6.9 and 25°C .

Za upoređivanje stabilnosti native i imobilisane α -amilaze, merena je aktivnost u različitim temperaturnim uslovima i pri različitim pH. Aktivnost native i imobilisane α -amilaze praćena je u 40 mM fosfatnom puferu u pH opsegu od 6,2–7,8, na 25°C . U 2,5 mL 40 mM fosfatnog pufera određene pH vrednosti dodavano je po 0,1 mL rastvora enzima (3 mg mL^{-1})/100 mg imobilizata. Smeši je zatim dodavano po 3 mL rastvora skroba (2%). Iz ovog rastvora izdvajano je po 0,1 mL alikvota u određenim vremenskim intervalima (na 5 min ili češće, u zavisnosti od aktivnosti enzima). Na isti način ispitana je i temperaturna stabilnost, s tim što je varirana temperatura reakcione smeše supstrata i enzima/imobilizata u opsegu od 30 – 70°C , pri pH 6,9. Određivanje preostale aktivnosti native i imobilisane α -amilaze vršeno je upoređivanjem sa aktivnošću na pH/temperaturi pri kojoj je enzim pokazao maksimum aktivnosti (100%).

Operativna aktivnost MAG-PANI-A u reaktoru sa pakovanim slojem

Kao bioreaktor služila je staklena kolona dimenzija $10 \text{ mm} \times 13,2 \text{ cm}$ i zapremine 10 mL, sa spoljašnjim vodenim omotačem za održavanje temperature u reaktoru. Staklena kolona se punila sa 0,88 g imobilisane α -amilaze (MAG-PANI-A) pri čemu je visina pakovanog

sloja iznosila 2,3 cm. Za ispitivanje operativne stabilnosti imobilisanog enzima korišćene su dve konfiguracije reaktora: 1) protočni reaktor sa pakovanim slojem sa povratnim tokom i 2) bez povratnog toka. Na slici 2 šematski je prikazana laboratorijska aparatura koja se koristila za ispitivanje operativne stabilnosti imobilisanog enzima.



Slika 2. Šematski prikaz eksperimentalnog sistema za enzimsku hidrolizu skroba u reaktoru sa pakovanim slojem: 1- reaktor sa pakovanim slojem; 2 i 3- ventili; 4- duplikator kroz koji cirkuliše voda za održavanje temperature u reaktoru; 5- rezervoar sa rastvorom supstrata; 6- peristaltička pumpa; 7- rezervoar za proizvod kod kontinualnog procesa bez povratnog toka.

Figure 2. Experimental setup for starch hydrolysis in packed bed reactor (PBR) systems: 1- PBR with immobilized amylase particles; 2 and 3- valves; 4- water jacket with cooling/heating water; 5- reaction mixture reservoir; 6- peristaltic pump; 7- product reservoir in the case of a continuous process in the reactor without recirculation.

Napajanje reaktora silaznim tokom reakcione smeše (smešta rastvora skroba (2%) i fosfatnog pufera (40 mM, pH 6,9) u odnosu 1,2:1) izvedeno je peristaltičkom pumpom. Kako je preporuka kod bioreaktora sa povratnim tokom da se radi pri protocima kod kojih se postiže pri jednom prolazu kroz reaktor stepen konverzije manji od 2%, na osnovu preliminarnih eksperimenata izabran je protok $6,8 \text{ mL min}^{-1}$. U slučaju rada pod kontinualnim uslovima u reaktoru sa pakovanim slojem bez povratnog toka, protok je iznosio 1 mL min^{-1} . Vreme zadržavanja u reaktoru, τ može se izračunati na osnovu jednačine:

$$\tau = \frac{V_r}{Q} \quad (3)$$

gde je V_r zapremina reaktora i Q protok reakcione smeše.

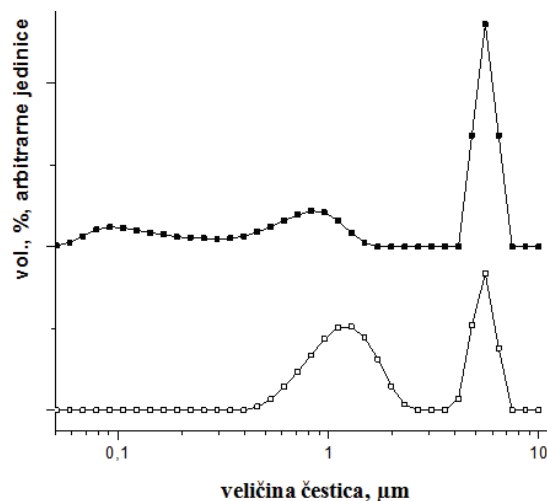
Rastvor supstrata se u rezervoaru održavao na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i konstantno mešao na magnetnoj mešalici pri 300 o/min . U slučaju reaktora sa povratnim tokom, cirkulisao je rastvor supstrata zapremine $45,2 \text{ mL}$ na $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon potpune hidrolize skroba u jednom ciklusu, reakcija je zaustavljena i vršena je zamena reakcione smeše sa svežim supstratom. U slučaju kontinualnog izvođenja procesa u istom reaktoru, ali bez povratnog toka, neprekidno je dovođen rastvor supstrata iste koncentracije (2% rastvor skroba i fosfatnog pufera 40 mM , pH 6,9 u odnosu 1,2:1). Od momenta prvog prolaska supstrata kroz kolonu u pravilnim vremenskim intervalima uzimani su alikvoti od po $0,1 \text{ mL}$ (za određivanje aktivnosti imobilizata).

REZULTATI I DISKUSIJA

Karakterizacija nosača

Raspodela veličine čestica i ceta potencijal

Sinteza magnetnih čestica metodom koprecipitacije je jednostavna i efikasna za sintezu veće količine čestica u odnosu na elektrohemijску sintezu. Glavni nedostatak ove metode je ograničena mogućnost kontrole veličine čestica, jer samo kinetički faktori kontrolišu rast kristala. Pri pH bliskim izoelektričnoj tački (point of zero charge, PZC), gustina površinskog naelektrisanja je toliko mala da čestice nisu više stabilne u rastvoru i podležu agregaciji. Jedan od načina stabilizacije magnetnih čestica je presvlačenje čestica polimerom. Na slici 3 prikazan je grafik raspodele dimenzija čestica MAG i MAG-PANI po zapremini.



