



**UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU**



Katedra za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju

Saša R. Savić

**ENZIMSKA MODIFIKACIJA KVERCETINA SA
CISTEINOM POMOĆU PEROKSIDAZE IZ RENA**

doktorska disertacija

Leskovac, 2015.



**UNIVERSITY OF NIS
FACULTY OF TECHNOLOGY LESKOVAC**



Department of food technology and biotechnology

Saša R. Savić

**ENZYMATIC MODIFICATION OF QUERCETIN
WITH CYSTEINE BY HORSERADISH PEROXIDASE**

doctoral thesis

Leskovac, 2015.

Podaci o mentoru i članovima komisije

Mentor:

Prof. dr Živomir Petronijević, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, Srbija

Članovi komisije:

dr Andrija Šmelcerović, vanredni profesor, Medicinski fakultet u Nišu, Univerzitet u Nišu, Srbija

Prof. dr Nada Nikolić, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, Srbija

Datum odbrane:_____

Ova doktorska disertacija je rađena na katedri za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Tehnološkog fakulteta u Leskovcu Univerziteta u Nišu.

Obrađivana problematika u ovoj tezi predstavlja deo istraživanja projekta TR-34012 koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

Izradom rada rukovodio je Prof. dr Živomir Petronijević, redovni profesor Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu, koji mi je svojim savetima pomagao u svim fazama izrade rada. Zato mu ovim putem izražavam iskrenu i najtopliju zahvalnost za svu pomoć, vreme, strpljenje, podršku i prijateljstvo.

Naročitu zahvalnost izražavam dr Andriji Šmelceroviću, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Nišu na pruženoj podršci, korisnim savetima i sugestijama pri izradi doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem Prof. dr Nadi Nikolić, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu, na velikom interesovanju i savetima koje mi je pružila tokom izrade doktorske disertacije.

Takođe, zahvaljujem se i kolegama sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu na podršci i korisnim savetima.

SADRŽAJ

Skraćenice i simboli	IX
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	4
2.1. Flavonoidi	4
2.1.1. Podela flavonoida	5
2.1.2. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost flavonoida	7
2.1.2.1. Mehanizam direktnog sakupljanja ROS-a	7
2.1.2.2. Mehanizam aktivacije antioksidativnih enzima	9
2.1.2.3. Mehanizam metalo-helatne aktivnosti	10
2.1.2.4. Mehanizam smanjenja α -tokoferol radikala	10
2.1.2.5. Mehanizam inhibicije oksidaza	11
2.1.2.6. Mehanizam ublažavanja oksidativnog stresa prouzrokovanog azot monoksidom	11
2.1.2.7. Mehanizam povećanja nivoa mokraćne kiseline	12
2.1.3. Metabolizam flavonoida	12
2.1.4. Primena flavonoida	14
2.1.5. Neželjena dejstva flavonoida	15
2.1.6. Kvercetin	16
2.2. Enzimi	17
2.2.1. Kinetika enzimskih reakcija	18
2.2.1.1. Kinetika jednosupstratnih reakcija	18
2.2.1.1.1. Michaelis-ova teorija ravnotežnog stanja	18
2.2.1.1.2. Teorija stacionarnog stanja	21
2.2.1.2. Kinetika dvosupstratnih enzimskih reakcija	22
2.2.1.3. Kinetika trosupstratnih enzimskih reakcija	25
2.2.1.4. Utvrđivanje kinetičkog mehanizma	26
2.2.1.5. Određivanje K_m i V_{max}	27
2.2.2. Oksidoreduktaze	29
2.2.2.1. Peroksidaza	30
2.3. Oksidacija flavonoida pomoću enzima	31
2.4. Enzimaska modifikacija flavonoida	36
2.5. Imobilizacija enzima	37
2.5.1. Nosači za imobilizaciju enzima	38
2.5.1.1. Organski polimerni nosači	38
2.5.1.1.1. Polisaharidni nosači	38
2.5.1.1.2. Prirodni proteinski nosači	39
2.5.1.2. Polimeri na bazi akrilne kiseline	40
2.5.1.3. Ostali sintetički polimerni nosači	40
2.5.1.4. Neorganski nosači za imobilizaciju enzima	40
2.5.2. Metode imobilizacije enzima	40
2.5.2.1. Kovalentno vezivanje enzima za nerastvorne nosače	41
2.5.2.2. Imobilizacija enzima sa umrežavajućim agensima	43
2.5.2.3. Imobilizacija polimerizacijom predhodno modifikovanih enzima	44
2.5.2.4. Imobilizacija enzima adsorpcijom na nerastvornim nosačima	44
2.5.2.5. Imobilizacija enzima ugrađivanjem u matrice polimera, membrane i mikrokapsule	45
2.5.3. Uticaj imobilizacije na svojstva enzima	46
2.5.4. Sačuvana aktivnost	46
2.5.5. Difuzioni efekti	48

2.5.6. Sterni efekti.....	49
2.5.7. Uticaj mikrookruženja	49
2.5.8. Uticaj imobilizacije na stabilnost enzima	50
3. EKSPERIMENTALNI DEO	51
3.1. Materijali i pribor	51
3.2. Korišćeni rastvori.....	52
3.3. Izvođenje enzimskih reakcija.....	53
3.4. HPLC hromatografija.....	54
3.5. UHPLC-DAD-HESI-MS/MS analiza	54
3.6. Određivanje kinetičkog mehanizma reakcije	55
3.7. Sintaza nosača za imobilizaciju enzima	56
3.8. Određivanje stepena acilovanja celuloznih nosača	56
3.9. Imobilizacija peroksidaze iz rena.....	56
3.10. Određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena	57
3.11. Određivanje aktivnosti imobilisane peroksidaze iz rena	57
3.12. Određivanje sadržaja proteina.....	58
4. REZULTATI I DISKUSIJA	59
4.1. Oksidacija kvercetina pomoću HRP	59
4.1.1 Identifikacija nastalih proizvoda u reakciji oksidacije kvercetina pomoću HRP	60
4.2. Oksidacija kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina	65
4.2.1. Identifikacija nastalih proizvoda u reakciji oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina	67
4.3. Ispitivanje kinetičkog mehanizma reakcije enzimske modifikacije kvercetina sa cisteinom pomoću HRP	69
4.4. Optimizacija reakcije modifikacije kvercetina sa cisteinom pomoću HRP	77
4.4.1. Uticaj temperature na reakciju modifikacije kvercetina	80
4.4.2. Uticaj pH vrednosti na reakciju modifikacije kvercetina	80
4.4.3. Uticaj koncentracije kvercetina na reakciju modifikacije kvercetina	81
4.4.4. Uticaj koncentracije cisteina na reakciju modifikacije kvercetina	82
4.4.5. Uticaj koncentracije vodonik peroksida na reakciju modifikacije kvercetina	83
4.4.6. Uticaj organskih rastvarača na reakciju modifikacije kvercetina	84
4.5. Imobilizacija HRP preko hidrofobnih interakcija	86
4.5.1. Optimizacija reakcije modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP	95
4.5.1.1. Uticaj temperature na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP	96
4.5.1.2. Uticaj pH na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP	97
4.5.1.3. Uticaj kvercetina na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP	98
4.5.1.4. Uticaj L-cisteina na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP	99
4.5.1.5. Uticaj vodonik peroksida na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP	100
5. ZAKLJUČAK	102
6. LITERATURA.....	105
PRILOG	114
BIOGRAFIJA	150
BIBLIOGRAFIJA RADOVA.....	152

ENZIMSKA MODIFIKACIJE KVERCETINA SA CISTEINOM POMOĆU PEROKSIDAZE IZ RENA

REZIME

U ovoj disertaciji ispitivana je modifikacija kvercetina sa L-cisteinom pomoću peroksidaze iz rena. Na početku eksperimentalnog rada ispitivan je proces oksidacije kvercetina pomoću peroksidaze iz rena, a nakon toga i proces oksidacije kvercetina pomoću peroksidaze iz rena u prisustvu L-cisteina kao nukleofilnog agensa. Dobijeni proizvodi oksidacije identifikovani primenom nove UHPLC-DAD-HESI-MS/MS metode. Pored identifikacije nastalih proizvoda ispitivan je i kinetički mehanizam enzimske reakcije modifikacije kvercetina. U završnom delu eksperimentalnog rada urađena je imobilizacija peroksidaze iz rena pomoću hidrofobnih interakcija, i izvršena optimizacija reakcije modifikacije kvercetina primenom imobilisane peroksidaze.