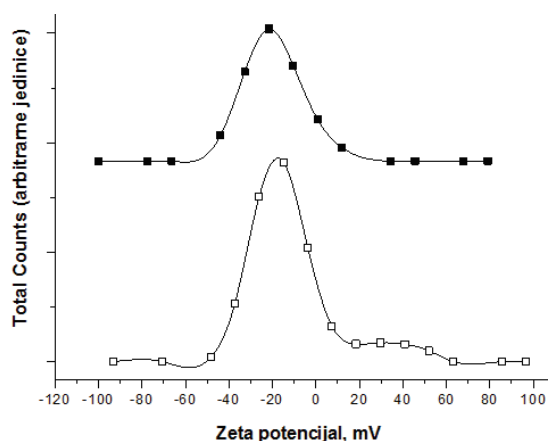
Slika 3. Raspodela veličine čestica MAG (\square) i MAG-PANI (\blacksquare).
Figure 3. Size distribution of magnetic particles MAG (\square) and magnetic particles coated with polyaniline MAG-PANI (\blacksquare).

Kod MAG čestica prisutna je bimodalna raspodela, pri čemu dominiraju veći aglomerati, oko $5 \text{ } \mu\text{m}$, dok je nešto manja distribucija čestica od $1 \text{ } \mu\text{m}$. Čestice MAG-PANI karakteriše trimodalna raspodela dimenzija čes-

tica: najdominantniji su aglomerati od oko 5 μm , dok čestice od oko 1 i 0,1 μm zauzimaju znatno manju zapreminu. S obzirom na to da tokom stvaranja PANI prevlake na MAG ne dolazi do mešanja reakcione smeše ili drugih mehaničkih uticaja koji bi uzrokovali usitnjavanje čestica, pretpostavlja se da je trimodalna raspodela veličine MAG-PANI uzrokovana nastankom samostalnih čestica polianilina koji nisu obložili čestice MAG. Grafik potvrđuje ranije snimljene FESEM mikrofografije [25] na osnovu kojih je zaključeno da su MAG i MAG-PANI mikročestice (aglomerati nanočestica).

Ceta potencijal je jedan od pokazatelja stabilnosti čestica. Povećanjem apsolutne vrednosti ceta potencijala odbojne interakcije među česticama rastu. Kao rezultat nastaju stabilnije čestice uniformnije raspodele. Ova stabilnost je važna u sprečavanju agregacije.

Najveći broj MAG i MAG-PANI čestica ima negativne vrednosti zeta potencijala. Pomeranje maksimuma sa $-14,9$ mV za MAG ka negativnijoj vrednosti $-21,5$ mV za MAG-PANI ukazuje da polianilinska prevlaka doprinosi stabilizaciji čestica (slika 4). Slični rezultati su opisani u literaturi [34].



Slika 4. Raspodela zeta potencijala čestica MAG (□) i MAG-PANI (■).

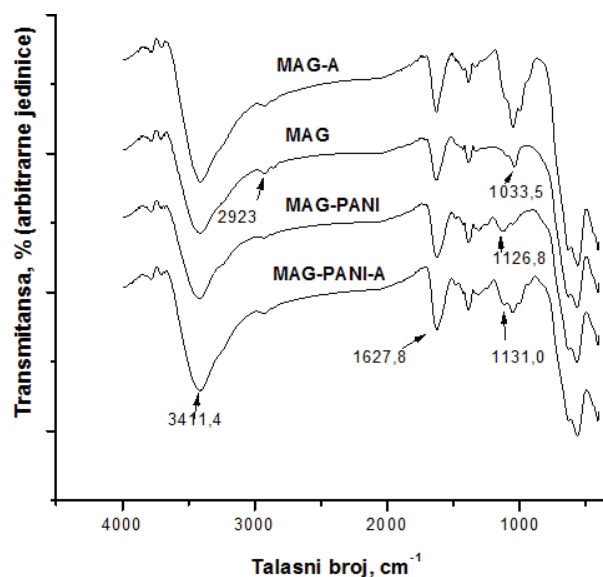
Figure 4. Zeta potential of magnetic particles MAG (□) and magnetic particles coated with polyaniline MAG-PANI (■).

FTIR spektri

Interakcija polianilina sa MAG česticama i α -amilaze sa MAG i sa MAG-PANI ispitana je pomoću FTIR spektroskopije u oblasti od 400 do 4000 cm^{-1} (slika 5). Pik na 560 cm^{-1} kod sva četiri spektraje verovatno nastao usled vibracije Fe–O veze [30].

Poređenjem spektara MAG i MAG-PANI uočavaju se promene pikova u oblasti od 930 do 1300 cm^{-1} , gde se inače javljaju pikovi karakteristični za polianilin. Kod MAG je prisutan pik na 1033,5 cm^{-1} koji je pomeren kod MAG-PANI na 1126,8 cm^{-1} i izmenjenog je oblika. Pik na 1126,8 cm^{-1} možese pripisati vibracijama N=Q=N (gde Q predstavlja prsten hinoidnog tipa) [31]. Postojanje navedenog pika može ukazati da je polianilin u

formi emeraldin soli koja ima visoku provodljivost [32]. Pik na 1248,37 cm^{-1} pripisuje se C–N istezanju benzenoidnog prstena. Ovaj pik prisutan je i na spektru MAG-PANI-A (imobilisana α -amilaza na MAG-PANI) i malo je pomeren (1241,83 cm^{-1}), a nije prisutan kod MAG i MAG-A (imobilisana α -amilaza na MAG), pa se može zaključiti da potiče samo od polianilina. Pik koji se javlja kod MAG na 2923 cm^{-1} postaje manjeg intenziteta na spektru MAG-PANI. Navedene razlike spektara dokazuju strukturne promene uzrokovane polimerizacijom anilina na magnetitu.



Slika 5. FTIR spektri: imobilisane α -amilaze namagnetnim česticama (MAG-A), magnetnih čestica (MAG), magnetnih čestica sa polianilinskom prevlakom (MAG-PANI) i imobilisane α -amilaze na magnetnim česticama presvučenim polianilinom (MAG-PANI-A).

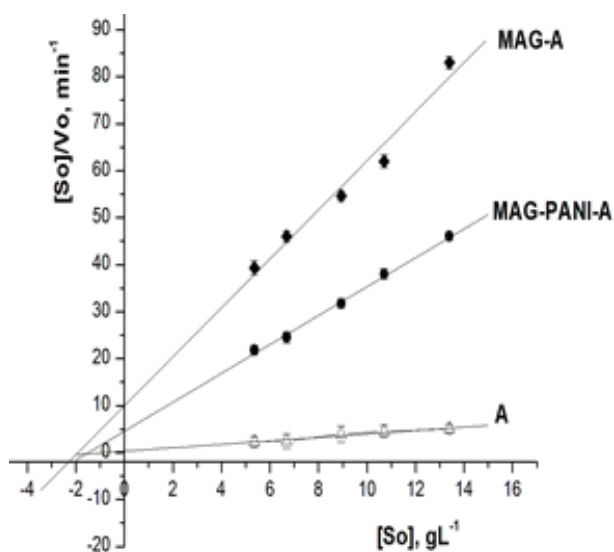
Figure 5. FTIR spectra of immobilized α -amylase onto magnetic particles (MAG-A), magnetic particles (MAG), magnetic particles coated with polyaniline (MAG-PANI) and immobilized α -amylase onto magnetic particles coated with polyaniline (MAG-PANI-A).

Poređenjem spektara MAG-A i MAG jasna je promena spektra u oblasti od 900 do 1300 cm^{-1} . Kod imobilisanog enzima, MAG-A prisutan je istaknut pojas sa nekoliko manjih pikova, koji potiče od prisustva α -amilaze. Primetna je sličnost ovog dela spektra MAG-A i MAG-PANI-A s tim što je pojas od 990 do 1050 cm^{-1} kod MAG-PANI-A širi i deformisan u odnosu na spektar MAG-A. Pikovi navedene oblasti su manjeg intenziteta kod MAG-PANI-A u odnosu na MAG-A, osim pika na 1131 cm^{-1} koji je izraženiji kod MAG-PANI-A. Na osnovu navedenih promena spektara imobilizata u odnosu na nosač, može se zaključiti da je došlo do interakcije α -amilaze sa MAG, kao i sa MAG-PANI.

Pikovi izraženih intenziteta na 3414 i 1640 cm^{-1} potiču od vibracija istezanja i savijanja O–H veze zaoštale vode u uzorcima [33].

Kinetički parametri nativne i imobilisane α -amilaze

Kinetički rezultati su dobijeni ispitivanjem početne brzine enzimske reakcije katalizovanih slobodnom i imobilisanom α -amilazom na MAG i MAG-PANI česticama u intervalu početne koncentracije skroba od 5,6–13,7 g L⁻¹. U sva tri slučaja dobijena je linearna zavisnost: $[S_0]V_0^{-1} = f([S_0])$, što ukazuje da se enzimske reakcije sa slobodnom i imobilisanom α -amilazom odvijaju po Mihaelis–Mentenovom mehanizmu (slika 6). Rezultati kinetičkih parametara prikazani su u tabeli 1.



Slika 6. Određivanje kinetičkih parametara nativne α -amilaze (A), MAG-PANI-A i MAG-A po Hejnsu (jednačina 2).
Figure 6. Application of the Hanes eq. (2) for determination of kinetic parameters of native α -amylase (A), immobilized α -amylase onto magnetic particles coated with polyaniline (MAG-PANI-A) and immobilized α -amylase onto magnetic particles (MAG-A).

Tabela 1. Kinetički parametri nativne i imobilisane α -amilaze
Table 1 Kinetic parameters of native and immobilized α -amylase

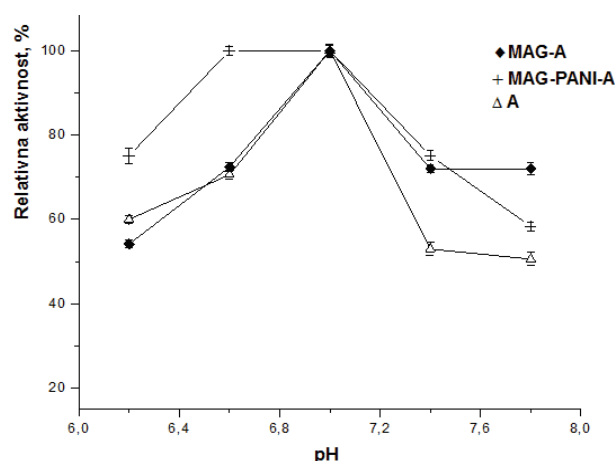
Parameter	Nativna α -amilaza (A)	Imobilisana α -amilaza na MAG (MAG-A)	Imobilisana α -amilaza na MAG-PANI (MAG-PANI-A)
$K_m / \text{g L}^{-1}$	0,65	1,91	1,48
$V_m / \text{g L}^{-1} \text{ min}^{-1}$	2,65	0,19	0,32

K_m imobilisanih enzima na MAG i na MAG-PANI veće su od iste konstante nativnog enzima. Ovo povećanje ukazuje na smanjenje afiniteta imobilisanog enzima prema skrobu, što je očekivano obzirom na makromolekulsku prirodu skroba i povećane difuzione limitacije u heterogenom sistemu sa imobilisanim česticama. Isto tako, moguće da je došlo do konformacionih promena enzima tokom imobilizacije [35], što isto može da prouzrokuje manju pristupačnost supstrata aktivnom mestu imobilisanog enzima [36]. Manja vrednost K_m

imobilizata MAG-PANI-A od K_m imobilizata MAG-A ukazuje da polimerna prevlaka magnetnih čestica obezbeđuje povoljnu mikrookolnu za imobilizaciju enzima. Moguće je da polimer sprečava suviše otvaranje enzima, štiti ga od konformacionih promena i time pozitivno utiče na enzimsku aktivnost [18]. Vrednost V_m nativnog enzima veća je 14 puta u odnosu na imobilizat MAG-A i oko 8 puta u odnosu na imobilizat MAG-PANI-A. Međutim, treba imati u vidu da V_m zavisi od koncentracije enzima, odnosno od količine adsorbovanog enzima na nosaču, pa je za poređenje potrebno utvrditi masu adsorbovanog enzima na MAG i MAG-PANI kao i efikasnost imobilizacije. K_m ne zavisi od koncentracije enzima pa se može koristiti za međusobno poređenje imobilisane α -amilaze na različitim nosačima bez podatka o masi vezane α -amilaze. Masa adsorbovane α -amilaze iznosila je 4,2±0,7 mg/50 mg nosača za MAG-PANI-A, dok se za MAG vezala nešto veća masa enzima 5,4±0,9 mg/50 mg nosača. Polianilinska prevlaka doprinosi većoj aktivnosti enzima, najverovatnije zbog toga što omogućava enzimu da zauzme povoljan konformacioni položaj, zbog čega MAG-PANI-A ima veću aktivnost od MAG čestica, iako se za MAG-PANI veže manje enzima.