Rezultati ispitivanja oksidacije kvercetina pomoću peroksidaze iz rena su pokazali da se u reakciji stvara preko 10 različitih jedinjenja, a među identifikovanim jedinjenjima nalaze se hinoni kvercetina i njegovi derivati, floroglucinol karboksilna kiselina, protokatehuinska kiselina, heterodimer kvercetina i njegovi derivati. Sa druge strane, ispitivanja oksidacije kvercetina pomoću peroksidaze iz rena u prisustvu L-cisteina su pokazala da u reakciji dolazi do stvaranja dva nova jedinjenja koja predstavljaju cisteinil-kvercetinske adukte. Takođe, utvrđeno je da L-cistein ima sposobnost da sakuplja prethodno stvorene oksidacione proizvode kvercetina (ROS), što može biti od izuzetnog značaja ukoliko se uzmu u obzir neželjeni efekti koji nastaju kao rezultat dejstva ROS-a.

Rezultati ispitivanja kinetičkog mehanizma reakcije modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP su pokazali da se proces modifikacije kvercetina odvija po usaglašenom kinetičkom mehanizmu.

Optimizacija reakcije modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP je pokazala da se pri temperaturi od 35 °C i pH 6,8 dobija najveća količina modifikovanih proizvoda kvercetina. Pored toga, rezultati ispitivanja uticaja koncentracije kvercetina i L-cisteina su pokazali da je prilikom izvođenja reakcije potrebno voditi računa da oba supstrata budu u odnosu približno 1:1. Sa druge strane, rezultati ispitivanja uticaja vodonik peroksida su pokazali da je najveća količina modifikovanih proizvoda kvercetina stvorena pri koncentraciji od 0,26 mM, dok je pri većoj koncentraciji vodonik peroksida prisutan inhibirajući efekat na HRP.

Ispitivanja uticaja prisustva organskih rastvarača u reakcionoj smeši su pokazala da se u prisustvu 5% DMSO u reakcionoj smeši od 5 ml dobija približno 9,5 puta veća količina cisteinil-kvercetinog adukta. Očekivana količina stvorenog modifikovanog kvercetina u reakcionoj smeši od 100 ml je oko 27 mg.

Rezultati optimizacije reakcije modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP su pokazali nešto manju količinu cisteinil-kvercetinog adukta pri optimalnim vrednostima u odnosu na slučaj kada je korišćena slobodna HRP, što je verovatno rezultat manje početne aktivnosti imobilisane HRP. Sa druge strane, pri nešto drastičnijim uslovima količina stvorenih cisteinil-kvercetinskih adukata kada je u reakciji korišćena imobilisana HRP je bila veća u odnosu na to kada je u reakciji korišćena neimobilisana HRP, što je rezultat povećane stabilnosti imobilisane HRP. Iako je količina stvorenih cisteinil-kvercetinskih adukata bila nešto veća u slučaju kada je u reakciji modifikacije korišćena slobodna HRP, prednost ipak treba dati imobilisanoj HRP, pre svega zbog niza prednosti koje ona sa sobom nosi. Dobijene optimalne vrednosti temperature, pH vrednosti, koncentracije kvercetina, L-cisteina i vodonik peroksida za dobijanje cisteinil-kvercetinog adukta kada je u reakciji korišćena imobilisana HRP su: 37 °C, 7, 0,14 mM, 0,15 mM i 0,26 mM, respektivno.

Ključne reči: Peroksidaza iz rena; Kvercetin; L-cistein; Oksidacija; Modifikacija

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Prehrambene tehnologije i biotehnologija

UDC:547.972.3+377.386:577.152.1

ENZYMATIC MODIFICATION OF QUERCETIN WITH CYSTEINE BY HORSERADISH PEROXIDASE

ABSTRACT

In this thesis the modification of quercetin with L-cysteine by horseradish peroxidase (HRP) was investigated. At the beginning of the experimental work, the process of quercetin oxidation by HRP was investigated, and after that the process of quercetin oxidation by HRP in the presence of L-cysteine as a nucleophile agent was studied. Obtained products of quercetin oxidation by HRP were identified by using the new UHPLC-HESI-DAD-MS/MS method. In addition, the kinetic mechanism of the enzymatic reaction of quercetin modification was also examined. In the final part of the experimental work, immobilization of HRP through hydrophobic interaction was done, and reaction of quercetin modification with immobilized HRP was optimized.

Results of quercetin oxidation with HRP revealed the presence of more than ten different compounds, and among the identified compounds there were: quercetin quinones and its derivatives, phloroglucinol carboxylic acid, protocatechuic acid, quercetin heterodimer and its derivatives. On the other hand, results from quercetin oxidation by HRP in the presence of L-cysteine demonstrated that the reaction leads to the formation of two new compounds which are identified as cysteinylquercetin adducts. Also, it was found that L-cysteine has the ability to capture previously formed products of quercetin oxidation (ROS), which can be of great importance if we take into account the adverse effects that occur as a result of ROS effects.

Results from investigations of the kinetic mechanism of reaction of quercetin modification with L-cysteine by HRP showed that the modification process was performed as ordered kinetic mechanism.

Optimization of the reaction of quercetin modification with L-cysteine by HRP showed that at the temperature of 35 °C and pH 6.8 the greatest amount of cysteinylquercetin adducts were obtained. In addition, the results from investigations of influence of quercetin and L-cysteine concentrations on the reaction of modification revealed that it is necessary that both substrates are present in a ratio of 1:1. On the other hand, the results from testing the effects of hydrogen peroxide concentration on the reaction of quercetin modification showed that the highest amount of modified products at 0.26 mM was obtained, whereby at higher concentrations of hydrogen peroxide inhibitory effect on HRP was observed.

Investigations of the presence of organic solutions in reaction mixture of 5 ml showed that in the presence of 5% DMSO, the amount of cysteinylquercetin adducts were 9.5-fold higher. Expected generated amount of cysteinylquercetin adducts in reaction mixture of 100 ml was about 27 mg.

Results from optimization of reaction of quercetin modification by immobilized HRP demonstrated a slightly lower amount of cysteinylquercetin adducts at optimal values when compared to their amount obtained in the reaction with free HRP, which is probably a result of initial lower activity of immobilized HRP. On the other hand, in the presence of immobilized HRP at more drastic reaction conditions, amount of cysteinylquercetin adducts was higher then in the presence of free HRP, which could be explained by higher stability of immobilized HRP.

Although the amount of generated cysteinylquercetin adducts were slightly higher in the case when free HRP was used in the reaction of quercetin modification, immobilized HRP could still be advantageous, primarily due to the number of advantages that it brings. The optimum values of temperature, pH and quercetin, L-cysteine and hydrogen peroxide concentrations to obtain cysteinylquercetin adducts when in reaction mixture immobilized HRP were: 37 °C, 7.0, 0.14 mM, 0.15 mM and 0.26 mM, respectively.

Keywords: Horseradish peroxidase; Quercetin; L-cysteine; Oxidation; Modification

Scientific field: Technological engineering

Scientific Area: Food Technology and Biotechnology

UDC:547.972.3+377.386:577.152.1

Skraćenice i simboli

- A (U/ml) – aktivnost enzima
- •AH – slobodni radikal
- AE-sefadeks – aminoetil sefadeks
- AH₂ – aromatično jedinjenje
- ATP – adenzin trifosfat
- BC – benzoil celuloza
- BSA – albumin iz goveđe krvi
- CC – cinamoil celuloza
- CK – kreatinin kinaza
- CM – karboksimetil
- CoA – koenzim A
- DAD – diode array detektor
- DEAE sefadex – dietilaminoetil sefadex
- DMSO – dimetil sulfoksid
- DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
- E – enzim
- [E] – koncentracija enzima
- [E]₀ – početna koncentracija enzima
- EC – estar celuloze
- EC i TAA – estar celuloze i timol sirćetne kiseline
- EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina
- EMA – kopolimer etilen-anhidrid maleinske kiseline
- E₀ – ukupna količina enzima
- ES – enzim supstratni kompleks
- Fl-O• – fenoksi radikal flavonoida
- HESI – elektrosprej jonizacija sa zagrevanjem
- HPLC – tečna hromatografija pod visokim pritiskom
- HRP – peroksidaza iz rena
- HRP-I – aktivni intermedijerni oblik HRP
- HRP-II – aktivni intermedijerni oblik HRP
- IL – interleukin