pH i termička stabilnost

Nativna α -amilaza (A) i njen imobilizat na MAG česticama (MAG-A) pokazuju najveću aktivnost pri pH bliskim 7,0 (slika 7). Najuzi pH profil pokazuje nativni enzim. MAG-A pokazuje veću stabilnost pri promenama pH od nativnog enzima, što ukazuje da vezivanje enzima za nosač ima pozitivan uticaj na stabilnost. MAG-PANI-A ima širi pH profil u odnosu na A i MAG-A, što ukazuje na to da polianilinska prevlaka dodatno stabilizuje imobilisanu α -amilazu.

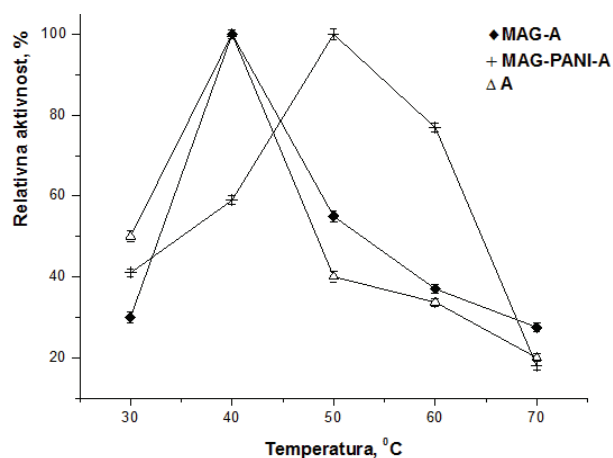


Slika 7. Uticaj pH na aktivnost nativne i imobilisane α -amilaze.
Figure 7. The effect of pH on the activity of native and immobilized α -amylase.

Interesantno je uporediti pH profil imobilisane α -amilaze na MAG i MAG-PANI sa pH profilom imobili-

sane α -amilaze na česticama Fe_3O_4 , kao i Fe_3O_4 presvučene silicijum-dioksidom i Fe_2O_3 presvučene zlatom [37]. Mogu se uočiti slični efekti imobilizacije na pH profil. Optimalne pH slobodne i imobilisane α -amilaze na česticama MAG, MAG-PANI, Fe_3O_4 , Fe_3O_4 presvučenim silicijum-dioksidom i Fe_2O_3 presvučenim zlatom su iste, pH 7. Imobilisan enzim na česticama MAG-PANI, isto kao i na Fe_3O_4 presvučenim silicijum-dioksidom i Fe_2O_3 presvučenim zlatom, ima tendenciju zadržavanja aktivnosti u širem pH opsegu od nativnog i imobilisanog enzima na MAG, odnosno na Fe_3O_4 . Na osnovu navedenih poređenja jasno je da prevlaka magnetnih čestica ima pozitivan efekat na pH profil imobilisane α -amilaze.

Imobilizacija α -amilaze na MAG čestice nema značajniji uticaj na termičku stabilnost, jer i nativni i imobilisan enzim pokazuju maksimum aktivnosti pri temperaturi od 40 °C (slika 8). Međutim, MAG-PANI-A je najaktivniji na 50 °C. Pomeranje temperaturnog optimuma od 10 °C je posledica mogućeg smanjenja konformacije fleksibilnosti enzima i zaštitnog efekta nosača sa polianilinskom prevlakom na molekule enzima. Za industriju skroba poželjno je korišćenje biokatalizatorskih sistema sa višim temperaturnim optimumom s obzirom da hidroliza skroba zahteva više temperature na kojima nativni enzim ne bi pokazao zadovoljavajuću aktivnost.



Slika 8. Uticaj temperature na aktivnost nativne i imobilisane α -amilaze.

Figure 8. The effect of temperature on the activity of native and immobilized α -amylase.

Poređenjem temperaturne stabilnosti, imobilisana α -amilazana MAG nije pokazala značajnu promenu u odnosu na nativni enzim, za razliku od imobilizata na Fe_3O_4 , koji je pokazao značajno pomeranje temperaturnog optimuma u odnosu na nativnu α -amilazu [37]. Temperaturni optimum imobilisane α -amilaze na česticama Fe_3O_4 pomeren je za čak 30 °C u odnosu na nativnu α -amilazu čiji je temperaturni optimum bio na 50 °C. Povećanje stabilnosti objašnjeno je manjom osetljivošću imobilisanog enzima prema konformacionoj zavisnosti od temperature [37]. Imobilizacija α -amilaza na

česticama MAG-PANI, česticama Fe_3O_4 presvučenim silicijum-dioksidom kao i na Fe_2O_3 presvučenim zlatom doprinela je pomeranju temperaturnih optimuma. Imobilizacija α -amilaze na MAG-PANI doprinela je pomeranju temperaturnog optimuma za 10 °C za razliku od imobilizacije istog enzima na magnetnim poli[2-hidroksietilmetakrilat-*N*-metakriol-(*L*)-fenilalanin] nanočesticama, čija je sinteza značajno kompleksnija od sinteze MAG-PANI, a imobilizacija nije doprinela ni pH ni temperaturnoj stabilnosti (optimalna pH i slobodnog i imobilisanog enzima je 7, a temperatura slobodnog enzima i imobilizata je 85 °C) [38]. U navedenom radu nisu prikazani pH i temperaturni profili, pa se ne može upoređivati u celosti efekat nosača na pH i termičku stabilnost imobilizata.

Svojstva imobilisane α -amilaze na MAG i MAG-PANI mikročesticama upoređena su sa drugim imobilisanim sistemima sa α -amilazom u literaturi. Poređenje je dato u tabeli 2. Da bi se upoređili kinetički parametri različitih imobilizata α -amilaze, od velikog broja radova navedeni su samo oni kod kojih je na isti ili sličan način definisana jedinica enzimske aktivnosti.