- k – konstanta brzine reakcije
- k_{+1}, k_{+2} – konstante brzine stadijuma enzimске reakcije
- k_{-1}, k_{-2} – konstante brzine uzastopnih stadijuma enzimске reakcije u obrnutom smeru
- K_m – Michaelis-ova konstanta
- K_s – konstanta disocijacije ES kompleksa (supstratna konstanta)
- LC-MS – tačna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom
- LDL – lipoprotein niske gustine
- λ_{max} – talasna dužina na kojoj supstrat pokazuje maksimum apsorpcije
- MBTH – 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon
- $NAD^+/NADH$ – nikotinamid adenin dinukleotid
- $NADP^+/NADPH$ – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
- NF- κ B – jedarni faktor kapa B
- NOS – azot monoksid sintetaza
- P i Q – proizvodi reakcije
- PA Cel – fenoksiacetil celuloza
- PDA – photo diode array
- POD – peroksidaza
- PPO – polifenol oksidaza
- QAE-sefadeks – dietil-(2-hidroksipropil) aminoetil sefadeks
- $R^\bullet$ – slobodan radikal
- ROS – reaktivne kiseonične vrste
- RP – reverzna faza
- $RS^\bullet$ – tiolni radikal
- S – supstrat
- [S] – koncentracija supstrata
- $[S]_0$ – početna koncentracija supstrata
- SP-sefadeks – sulfopropil sefadeks
- TNF – tumor nekroza faktor
- t_R – retenciono vreme
- UDP – uridin difosfat
- UHPLC – tačna hromatografija pod ultra visokim pritiskom
- UVA – ultravioletno zračenje

- v – brzina enzimske reakcije
- V_{max} – maksimalna brzina enzimske reakcije

1. UVOD

Flavonoidi ili bioflavonoidi (vode poreklo od latinske reči *flavus*-žuto) spadaju u jednu od najbrojnijih i najbolje proučenih grupa biljnih polifenola i sastavni su deo svakodnevne ishrane ljudi (Chung i sar., 2003; Awad i sar., 2002; Galati i sar., 2001; Galati i sar., 1999; Procházková i sar., 2011). Flavonoidi su prisutni skoro u svim biljkama, ali se za njihove glavne izvore smatraju voće, povrće, lekovite biljke, čaj i vino (Miura i sar., 2003; Nijveldt i sar., 2001; Hosseini-mehr, 2010). Do sada je identifikovano više od 4000 vrsta flavonoida, i mnogi od njih su odgovorni za boju cvetova, lišća, plodova i dr. (Nijveldt i sar., 2001; Hosseini-mehr, 2010; Procházková i sar., 2011). Eksperimentalna istraživanja su pokazala da flavonoidi poseduju brojne biološke i farmakološke efekte uključujući antioksidativne, antimutagene, antikancerogene, antiulcerne, probiotske, antimikrobne, antialergijske, antiviralne i antiinflamatorne osobine (Galati i sar., 2001; Procházková i sar., 2011; Takahama, 1988).

Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) je jedan od najpoznatijih polifenola biljnog porekla, koji se široko upotrebljava u ljudskoj ishrani (Awad i sar., 2000; Omololu i sar., 2011; Sánchez-Gallego i sar., 2010). S obzirom da kvercetin poseduje antioksidativna svojstva, često se upotrebljava kao dodatak hrani i preporučuje se za sprečavanje i suzbijanje mnogih bolesti koje su u bliskoj vezi sa oksidativnim stresom (Cherviakovsky i sar., 2006; Makris i Rossiter, 2002). Međutim, iako kvercetin poseduje visoku antioksidativnu aktivnost, u nekim slučajevima kvercetin, kao i ostali flavonoidi, može delovati i prooksidativno (Awad i sar., 2000; Metodiewa i sar., 1999; Nijveldt i sar., 2001). Ovakvo delovanje flavonoida je moguće zbog prisustva kateholnog dela u strukturi koji pruža mogućnost za efikasnu autooksidaciju i/ili enzimsku jednoelektronsku ili dvoelektronsku oksidaciju, koja dovodi do stvaranja semihinona i drugih reaktivnih elektrofilnih orto-hinona koji predstavljaju reaktivne kiseonične vrste (ROS) (Awad i sar., 2002; Bolton i sar., 1998; Boersma i sar., 2000; Khlebnikov i sar., 2007).

Peroksidaze spadaju u grupu enzima koja je u velikoj meri rasprostranjena u prirodi. Većina peroksidaza spada u hemoproteine, jer sadrže gvožđe (III) protoporfirin IX (feriprotoporfirin IX) kao prostetičnu grupu. Familija peroksidaza obuhvata kvašćevu citohrom c peroksidazu, biljnu askorbat peroksidazu, mijelo i laktoperoksidazu, peroksidaze iz gljiva, i druge klasične biljne peroksidaze (Fenoll i sar., 2003; Kabeya i sar., 2007; Osman i sar., 2008).

Usled velikog prisustva flavonoida i nekih oksidaza (peroksidaza i polifenol oksidaza) u biljkama lako dolazi do oksidacije flavonoida i drugih fenolnih jedinjenja (Pourcel i sar., 2007). Metaboliti dobijeni posredstvom peroksidaze, načešće su posledica reakcija oligopolimerizacije, koje se javljaju pod dejstvom peroksidaze koja katalizuje jednoelektronsku oksidaciju flavonola (Gülşen i sar., 2007). Iako peroksidaze normalno daju jednoelektronsku oksidaciju, reakcioni putevi često uključuju i drugu elektronsku oksidaciju i/ili dismutaciju flavonoidnih semihinonskih radikala, koji dovode do intermedijera hinonskog tipa (Awad i sar., 2000). Pored toga, treba imati u vidu da su semihinoni i hinoni visoko reaktivne vrste koje se mogu stvoriti i u reakciji bez prisustva enzima. Ne-enzimske oksidacije flavonoida, kao što su autooksidacija i hemijska oksidacija, takođe mogu dovesti do formiranja hinonskih jedinjenja. Kroz oksidacione reakcije, hinoni mogu da oksidišu druge polifenole, koji se ne mogu direktno oksidovati pod dejstvom enzima, čime se formiraju sekundarni hinoni, koji na kraju doprinose formiranju heterogenih polimera (Fischer i sar., 1984).

Imajući u vidu da flavonoidi poseduju antioksidativna, ali u nekim slučajevima i štetna prooksidativna svojstva, nameće se potreba za novim istraživanjima u cilju stabilizacije kvercetina i sprečavanja njegovog neželjenog prooksidativnog dejstva u živim sistemima. S obzirom da se oksidacijom kvercetina stvaraju jedinjenja tipa semi- i orto-hinona koja imaju elektrofilna svojstva, otvara se mogućnost ispitivanja oksidacije kvercetina u prisustvu nekog od nukleofila koji će se zajedno sa ćelijskim makromolekulima „boriti“ za prethodno stvorene semi- i orto-hinone i na taj način smanjiti neželjena dejstva stvorenih radikala. Cistein, kao semi-esencijalna α -aminokiselina koja je prisutna u biljnim tkivima i čovekovom organizmu, predstavlja dobar potencijal za upotrebu u svojstvu nukleofilnog agensa koji bi reagovao sa kvercetinom, jer cistein u svojoj strukturi poseduje tiolnu grupu koja se često koristi kao nukleofil u enzimskim reakcijama. Pored tiolne, cistein poseduje još dve hidrofilne grupe (amino i karboksilnu), koje pružaju mogućnost da se adicijom sa kvercetinom stvore nova jedinjenja koja će imati bolju rastvorljivost u vodenim rastvorima, a uz to će zadržati sve pozitivne osobine kvercetina.

Predmet rada ove doktorske disertacije je bio ispitivanje enzimske modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću peroksidaze iz rena. Najpre je izvršena modifikacija kvercetina sa L-cisteinom pomoću peroksidaze iz rena, a zatim je određen kinetički mehanizam date reakcije. Pored toga, razvijena je nova LC/MS metoda za identifikaciju dobijenih proizvoda u reakciji modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću peroksidaze iz rena. Nakon toga, urađena je imobilizacija peroksidaze iz rena na različitim hidrofobnim

nosačima, a zatim i karakterizacija imobilisanog enzima, kao i optimizacija reakcije modifikacije kvercetina sa imobilisanim enzimom. Na kraju, definisani su optimalni uslovi za dobijanje novih modifikovanih proizvoda kvercetina.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Flavonoidi

Tokom proteklih 10 godina, istraživači i proizvođači su postali sve više zainteresovani za polifenole, supstance biljnog porekla koje pokazuju niz bioloških aktivnosti. Glavni razlog za povećano interesovanje je bila prisutnost polifenola u ljudskoj ishrani, kao i njihova uloga u sprečavanju raznih bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom (Gülşen i sar., 2007; Walle i sar., 2003).