Imobilisana α -amilaza na MAG-PANI česticama ima jednu od najnižih vrednosti Mihaelisove konstante, K_m . Ova vrednost je približna vrednosti K_m imobilizata na nanočesticama cink-oksida, a čak je višestruko manja od K_m imobilisanih sistema na različitim polimernim materijalima. Uočava se da su maksimalne brzine enzimskih reakcija imobilizata polimernih mikročestica i hidrogelova nekoliko desetina puta manje od vrednosti imobilizata na nanočesticama cink-oksida, MAG i MAG-PANI. Različiti polimerni materijali, aktivirani različitim supstancama, u obliku imobilizata nisu pokazali značajne razlike pH i temperaturnog optimuma sa izuzetkom MAG-PANI-A. Interesantno je poređenje našeg imobilisanog sistema sa α -amilazom imobilisanom na nanočesticama metalnih oksida poput cink-oksida, koji su veoma interesantni kao biokatalizatori za primenu u hidrolizi skroba. Iako je u oba slučaja enzim imobilisan adsorpcijom, veću termalnu stabilnost pokazuje α -amilaza imobilisana na MAG-PANI. Optimalna temperatura α -amilaze imobilisane na MAG-PANI je viša čak za 20 °C od one imobilisane na nanočesticama cink-oksida, što ukazuje na povoljniju orijentaciju enzima tokom imobilizacije što stabilizuje konformaciju enzima kao i na povoljnije mikrokruženje enzima. Međutim, sa imobilisanim α -amilazom na metalnim nanočesticama postiže se više od devet puta veća maksimalna brzina reakcije, verovatno zbog manjih dimenzija čestica. Značajne razlike u vrednostima kinetičkih parametara imobilisane α -amilaze na nosačima MAG, MAG-PANI i cink(II)-oksida i istih parametara na različitim polimernim materijalima mogu biti posledica uticaja metalnih oksida na aktivnost imobilizata.

Tabela 2. Poređenje kinetičkih parametara i optimalnih vrednosti pH i temperature imobilisane α -amilaze u ovom radu sa literaturnim podacimaTable 2. Comparison of kinetic parameters and optimal pH and temperature values of immobilized α -amylase in the present work with literature data

Nosač/način imobilizacije	K_m / mg mL ⁻¹	V_m / mg min ⁻¹ mL ⁻¹	pH optimum/t optimum, °C	Referenca
Poli(metil metakrilat-akrilna kiselina)	31,37	$1,66 \times 10^{-3}$	6,5/55	[39]
aktiviran: karbodiimidom tionil hloridom/kovalentna	30,02	$1,61 \times 10^{-3}$	6,0/55	
Poli(metilmetakrilat-2-hidroksietil-metakrilat) aktiviran epihlorhidrinom	28,54	$2,89 \times 10^{-3}$	6,5/55	[40]
cijanuril-hloridom / kovalentna	15,50	$1,89 \times 10^{-3}$	6,5/55	
Poli(N-vinil piroolidon/itakonska kiselina)	3,88–5,02 ^a	$1,62-2,27 \times 10^{-3a}$	6,0/55	[41]
hidrogel/ adsorpcija				
Poli(akrilamid/maleinska kiselina)	12,3–12,9 ^b	$1,63-1,96 \times 10^{-3b}$	6,0/50	[42]
hidrogel/ adsorpcija				
Poli(dimer kiselina-ko-alkilpoliamin)	3,13	$6,16 \times 10^{-4}$	6,5/55	[43]
aktiviran karbodiimidom etilendiami-	3,47	$7,34 \times 10^{-4}$	6,5/55	
nom heksametilendiaminom /	3,17	$3,30 \times 10^{-4}$	8,0/55	
kovalentna				
Nanočestice cink-oksida/adsorpcija	2,08	2,92	6,5/30	[44]
Polianilin prah u vidu: -emeraldin soli/	2,15 mg mL	2,71 mg mL	4,5/35	[45]
adsorpcija kovalentna	0,83 mg mL	4,73 mg mL	5,5/40	
Emeraldin baze/ adosrpcija kovalentna	4,58 mg mL	2,23 mg mL	5,5/40	
	1,99 mg mL	3,80 mg mL	5,5/40	
MAG/adsorpcija	1,91	0,19	7,0/40	Ovaj rad
MAG-PANI/adsorpcija	1,48	0,32	6,8/50	Ovaj rad

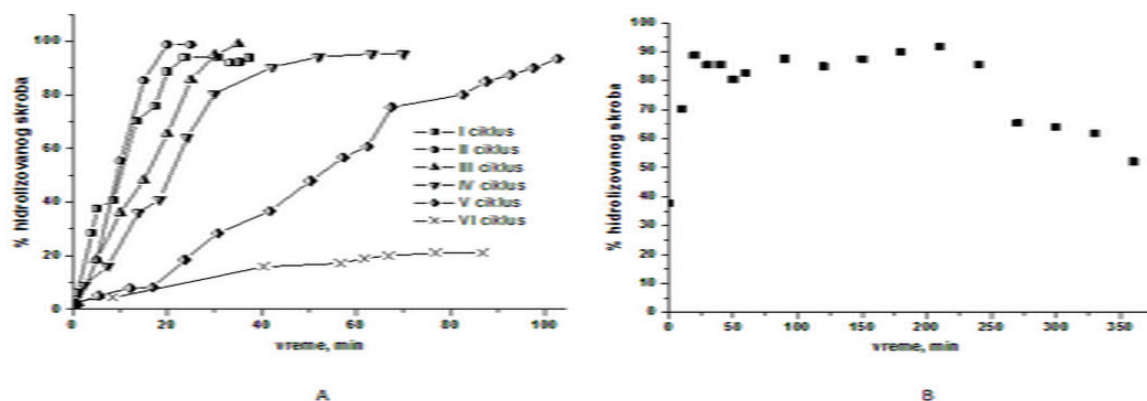
^aU zavisnosti od količine itakonske kiseline u hidrogelu; ^bu zavisnosti od količine maleinske kiseline u hidrogelu

Operativna aktivnost i stabilnost imobilisanog enzima

Operativna stabilnost biokatalizatora koja se meri u prisustvu supstrata i u uslovima koji se očekuju pri industrijskoj primeni imobilisanog enzima predstavlja najrelevantniji kriterijum ocene za njegovu praktičnu primenu. U radu smo ispitali operativnu stabilnost α -amilaze imobilisane na MAG i MAG-PANI česticama u protočnom reaktoru sa pakovanim slojem sa povratnim tokom i u istom reaktoru, ali bez povratnog toka u kon-

tinualnim uslovima. Rezultati su prikazani na slici 9.