Flavonoidi ili bioflavonoidi (vode poreklo od latinske reči „flavus“ što znači žuto) su jedna od najbrojnijih i najbolje proučenih grupa biljnih polifenola koji se obično javljaju u biljkama i sastavni su deo svakodnevne ishrane ljudi (Procházková i sar., 2011; Galati i sar., 2001; Awad i sar., 2000; Awad i sar., 2002; Chung i sar., 2003). Do sada je identifikovano više od 4000 vrsta flavonoida, i mnogi od njih su odgovorni za boju cvetova, lišća, plodova i dr. (Nijveldt i sar., 2001; Hosseinimehr, 2010; Procházková i sar., 2011).

Zbog stabilnosti flavonoida na UV svetlost i njihove lokalizacije u epidermalnim ćelijama smatra se da oni imaju ulogu filtera UV svetlosti (Takahama, 1988). Takođe, flavonoidi imaju i osobinu da stabilizuju membrane i da utiču na neke procese intermedijernog metabolizma (Yang i sar., 2008).

Flavonoidi su prisutni skoro u svim biljkama, ali su njihovi glavni izvori voće, povrće, lekovite biljke, čaj i vino (Galati i sar., 2000; Awad i sar., 2000; Nijveldt i sar., 2001; Hosseinimehr, 2010; Miura i sar., 2003). Kvercetin se javlja u namirnicama biljnog porekla, gde je njegov nivo u hrani obično ispod $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, osim u luku, kelju, brokoli, pasulju, jabukama i kajsijama, gde se njegov sadržaj kreće između 20 i $490 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Unos flavonola hranom varira između različitih zemalja i kreće se u rasponu od 6 do 60 mg na dan (npr. u Holandiji je približno 26 mg/d) (Galati i sar., 2000; Rawel i sar., 2003).

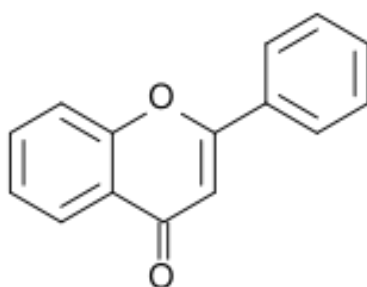
Nepravilna obrada biljnog materijala i proizvoda nakon ubiranja, kao i nepravilno skladištenje, u nekim slučajevima mogu dovesti do oksidacije određenih komponenti, koje mogu da utiču na ukupan kvalitet hrane. „Brauning“, koji nastaje kao rezultat polifenolne oksidacije, javlja se u namirnicama biljnog porekla, i generalno se smatra štetnim procesom, jer može dovesti do stvaranja neželjenih organoleptičkih karakteristika, koje mogu negativno da utiču na hranljivu vrednost proizvoda. Međutim, u nekim slučajevima se kod biljaka koje u sebi sadrže polifenole (flavonoide) većina karakteristika koje definišu kvalitet robe intenzivno proizvode upravo oksidacijom. Tako se na primer oksidacijom kod crnog čaja

formiraju teaflavini (Makris i Rossiter, 2002; Jiménez-Atiéndzar i sar., 2005; Ghidouche i sar., 2008).

Za flavonoidne glikozide se veruje da su lokalizovani na hidrofilnim regionima kao što su vakuole (Takahama, 1986 i 1988), dok su neglikozidni flavonoidi smešteni u hidrofobnim delovima kao što su masne žlezde i slojevi voska (Takahama, 1988). Aglikoni flavonola se obično ne javljaju u svežim biljkama, ali se mogu pojaviti kao rezultat prerade hrane. Šećeri su uglavnom vezani za flavonoidno jezgro preko glikozidne veze. Molekuli šećera se mogu vezati na različitim pozicijama u matičnom flavonoidu, mada postoji sklonost ka C3 položaju. Do sada je u prirodi opisano samo oko 179 različitih glikozida kvercetina, uključujući rutin (kvercetin-3-*O*-ramnozilglukozid) koji je jedan od najpoznatijih. Na osnovu ispitivanja Rawel i njegovih saradnika (2003), poznato je da je apsorpcija glikozida kvercetina kod ljudi u opsegu između 20 i 50%. Takođe, poznato je da šećerni deo predstavlja važnu determinantu za bioraspoloživost flavonola, kao i da prisustvo glukozidnog pola značajno povećava apsorpciju i to bez prethodne hidrolize mikroorganizmima (Rawel i sar., 2003).

2.1.1. Podela flavonoida

Flavonoidi su benzo- γ -pironski derivati koji se sastoje od 15 ugljenikovih atoma poređanih u tri prstena koja čine difenolpropanski skelet ($C_6-C_3-C_6$) (slika 2.1) (Makris i Rossiter, 2002; de Oliveira i sar., 2006).



Slika 2.1 Strukturna formula flavona.

U zavisnosti od njihove strukture flavonoidi se dele na različite klase: flavone, flavanone, katehine i antocijanine (tabela 2.1) (Makris i Rossiter, 2002; Sivaramakrishnan i sar., 2008).

Tabela 2.1 Najpoznatiji predstavnici flavonoida i njihovi izvori

Grupa	Jedinjenje	Izvor hrane
Flavoni		Kora jabuke
	Apigenin	Jagodičasto voće
	Krisin	Celer
	Kempferol	Voćni piling
	Luteolin	Brusnica
	Miricetin	Grožđe
	Rutin	Zelena salata
	Kvercetin	Ulja
		Luk
		Peršun
Flavanoni	Fisetin	
	Hesperetin	
	Naringin	Limun
	Naringenin	Kora limuna
	Taksifolin	
Katehini	Katehin	
	Epikatehin	Crveno vino
	Epigallocatehin galat	Čaj
Antocijanini		Jagodičasto voće
	Cijanidin	Trešnje
	Delfinidin	Grožđe
	Malvidin	Maline
	Pelargonidin	Crveno grožđe
	Peonidin	Crveno vino
	Petunidin	Jagode
		Čaj
		Voćni piling sa tamnim pigmentima

2.1.2. *In vitro* antioksidativna aktivnost flavonoida

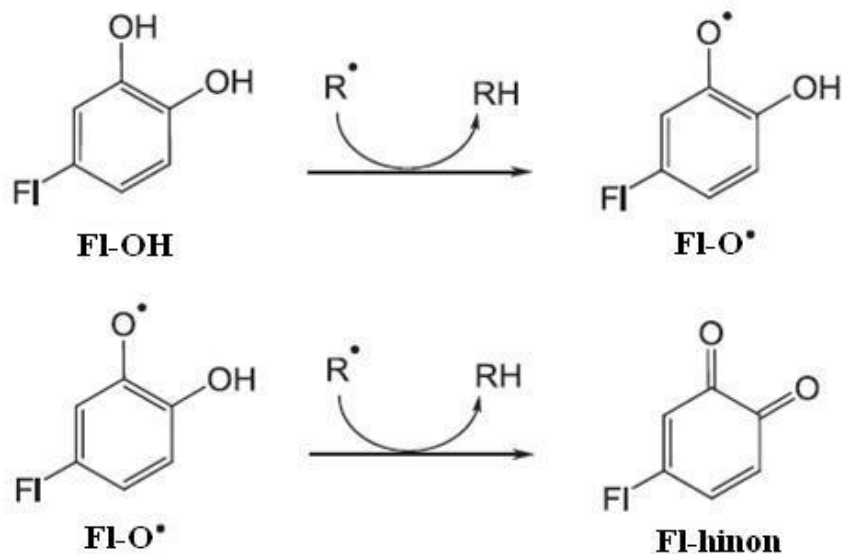
Na osnovu prethodnih ispitivanja sprovedenih od strane Procházkove i njenih saradnika (2011) može se zaključiti da je antioksidativni kapacitet mnogih flavonoida mnogo veći od antioksidativnog kapaciteta vitamina C i E. Na primer, jedno-elektronski redukcionni potencijal epigalokatehin galata pod standardnim uslovima je između 550 i 920 mV što je znatno više u poređenju sa na primer α -tokoferolom, čiji jedno-elektronski redukcionni potencijal iznosi 480 mV. Sposobnost flavonoida da sprečavaju nastanak oboljenja izazvanih prisustvom slobodnih radikala zasniva se na nekom od sledećih mehanizama:

- direktno sakupljanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS),
- aktiviranje antioksidantnih enzima,
- metalo helatna aktivnost,
- smanjenje α -tokoferol radikala,
- inhibicija oksidaza,
- ublažavanje oksidativnog stresa koji je izazvan azot oksidom,
- povećanje mokraćne kiseline,

2.1.2.1. Mehanizam direktnog sakupljanja ROS-a

Flavonoidi su u stanju da sakupljaju slobodne radikale direktno od donora atoma vodonika. Nakon interakcije sa flavonoidima radikali postaju neaktivni u skladu sa šemom prikazanoj na slici 2.2., gde $R\bullet$ predstavlja slobodan radikal, a $Fl-O\bullet$ je fenoksi radikal flavonoida (Procházková i sar., 2011).

In vitro antioksidativna aktivnost flavonoida najviše zavisi od rasporeda funkcionalnih grupa u njegovoj osnovnoj strukturi. Konfiguracija i ukupan broj hidroksilnih grupa takođe značajno utiče na mehanizam antioksidativne aktivnosti. Ispitivanja su pokazala da je konfiguracija hidroksilnih grupa u prstenu B najznačajnija za sakupljanje ostataka ROS-a, dok supstitucija prstena A i C ima mali uticaj na konstantu brzine skupljanja superoksid anjonskih radikala.

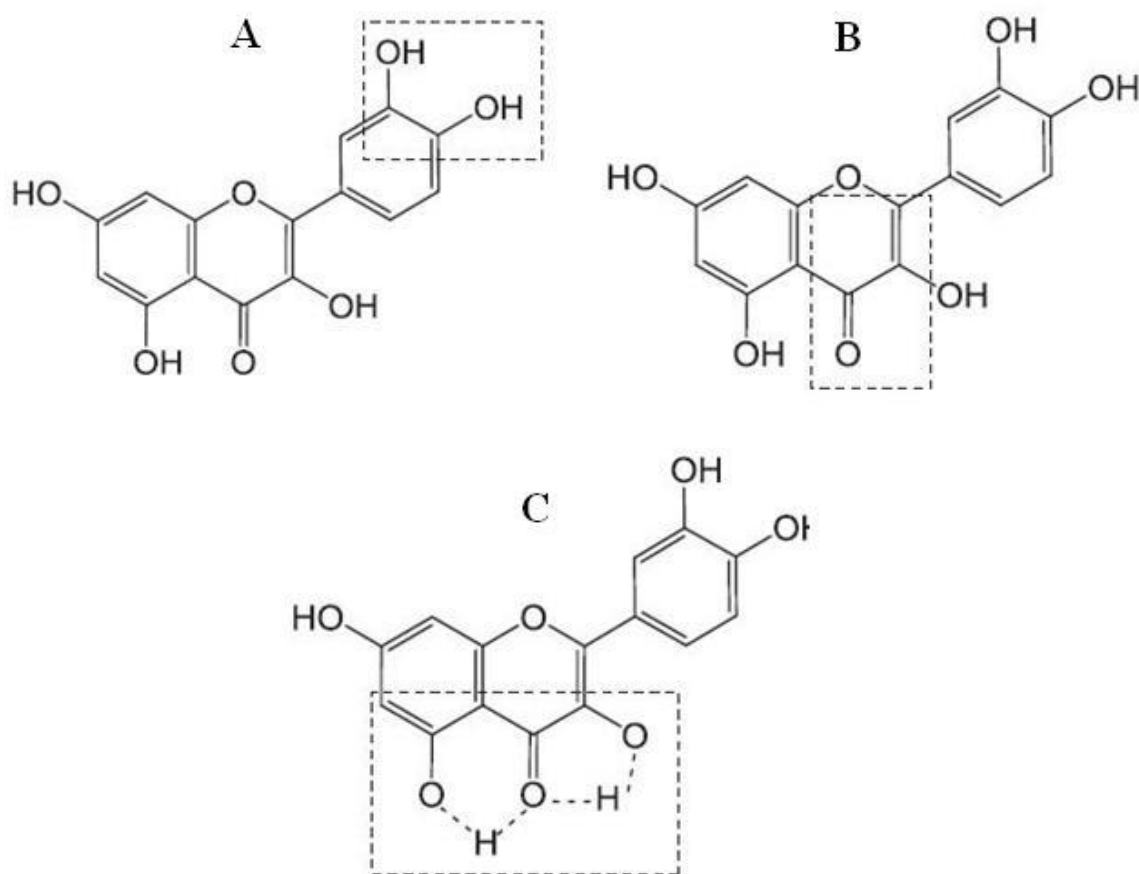


Slika 2.2 Mehanizam sakupljanja slobodnih radikala od strana flavonoida.

In vitro antioksidativna aktivnost se može povećati i polimerizacijom flavonoidnih monomera, tako su na primer, proantocijanidini (poznatiji kao tanini) polimeri katehina, odlični *in vitro* antioksidansi zbog visokog broja hidroksilnih grupa u svojim molekulima. Antioksidativni kapacitet proantocijanidina zavisi od dužine njegovog oligomernog lanca i tipa ROS-a sa kojima reaguje. Glikozilacijom flavonoida smanjuje se njihova *in vitro* antioksidativna aktivnost u poređenju sa njihovim aglikonskim oblicima. Poređenje TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) vrednosti kvercetina (4,42 mM) i rutina (2,02 mM), pokazuje da glikozilacija 3-OH grupe značajno smanjuje antioksidativnu aktivnost. Slični rezultati su takođe zabeleženi i za druge flavonoidne parove, tipa aglikon-glikozid (hisperetin-hisperidin, luteolin-luteolin 4'-glukozid; luteolin-luteolin 7-glukozid; baikalein-baikalin; i kvercetin-kvercitrin). Glikozilacija kvercetina takođe značajno smanjuje njegovu superoksid, kao i hipohlorit sakupljajuću aktivnost (Procházková i sar., 2011).

Korelacija između antioksidativnog delovanja i hemijske strukture flavonoida nije u potpunosti razjašnjena, međutim, sadašnji podaci govore da je dvostruka veza u položaju 2,3 u konjugaciji sa 4-okso grupom u prstenu C, u velikoj meri odgovorna za antioksidativnu aktivnost flavonoidnih jedinjenja, dok prisustvo OH grupe u položajima 3 i 5 - dodatno pojačava ovu aktivnost (slika 2.3) (Procházková i sar., 2011). Ispitivanja su pokazala da se sa povećanjem hidroksilnih grupa u prstenu B poboljšava antioksidativni potencijal, posebno ako je prisutna kateholna (3',4'- ortodihidroksi) struktura.

Iako se antioksidativna aktivnost prvenstveno pripisuje prisustvu slobodnih hidroksilnih grupa, značajan antioksidativni efekat se takođe pripisuje i jedinjenjima kod kojih su te grupe acetilovane. Tako na primer, u istraživanjima sprovedenim od strane Kabeya i saradnika (2007), objavljeno je nekoliko klasa prirodnih jedinjenja sa antioksidativnom i anti-inflamatornom aktivnošću, kao što su flavonoidi, kumarini, i laktonski seskviterpeni.



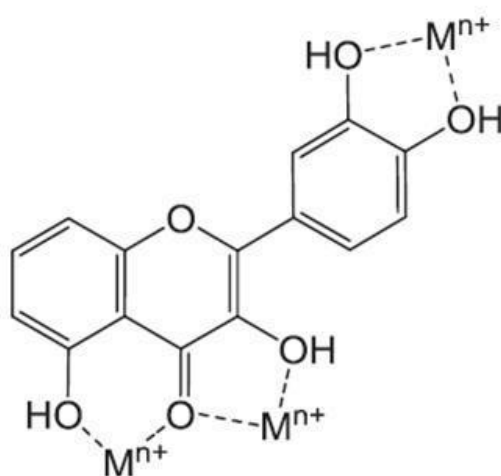
Slika 2.3 A- *orto*-dihidroksi (kateholna) struktura na B prstenu; B- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji sa 4 okso grupom na C prstenu; C- hidroksilne grupe na pozicijama 3 i 5.