Ispitivanjem aktivnosti imobilizata MAG-PANI-A u reaktoru sa pakovanim slojem sa povratnim tokom pri napred navedenim uslovima, pokazano je da u prvom ciklusu tokom 20,0 min reakcije dolazi do hidrolize 98,8% skroba. Imobilisani enzim je pokazao veliku aktivnost i tokom drugog i trećeg ciklusa, da bi u četvrtom ciklusu aktivnost opala tako da se nakon 52,0 min hidrolizuje 94,2% skroba. Međutim, do značajnijeg pada aktivnosti dolazi tek u petom ciklusu sa gotovo linear-

Slika 9. Operativna stabilnost α -amilaze imobilisane na MAG-PANI česticama u protočnom reaktoru sa pakovanim slojem (A) sa povratnim tokom i (B) bez povratnog toka u kontinualnim uslovima.Figure 9. Operational stability of α -amylase immobilized on MAG-PANI particles in (A) packed bed reactor with a recycle and (B) continuous packed bed reactor without recycling.

nim porastom % hidrolizovanog skroba tokom vremena. U tom slučaju tek nakon 102,8 min hidrolizuje 93,5% skroba. Za razliku od imobilizata MAG-PANI-A, imobilizat MAG-A onemogućio je protok supstrata kroz reaktor već kod uvođenja prve šarže u sistem, usled čega nije bilo moguće odrediti operativnu aktivnost i stabilnost ovog imobilizata. Polianilinska prevlaka na magnetnim česticama čini MAG-PANI-A pogodnijim imobilisanim sistemom za formiranje pakovanog sloja u reaktoru. Ranijim ispitivanjima utvrđeno je da MAG-PANI-A pokazuje dobru stabilnost u šaržnom reaktoru, pri čemu biokatalizator zadržava $55,5 \pm 1,6\%$ početne enzimske aktivnosti nakon 9 ciklusa upotrebe. Utvrđeno je takođe da navedeni imobilizat zadržava i $80,0 \pm 0,2\%$ početne aktivnosti nakon 50 dana čuvanja u fosfatnom puferu na temperaturi od $4\text{ }^\circ\text{C}$ [25]. Manja stabilnost imobilisanog enzima koja je dobijena u protočnim uslovima u ovom radu potencijalno se može objasniti većim spiranjem enzima sa nosača, naročito kada se enzim imobilize adsorpcijom. To je i eksperimentalno potvrđeno na osnovu merenja proteina u reciklirajućoj reakcionoj smeši (rezultati nisu prikazani). Međutim, ova ispitivanja nisu najrelevantnija za karakterizaciju stabilnosti enzima jer ispitivanja operativne stabilnosti enzima treba izvoditi pri konstantnoj koncentraciji supstrata i stepenu konverzije. Zbog toga, najbolje je ispitivati operativnu stabilnost imobilisanih enzima u reaktoru sa pakovanim slojem koji može da se uz određene aproksimacije predstavi kao idealni cevni reaktor. Rezultati su prikazani na slici 9B. Lako se uočava da je sistem stabilniji u ovom slučaju, najverovatnije zbog manjeg protoka i manjeg spiranja enzima sa nosača. Stepenu hidrolize skroba se nije menjao značajnije u toku 4 h rada reaktora i iznosio je $88,8 \pm 1,6\%$. Vreme polu-života biokatalizatora pri kontinualnim uslovima rada bilo je 6,2 h. S obzirom da veličina čestica i protok predstavljaju jedan od glavnih faktora koji utiču na operativnu aktivnost u protočnom reaktoru, cilj daljih ispitivanja biće iznalaženje optimalne veličine čestica nosača kao i protoka za efikasniju hidrolizu skroba.

Svojstva lake separacije iz reakcionog medijuma, mogućnost višekratne upotrebe, temperaturna i pH stabilnost i već poznate specifične osobine same polianilinske prevlake kao što su inertnost, stabilnost, provodljivost daju navedenom biokatalizatoru dimenziju višefunkcionalnosti i primenljivosti u najrazličitijim oblastima.

ZAKLJUČAK

Merenjem ceta potencijala nosača, kinetičkih parametara i operativne aktivnosti imobilisane α -amilaze iz *Bacillus licheniformis* utvrđeno je da polimerna prevlaka na MAG česticama povećava stabilnost nosača i poboljšava svojstva biokatalizatorskog sistema. Polianilinska prevlaka povećava pH i temperaturnu stabilnost

imobilizata MAG-PANI-A u odnosu na MAG-A, dok je MAG-A stabilniji u širem pH opsegu bez značajnijeg poboljšanja temperaturne stabilnosti u odnosu na nativnu α -amilazu. Trimodalna raspodela veličine čestica MAG-PANI u odnosu na bimodalnu raspodelu čestica MAG ukazuje na moguć nastanak samostalnih polianilinskih čestica koje ne oblažu MAG.

U protočnom reaktoru sa pakovanim slojem MAG-PANI-A sa povratnim tokom u prvom ciklusu nakon 20 min hidrolizovalo je $98,8\%$ skroba. Tokom petog ciklusa bilo je potrebno 102,8 min da hidrolizuje $93,5\%$ skroba. U kontinualnim uslovima rada reaktora sa istim imobilisanim enzimom stepen hidrolize skroba se nije menjao značajnije u toku 4 h i iznosio je $88,77 \pm 1,62\%$, a vreme polu-života biokatalizatora bilo je 6,2 h.

Pored mnogih prednosti oblaganja MAG čestica polianilinskom prevlakom, upotreba ovakvog biokatalizatorskog sistema posebno u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji otvara pitanje toksičnosti. Naime, nakon polimerizacije u sistemu mogu zaostati toksični monomeri i dimeri anilina. Dalja istraživanja treba usmeriti na detekciju, kvantifikaciju i ispitivanje načina uklanjanja ovih jedinjenja koja se tokom hidrolize skroba mogu naći u reakcionoj smeši i gotovom proizvodu.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na finansijskoj podršci ovih istraživanja (u okviru projekta III 46010).