2.1.2.2. Mehanizam aktivacije antioksidativnih enzima

Drugi mehanizam pomoću koga flavonoidi ostvaruju antioksidativna svojstva ogleda se posredstvom interakcija sa različitim antioksidativnim enzimima. Flavonoidi su u stanju da svojim prisustvom aktiviraju enzime druge faze detoksifikacije (na primer, NAD(P)H-hinon oksidoreduktazu, glutation S-transferazu, i UDP-glukuroniltransferazu), koji su glavni odbrambeni enzimi protiv elektrofilnih otrova i oksidativnog stresa.

2.1.2.3. Mehanizam metalo-helatne aktivnosti

Poznato je da određeni flavonoidi ima sposobnost heliranja jona gvožđa i bakra, što pruža mogućnost za uklanjanje glavnih faktora za razvoj slobodnih radikala. Za kvercetin je poznato da ima sposobnost sprečavanja oksidativnih oboljenja, indukovana brojnim oksidacionim sredstvima (npr. akrolein) koja dovode do oslobađanja gvožđa u njegovoj slobodnoj, i redoks aktivnoj formi. Pretpostavlja se da su glavna mesta za vezivanje metala u molekulima flavonoida kateholna polovina u prstenu B, 3- hidroksi i 4- okso grupa u heterocikličnim prstenu C, kao i 4-okso i 5- hidroksilna grupa između A i C prstena (slika 2.4) (Procházková i sar., 2011).



Slika 2.4 Mesta za vezivanje jona metala u molekulu flavonoida.

Dokazano je da je kateholna polovina u prstenu B od značaja za formiranje Cu^{2+} -helata, što dalje doprinosi stvaranju mesta za helaciju metala. Kvercetin je posebno poznat po svojim gvožđe-helirajućim i gvožđe-stabilizirajućim osobinama. *In vitro* ispitivanja su pokazala da morin i kvercetin daju snažne antioksidativne komplekse sa Cd (II) jonima. Njihovi sulfonski vodenorastvorljivi derivati imaju nisku toksičnost i stoga mogu biti potencijalni protivotrovi pri trovanju kadmijumom (Procházková i sar., 2011; Hosseinimehr, 2010).

2.1.2.4. Mehanizam smanjenja α -tokoferol radikala

α -Tokoferol je glavni antioksidans u ćelijskim membranama i u ljudskim lipoproteinima niske gustine (LDL) koji štiti frakcije lipoproteina od oksidativnog oštećenja. Smatra se da flavonoidi mogu da deluju kao donori vodonika α -tokoferol radikalima, koji

predstavljaju potencijalne prooksidanse. Osim toga, pri interakciji sa α -tokoferol radikalima, flavonoidi imaju potencijal da odlože oksidaciju LDL-a. Flavonoidi (kempferol, morin, miricetin i kvercetin) pokazuju različitu zaštitnu aktivnost protiv iscrpljivanja α -tokoferol-a u LDL-u, s tim što su kempferol i morin manje efikasniji od miricetina i kvercetina (Procházková i sar., 2011).

2.1.2.5. Mehanizam inhibicije oksidaza

Flavonoidi imaju mogućnost inhibicije enzima koji su odgovorni za proizvodnju superoksida ($O_2^{\bullet-}$), poput ksantin oksidaze i protein kinaze C. Kvercetin i silibin inhibiraju aktivnost ksantin oksidaze, što dovodi do smanjenja oksidativnih oboljenja. Ispitivanja Procházkove i saradnika (2011) o povezanosti strukture i aktivnosti su pokazala da je luteolin najmoćniji inhibitor ksantin oksidaze. Flavonoidi su takođe pokazali da imaju mogućnost da inhibiraju aktivnost ciklooksigenaze, lipooksigenaze, mikrosomalne suksinoksidaze i NADH oksidaze (Procházková i sar., 2011).

NADPH oksidaza je membranski-vezan katalizirajući sistem za proizvodnju $O_2^{\bullet-}$ u aktiviranim neutrofilima. Za aktivaciju NADPH oksidaze potrebna je interakcija agonista sa specifičnim receptorima na membrani neutrofila, nakon čega dolazi do aktivacije fosfolipaze C, koja aktivira protein kinazu C. Ovaj enzim fosforiluje p47foks subjedinicu NADPH oksidaze, ključnu komponentu ovog enzima, i time izaziva aktiviranje respiratorne upale. Smatra se da je šema inhibicije protein kinaze C identična šemi inhibicije NADPH oksidaze od strane kvercetina. Potentni flavonoidni inhibitori protein kinaze C (npr. kvercetin, fisetin i luteolin) poseduju koplanarne flavonske strukture sa slobodnim hidroksilnim grupama na poziciji 3', 4' i 7 (Procházková i sar., 2011).

2.1.2.6. Mehanizam ublažavanja oksidativnog stresa prouzrokovanog azot monoksidom

Azot monoksid (NO) je važan za održavanje dilatacije krvnih sudova, ali njegova visoka koncentracija može da dovede do oksidativnog oštećenja. NO se proizvodi oksidacijom L-arginina u reakciji koja je katalizovana NO sintazom (NOS). Toksičnost azot monoksida uglavnom nastaje oslobađanjem peroksinitrila, koji se formira u reakciji NO sa $O_2^{\bullet-}$.

Flavonoidi vrše proizvodnju NO inhibicijom u nekoliko aktivnih lipopolisaharidnih ćelijskih linija i kultura (peritonealni makrofag miša, RAV 264,7 ćelije, i J774,2). Ovaj efekat je verovatno izazvan inhibitornim delovanjem flavonoida na ekspresiju inducibilnog NOS-a,

ali ne i inhibicijom njegove aktivnosti. Glavni strukturni zahtevi za ovu aktivnost flavonoida su:

- prisustvo dvostruke veze u položaju 2,3
- 4-okso grupa
- hidroksilne grupe u položaju 3,5,4'

Njihova aktivnost se povećava metilovanjem hidroksi grupe u položaju 3, 5, ili 4' i smanjenjem glikozidnog dela kao i kateholnim ili pirogalolnim rasporedom u B-prstenu. Tako, apigenin, diosmetin i luteolin spadaju u prirodne flavone sa najmoćnijom inhibitornom aktivnošću. Ovi flavonoidi mogu da u isto vreme povećaju aktivnost endotelnih NOS. Flavonoidi takođe poseduju i mogućnost da direktno sakupljaju molekule NO-a (Procházková i sar., 2011).

Mehanizam inhibicije proizvodnje NOS-a i NO-a pomoću flavonoida još uvek nije razjašnjen, ali jedna od najprihvatljivijih teorija o ovom mehanizmu se zasniva na antioksidativnim osobinama flavonoida kojim ova jedinjenja sakupljaju ROS (Procházková i sar., 2011).

2.1.2.7. Mehanizam povećanja nivoa mokraćne kiseline

Interesantno je da postoje velike razlike između ukupnog antioksidativnog kapaciteta plazme i same koncentracije flavonoida u plazmi. Pretpostavlja se da veliki porast ukupnog antioksidativnog kapaciteta u plazmi koji nastaje nakon konzumiranja hrane bogate flavonoida nije nastao zahvaljujući flavonoidima, ali je verovatno posledica povećanog nivoa mokraćne kiseline, koja je glavni faktor za ukupni antioksidativni kapacitet. Ova sumnja je kasnije i potvrđena istraživanjima koja su ukazala na značajno povećanje koncentracije urata u plazmi ili serumu nakon konzumiranja jagode, spanaća ili crvenog vina. Slično povećanje urata u plazmi ili serumu je opisano nakon konzumiranja čaja ili kafe. Dakle, nekoliko ispitivanja je pokazalo da upotreba hrane koja je bogata flavonoidima može da povećá koncentraciju urata u plazmi, ali osnovni mehanizam i dalje ostaje nejasan (Procházková i sar., 2011).