LITERATURA

- [1] Liu Q, Kong X, Zhang C, Chen Y, Hua Y. Immobilisation of ahydroperoxide lyase and comparative enzymological studies of the immobilised enzyme with membrane-bound enzyme. *J. Sci. Food Agric.* 2013; 93: 1953-1959.
- [2] Kawaguti HY, Carvalho PH, Figueira JA, Sato HH. Immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in alginate-gelatin matrix and conversion of sucrose into isomaltulose using responsesurface methodology. *Enzyme Res.* 2011; 1: 1-8.
- [3] Güleç HA. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: effect of surface characteristics. *Colloids Surf., B.* 2013; 104: 83-90.
- [4] Bayramoglu G, Gursel I, Yilmaz M, Arica MY. Immobilization of laccase on itaconic acid grafted and Cu(II) ion chelated chitosan membrane for bioremediation of hazardous materials. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2012; 87: 530-539.
- [5] Wu H, Wang J, Kang X, Wang C, Wang D, Liu J, Aksay IA, Lin Y. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film. *Talanta.* 2009; 80: 403-406.
- [6] Hartono SB, Qiao SZ, Liu J, Jack K, Ladewig BP, Hao Z, Lu GQM. Functionalized mesoporous silica with very large

- pores for cellulase immobilization. *J. Phys. Chem.* 2010; 83: 8353–8362.
- [7] Mendes AA, Freitas L, de Carvalho AKF, de Oliveira PC, de Castro HF. Immobilization of a commercial lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by different strategies. *Enzyme Res.* 2011;2011: 1–8.
- [8] Tran DT, Chen CL, Chang JS. Immobilization of *Brukholderiasp.* lipase on a ferric nanocomposite for biodiesel production. *J. Biotech.* 2012; 158: 112–119.
- [9] Daly SM, Przybycien TM, Tilton RD. Adsorption of poly(ethylene glycol)-modified ribonuclease A to a poly(lactide-co-glycolide) surface. *Biotechnol. Bioeng.* 2005; 90: 856-868.
- [10] Pai SS, Przybycien TM, Tilton RD. Protein PEGylation attenuates adsorption and aggregation on a negatively charged and moderately hydrophobic polymer surface. *Langmuir.* 2010; 26: 18231-18238.
- [11] Rusmini F, Zhong Z, Feijen J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules.* 2007; 8: 1775-1789.
- [12] Kalkan NA, Aksoy S, Aksoy EA, Hasirci N. Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. *J. Appl. Polym. Sci.* 2012; 123: 707–716.
- [13] Kuroiwa T, Noguchi Y, Nakajima N, Sato S, Mukataka S, Ichikawa S. Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylose-coated magnetic nanoparticles. *Process Biochem.* 2008; 43: 62-69.
- [14] Konyushenko EN, Stejska IJ, Trchová M, Hradil J, Kovářová J, Prokeš J, Cieslar M, Hwang JY, Chen KH, Sapurina I. Multi-wall carbon nanotubes coated with polyaniline. *Polymer.* 2006; 47: 5715-5723.
- [15] Wang S, Bao H, Yang P, Chen G. Immobilization of trypsin in polyaniline-coated nano-Fe₃O₄/carbon nanotube composite for protein digestion. *Anal. Chim. Acta.* 2008; 612: 182–189.
- [16] Sohrabi N, Rasouli N, Torkzadeh M. Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Chem. Eng. J.* 2014; 240: 426–433.
- [17] Kuo CH, Liu YC, Chang CMJ, Chen JH, Chang C, Shieh CJ. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 2012; 87: 2538–2545.
- [18] Pessela BCC, Betancor L, Lopez-Gallego F, Torres R, Dellamora-Ortiz GM, Alonso-Morales N, Fuentes M, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Mateo C. Increasing the binding strength of proteins to PEI coated by immobilization at high ionic strength. *Enzyme Microb. Technol.* 2005; 37: 295-299.
- [19] Zhou W, Yu Y, Chen H, Di Salvo FJ, Abruña HD. Yolk-Shell Structure of Polyaniline-Coated Sulfur for Lithium-Sulfur Batteries. *J. Am. Chem. Soc.* 2013; 135 (44): 6736–16743.
- [20] Maciel JC, Mercês AAD, Cabrera M, Shigeyosi WT, Souza SD, Olzon-Dionysio M, Fabris JD, Cardoso CA, Neri DFM, Silva MPC, Carvalho LB, Jr. Magnetic nanoparticles coated with polyaniline to stabilize immobilized trypsin. *Hyperfine interact.* 2016; 237 (3): 3
- [21] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 2003; 38: 1599-1616
- [22] Khan MJ, Husain Q, Azam A. Immobilization of Porcine Pancreatic α -amylase on Magnetic Fe₂O₃ Nanoparticles: Applications to the Hydrolysis of Starch. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2012; 17: 377-384.
- [23] Hosseinipour SL, Khiabani MS, Hamishehkar H, Salehi R. Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe₃O₄ nanoparticles for potential application in food industries. *J. Nanopart. Res.* 2015;17: 382.
- [24] Tuzmen N, Kalburcu T, Denizli A. α -Amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: Optimization and characterization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2012; 78: 16–23.
- [25] Radovanović M, Jugović B, Gvozdenović M, Jokić B, Grgur B, Bugarski B, Knežević-Jugović Z. Immobilization of α -amylase via adsorption on magnetic particles coated with polyaniline. *Starch- Stärke.* 2016; 68: 427-435.
- [26] Neri DFM, Balcão VM, Dourado FOQ, Oliveira JMB, Carvalho JB, Jr, Teixeira JA. Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2011; 70, 74–80.
- [27] Gvozdenović M, Jugović B, Bezbradica D, Antov M, Knežević-Jugović Z, Grgur B. Electrochemical determination of glucose using polyaniline electrode modified by glucose oxidase. *Food Chem.* 2011; 124: 396–400.
- [28] Bezbradica D, Jugović B, Gvozdenović M, Jakovetić S, Knežević-Jugović Z. Electrochemically synthesized polyaniline as support for lipase immobilization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2011; 70: 55–60.
- [29] Yoo YJ, Hong J, Hatch RT. Comparison of α -amylase activities from different assay methods. *Biotechnol. Bioeng.* 1987; 30: 147–151.
- [30] Raita M, Arnthong J, Champreda V, Laosiripojana N. Modification of magnetic nanoparticle lipase designs for biodiesel production from palm oil. *Fuel Process. Technol.* 2015;134: 189–197.
- [31] Jiang J, Li L, Zhu M. Polyaniline/magnetic ferrite nanocomposites obtained by in situ polymerization. *React. Funct. Polym.* 2008; 68: 57–62.
- [32] Rana S, Jadhav NV, Barick KC, Pandey BN, Hassan PA. Polyaniline shell cross-linked Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for heat activated killing of cancer cells. *Dalton Trans.* 2014; 43: 12263-12271.
- [33] Wang J, Meng G, Tao K, Feng M, Zhao X. Immobilization of Lipases on Alkyl Silane Modified Magnetic Nanoparticles: Effect of Alkyl Chain Length on Enzyme Activity. *PLoS ONE.* 2012; 7(8): e43478. doi:10.1371/journal.pone.0043478
- [34] Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2002; 6: 319–327.
- [35] Temoc Z. Immobilization of α -amylase on reactive modified fiber and its application for continuous starch hyd-