2.1.3. Metabolizam flavonoida

Glavni problem flavonoida je ograničeno znanje o njihovoj bioraspoloživosti i metabolizmu, što značajno utiče na njihov opseg biološkog delovanja. Najbolji primer za to

može biti najviše proučavan flavonoid, kvercetin. Ovaj flavonoid je često prisutan u svakodnevnoj ishrani, u obliku brojnih glikozida. Iako se mislilo da se ovi glikozidi podvrgavaju crevnoj apsorpciji, novija istraživanja su pokazala sasvim suprotno od onoga što se očekivalo, što je barem jednim delom posledica enterocitnog mehanizma. Umesto toga, glikozidi kvercetina se izgleda efikasno hidrolizuju, ne samo u debelom crevu pod dejstvom bakterija, već i u tankom crevu pod dejstvom enzima kao što su β -glukozidaza i laktaza. Dosadašnja istraživanja su potvrdila da je kod ljudi apsorpcija nastalog aglikona kvercetina, koji se formira iz njegovog glikozida vrlo efikasna. Oralna absorpcija kvercetina je takođe visoka i kreće se između 36-53%, dok se količina aglikona kvercetina u cirkulaciji može otkriti samo u tragovima. Visoka oralna bioraspoloživost kvercetina kod ljudi nastaje kao rezultat velikog presistenskog intestinalno/hepatičnog metabolizma.

Ovo uključuje konjugativne puteve, kao što su glukuronidacija, o-metilacija, možda i sulfatacija, s tim da je kvantitativno najvažniji put njegova oksidativna degradacija do ugljen-dioksida, koja verovatno nastaje pod dejstvom crevnih bakterija. Deo aglikona kvercetina koji ulazi u cirkulaciju nemetabolisan se verovatno brzo preuzima od strane ćelija. Međutim, njegov životni vek u ćelijama je kratak, što može da zavisi kako od hemijske, tako i od enzimske degradacije, npr. preko stvorenih reaktivnih kiseoničnih intermedijera (ROS). Prethodna ispitivanja su pokazala da se degradacija kvercetina na ovaj način dešava preko hinona/hinonskih derivata (Walle i sar., 2003).

Flavonoli se intenzivno metabolišu u ljudskom organizmu, tako da se od kvercetina unetog hranom veoma mala količina izlučuje u neizmenjenom obliku, ili u obliku konjugata u urinu. Biotransformacija u jetri takođe uključuje glukuronidaciju i sulfataciju fenolnih hidroksilnih grupa i o-metilaciju, koje kasnije igraju važnu ulogu u inaktivaciji kateholnog dela, odnosno dve susedne (orto) aromatične hidroksilne grupe flavonoida i njihovih metabolita nastalih u debelom crevu. Dalja degradacija flavonola mikroorganizmima podrazumeva cepanje heterocikličnog prstena koji sadrži kiseonik do fenilne karboksilne kiseline. U zavisnosti od rasporeda hidroksilnih grupa, ove fenil karboksilne kiseline su same po sebi antioksidansi, te stoga mogu da doprinesu biološkim efektima flavonoida koji se koriste u ishrani (Rawel i sar., 2003).

Inače flavonoidi predstavljaju grupu jedinjenja koja se lako degradira pod dejstvom mikrobioloških enzima. Prema izveštajima koji postoje, opisano je dejstvo enzima koji su izolovani iz gljiva: lakaza (EC 1.10.3.1) iz *Polyporus versicolor* je u stanju da napadne 3-supstituisane flavonole i flavanone, dok dioksidogeneze iz *Aspergillus flavus* degradiraju 3-hidroksiflavone do ugljen-monoksida i hidroksifenilkarbonske kiseline (Shreiber, 1974).

Postoje dokazi da se u biljkama odvija metabolizam flavonoida; rutin na primer daje protokateholnu kiselinu i floroglucinolkarboksilnu kiselinu, dok ekstrakti iz *Cicer arietinum* L. formalno hidratišu C₂–C₃ dvostruku vezu 3-hidroksiflavona. Ovo se odvija samo u prisustvu kiseonika i merkaptoetanola (Shreiber, 1974).

2.1.4. Primena flavonoida

Odavno je poznato da fenolna jedinjenja, deluju kao čistači slobodnih radikala, pa se zbog toga intenzivno koriste kao jedna od terapijskih strategija protiv inflamatornih oboljenja (Omololu i sar., 2011). Istraživanje flavonoida je dovelo do otkrića tzv. „francuskog paradoksa“ prema kome stanovništvo sa visokom konzumacijom crvenog vina ima relativno nisku kardiovaskularnu stopu smrtnosti (Procházková i sar., 2011; Nijveldt i sar., 2001). Suzbijanjem sinteze prostaglandina, fenolna jedinjenja predstavljaju posrednike u inhibiciji ciklooksigenazne prooksidativne aktivnosti (Makris i Rossiter, 2002). Brojna istraživanja su pokazala da flavonoidi, naročito oni koji u sebi sadrže kateholnu (kvercetin) i pirogalolnu (miricetin) strukturu na B prstenu, deluju kao terminatori lipidne peroksidacije ili kao sakupljači peroksidnih radikala (Miura i sar., 2003). Takođe se mogu koristiti i protiv ateroskleroze jer sprečavaju da Cu²⁺ joni katalizuju oksidativnu modifikaciju lipoproteina niske gustine (LDL) skupljanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta i eliminisanjem LDL peroksi i alkoksi radikala. Kateholni ili pirogalolni B prsten flavonola može da se autooksidise u prisustvu metala i da proizvede ROS, koje ubrzavaju oksidaciju LDL-a tokom propagacione faze, ili da prouzrokuju rascep DNK lanca (Khlebnikov i sar., 2007; Dufour i Loonis, 2007; Ma i sar., 2009; Barková i sar., 2011; Chan i sar., 1999).

Flavonoidi, takođe pokazuju i značajne biološke i farmakološke efekte, uključujući antioksidativna, antimutagena, antifibrotična, antikoagulantna, antibakterijska antihipertenzivna, antikancerogena, probiotička, antimikrobna i anti-inflamatorna svojstva (Procházková i sar., 2011; Galati i sar., 2000; Awad i sar., 2000; Chung i sar., 2003; Nijveldt i sar., 2001). Antioksidativna aktivnost rutina je slabija u odnosu na kvercetin zbog toga što je 3-hidroksil grupa blokirana rutinoznom grupom. Niža antioksidantna aktivnost rutina se može pripisati i hidrofilnijoj prirodi rutina što može rezultovati nižim koncentracijama u ćelijskoj membrani (Sánchez-Gallego i sar., 2010).

Flavoni sa supstituisanom OH grupom u položaju 7 i kateholnom (kvercetin) ili pirogalolnom (miricetin) funkcijom na B prstenu su moćni inhibitori ksantin oksidaze, koja stvara ROS (Nijveldt i sar., 2001). Morin, luteolin i taksifolin se ponašaju kao pro-oksidansi,

i antioksidansi lipidne peroksidacije koja je katalizovana jonima gvožđa. Flavonoidi, uključujući i kvercetin (kateholna struktura na B prstenu) i miricetin (pirogololna struktura na B prstenu), su akceleratori proizvodnje hidroksilnih radikala u prisustvu Fe^{3+} -etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA). Generalno gledano flavonoidi, uključujući i kvercetin, mogu da deluju kao citotoksični pro-oksidansi nakon metaboličke aktivacije semihinonskih i hinonskih proizvoda, što ukazuje na to da flavonoidi mogu da deluju kao antioksidanti ili pro-oksidansi u zavisnosti od reakcionih uslova.

Ispitivanja flavonoida, uključujući i kvercetin, su pokazala da flavonoidi vrše inaktivaciju kreatinin kinaze (CK) kroz pro-oksidativno delovanje HRP-a u prisustvu H_2O_2 . Ispitivanja Takahame (1988) su pokazala da je u prisustvu kvercetina, luteolina, taksifolina i katehina inaktivacija kreatinin kinaze u velikoj meri bila prisutna. Nasuprot tome, kaemferol, koji ima fenolni B prsten, ima mnogo manje sposobnosti da inhibira kreatinin kinazu. Ovi rezultati ukazuju na to da flavonoidi inaktiviraju kreatinin kinazu tokom oksidacije kateholne hidroksilne grupe na B prstenu pod dejstvom HRP i H_2O_2 . Slobodni radikali koji nastaju od fenolnih jedinjenja pod dejstvom peroksidaze učestvuju u ubijanju patogenih mikroorganizama (Takahama, 1988).

Zanimljivo je da, polimeri kempferola i kvercetina dobijeni pomoću polifenol oksidaza pokazuju da imaju jači uticaj na uklanjanje ostataka ROS-a od njihovih monomera. Inače, hinoni su snažni antibiotici, koji imaju osobinu da mogu da alkiluju proteine (Pourcel i sar., 2007).