- rolysis in a packed bed bioreactor. *Starch / Stärke*. 2014; 66: 376–384.
- [36] Baysal Z, Bulut Y, Yavuz M, Aytekin C. Immobilization of α -amylase via adsorption onto bentonite/chitosan composite: Determination of equilibrium, kinetics and thermodynamic parameters. *Starch / Stärke*. 2014; 66: 484–490.
- [37] Singh V, Rakshit K, Rathee S, Angmo S, Kaushal S, Garg P, Chung JH, Sandhir R, Sangwan RS, Singhal N. Metallic/bimetallic magnetic nanoparticle functionalization for immobilization of α -amylase for enhanced reusability in bio-catalytic processes. *Bioresour. Technol.* 2016; 214, 528-533.
- [38] Uygun DA, Öztürk N, Agköl S, Denizli A. Novel Magnetic Nanoparticles for the Hydrolysis of Starch with *Bacillus licheniformis* α -Amylase. *J. Appl. Polym. Sci.* 2012; 123, 2574-2581.
- [39] Aksoy S, Tümtürk H, Hasirci N. Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *J. Biotechnol.* 1998; 60: 37-46.
- [40] Tümtürk H, Aksoy S, Hasirci N. Covalent Immobilization of α -Amylase onto Poly(methyl methacrylate-2-hydroxyethyl methacrylate) Microspheres and the Effect of Ca^{2+} Ions on the Enzyme Activity. *Starch/Stärke*. 1999; 51: 211-217.
- [41] Tümtürk H, Çaykara T, Kantoğlu O, Güven O. Adsorption of α -amylase onto poly(*N*-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*. 1999; 151: 238-241.
- [42] Tümtürk H, Çaykara T, Şen M, Güven O. Adsorption of α -amylase onto poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels. *Radiat. Phys. Chem.* 1999; 55: 713-716.
- [43] Hasirci N, Aksoy S, Tümtürk H. Activation of poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of α -amylase. *React. Funct. Polym.* 2006; 66: 1546–1551.
- [44] Antony N, Balachandran S, Mohanan PV. Immobilization of diastase α -amylase on nano zinc oxide. *Food Chem.* 2016; 211: 624–630.
- [45] Ashly PC, Joseph MJ, Mohanan PV. Activity of diastase α -amylase immobilized on polyanilines (PANIs). *Food Chem.* 2011; 127: 1808-1813.

SUMMARY**POLYANILINE STABILIZATION OF MAGNETIC PARTICLES AND IMMOBILIZATION OF α -AMYLASE****Mirjana N. Radovanović¹, Milan P. Nikolić¹, Vesna M. Đurović¹, Branimir Z. Jugović², Milica M. Gvozdenović³,
Branimir N. Grgur³, Zorica D. Knežević-Jugović³**¹*University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Čačak, Serbia*²*Institute of Technical Sciences of the Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia*³*University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia*

(Scientific paper)

Magnetic particles (MAG), obtained by standard procedure of coprecipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} in an excess of ammonia, and polyaniline modified magnetic particles MAG-PANI were used as carriers for immobilization of α -amylase from *Bacillus licheniformis*. The formation of a polyaniline layer (PANI) on MAG particles was achieved by chemical polymerization of aniline. Immobilization was carried out by adsorption, as a simple, inexpensive and fast method that allows retention of a large portion of the initial activity of the immobilized enzyme. FTIR spectroscopy was used to characterize the obtained particles and to confirm changes due to formation of a PANI layer and conjugation of α -amylase on the particle surfaces. Particle size distribution was bimodal and three-modal for MAG and MAG-PANI, respectively. Appearance of a fraction of smaller MAG-PANI particles than MAG particles could be attributed to the formation of PANI particles without the MAG core. Measured values of Zeta potential for MAG-PANI were higher as compared to MAG indicating stabilization of particles in the presence of PANI. Relevant kinetic parameters for immobilized enzyme were determined from the Hanes plot. The apparent K_m constant was 1.91 and 1.48 g L^{-1} for MAG-A and MAG-PANI-A, respectively, while V_m was 0.19 $\text{g L}^{-1} \text{min}^{-1}$ for MAG and 0.32 $\text{g L}^{-1} \text{min}^{-1}$ for MAG-PANI. The obtained values of K_m indicated that modification of MAG by PANI enhanced kinetic properties of the immobilized enzyme. Moreover, the modification of MAG by PANI showed the increase in both pH and thermal stabilities of the immobilized enzyme. Studies of the operational activity of the immobilized enzyme on MAG-PANI have shown that 98.8% of starch was hydrolyzed over 20.0 min. In the first cycle in the packed bed reactor operated in a recycling mode, but approximately five times longer period was required to hydrolyze 93.5 of starch in the fifth cycle. In the continuous packed bed reactor without recycling, the degree of starch hydrolysis was not changed significantly during 4 h and was $88.8 \pm 1.6\%$, whereas the half-life of the biocatalyst was 6.2 h. Although coating MAG particles with a polyaniline offers many advantages, the main disadvantage is possible appearance of residues of aniline monomers and dimers. The potential toxicity of these residues requires precise composition analysis of the product of starch hydrolysis catalyzed by α -amylase adsorbed onto MAG-PANI.

Keywords: Adsorption • α -Amylase • Magnetic particles • Polyaniline • Zeta potential • FTIR