2.1.5. Neželjena dejstva flavonoida

Pored mnogobrojnih pozitivnih efekata flavonoida, nedavno je otkriveno da antioksidativna terapija flavonoidima može da dovede i do negativnih efekata, jer su kvercetin i drugi flavonoidi sposobni da indukuju formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta i da izazovu oštećenje ćelijskih makromolekula. Ovo otkriće je vremenom nateralo istraživače da dublje istraže problem biotransformacije i korišćenja stranih jedinjenja kao što su flavonoidi. Većina je prihvatila objašnjenje da formiranje oksidacionih proizvoda flavonoida štetno deluje. Glavni intermedijeri koji se formiraju tokom oksidacije su semihinoni i reaktivni elektrofilni o-hinoni. Hinoni predstavljaju klasu toksičnih intermedijera, koji mogu da kreiraju različite opasne efekte *in vivo*, uključujući i akutnu citotoksičnost, imunotoksičnost i kancerogenezu. Mehanizmi pomoću kojih ovi hinoni izazivaju ovakve efekte mogu biti veoma složeni i nepoznati, ali se sa sigurnošću može reći da je poznato da do celularnih

oštećenja najčešće dolazi izazivanjem alkilacije važnih ćelijskih proteina i/ili DNK lanca (Awad i sar., 2002). Neki od hemoproteina mogu delovati aktivirajuće na flavonoide zbog relativno visokog redoks potencijala i sposobnosti da učestvuju u elektro-prenosnim reakcijama sa niskomolekularnim jedinjenjima (Cherviakovsky i sar., 2006). Očigledno je da, hidroksilne grupe na kateholnom B prstenu povećavaju oksidativno i pro-oksidativno delovanje (Miura i sar., 2003).

Skoro je dokazano da flavonoidi mogu da imaju i potencijalno toksično delovanje pri visokim koncentracijama. Nekoliko ispitivanja koja su sprovedena u ćelijskim kulturama je pokazalo da kvercetin ima genotoksične efekte. Nasuprot ovome, *in vitro* studije u kojima je za mikrobiološki test korišćena *Salmonella*, nisu pokazale da kvercetin ima bilo kakave mutagene efekte. Kratkoročna i dugoročna primena dijetetskih suplemenata kvercetina kod životinja za sada nije pokazala kancerogeno i genotoksično dejstvo, zbog čega je na kraju kvercetin klasifikovan kao nekancerogen za ljude i bezbedan za humanu upotrebu u vidu dijetetskih suplemenata (Hosseini-mehr, 2010).

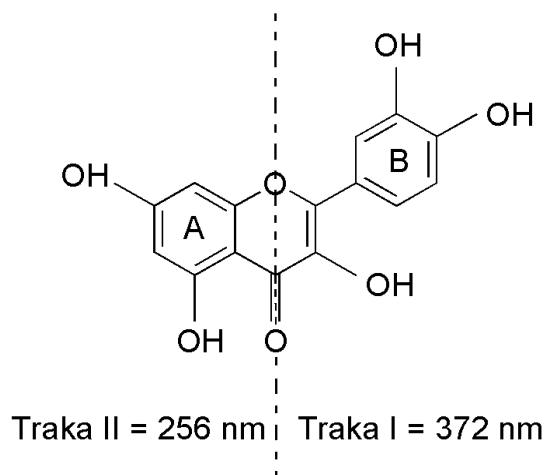
2.1.6. Kvercetin

Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) je jedan od najpoznatijih polifenola biljnog porekla (slika 2.5), i u velikoj meri je prisutan u svakodnevnoj ljudskoj ishrani (Awad i sar., 2000; Sánchez-Gallego i sar., 2010; Omololu i sar., 2011). S obzirom da kvercetin poseduje antioksidativna svojstva, on se često upotrebljava kao dodatak hrani i preporučuje se za sprečavanje i suzbijanje mnogih bolesti koje su u bliskoj vezi sa oksidativnim stresom. Pored toga, kvercetin ima veliku sposobnost inhibicije slobodno radikalskih procesa u ćelijama i to u različitim fazama:

- u inicijaciji, hvatanjem O_2^- i reaktivnih azotnih vrsta kao što su NO^- i $ONOO^-$;
- u propagaciji, ili reakciji sa peroksil ili lipid-peroksil radikalima, ili inhibicijom formiranja $HO^\bullet$, verovatno heliranjem jona gvožđa (Sánchez-Gallego i sar., 2010).

Zbog njegove široke zastupljenosti u prirodi, kvercetin je jedan od najčešće ispitivanih flavonoida. Prooksidativne osobine kvercetina nastaju kao rezultat njegove autooksidacije kada se on nalazi u vodenom puferu, što dovodi do njegove konverzije u semihinonske slobodne radikale i reaktivne elektrofilne *o*-hinone koji predstavljaju ROS. Zbog prisustva keto grupe u položaju C4- i dvostruke veze u položaju C2-C3 u kvercetinu, formiranje njegovih metabolita tipa *o*-hinona pruža mogućnost za izomerizaciju do hinonskih

derivata, za koje se zna da su čak elektrofilniji od hinona, i kao i hinoni imaju sposobnost da formiraju adukte sa različitim makromolekulima.



Slika 2.5 Struktura kvercetina.

Prooksidativno delovanje flavonoida, kao i elektrofilnost njihovih *o*-hinona i hinonskih metabolita je od interesa, posebno u pogledu citotoksičnosti, mutagenosti, i eventualne kancerogenosti. Identifikacija nastalih proizvoda oksidacije kvercetina može pružiti dublji uvid u njegov prooksidativno-toksični mehanizam što u budućnosti može da čini osnovu za nove biomarkere koji se mogu koristiti za otkrivanje prooksidativne aktivnosti flavonoida (Awad i sar., 2000; Sánchez-Gallego i sar., 2010).

2.2. Enzimi

Enzimi su biološki katalizatori koji u živim sistemima katalizuju gotovo sve reakcije, što dovoljno govori o njihovom značaju kako u biohemiji, tako i u ostalim sferama ljudske aktivnosti.

Većina poznatih enzima pripada grupi proteina ili proteida. Na osnovu ovoga enzimi se mogu podeliti na: proste i složene enzime. Prosti enzimi se sastoje samo iz proteinskog dela, dok složeni pored proteinskog dela sadrže i neproteinski deo, koji se naziva prostetička grupa, kofaktor, ili koenzim. Prema današnjim shvatanjima postoji izvesna razlika između prostetičke grupe i kofaktora (koenzima). Prostetičke grupe su obično vezane za apoenzim čvrstim kovalentnim vezama, tako da se ne mogu odvojiti od apoenzima, a da se njegova struktura ne naruši. Sa druge strane, koenzimi i drugi kofaktori su vezani za apoenzim slabim međumolekulskim silama i, za razliku od prostetičkih grupa, oni se mogu odvojiti dijalizom.

U katalitičkom smislu za aktivnost enzima apoenzim i koenzim imaju veoma važnu ulogu. Od koenzima zavisi tip biohemijske reakcije, tj. vrsta biohemijske promene koju

enzim katalizuje: oksidacija, dekarboksilacija, transaminacija itd. Koenzimi su najčešće vitamini, nukleotidi i porfirinski derivati. Neki enzimi kao kofaktore ili prostetičke grupe sadrže metale. Oni mogu neposredno da učestvuju u katalitičkim procesima, ali češće imaju ulogu u očuvanju native konformacije enzima. Katalitička uloga apoenzima ogleda se u specifičnosti prema supstratu, tj. on određuje na koje će jedinjenje da deluje taj enzim. Ovakvu ulogu apoenzimi ostvaruju zahvaljujući tome što kod njih postoje specifične zone, tzv. aktivni centri sa kojima se spajaju supstrati (Ž. Petronijević, u pripremi).

Pored osnovne podele enzima na proste i složene, postoji i podela prema reakciji koju enzim katalizuje (Ž. Petronijević, 2000). Ima šest glavnih klasa i to:

1. Oksidoreduktaze katalizuju oksidoredukcione procese;
2. Transferaze katalizuju prenos određenih funkcionalnih grupa ($-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$);
3. Hidrolaze katalizuju procese razlaganja i sinteze, koji se odvijaju uz učešće odgovarajućeg broja molekula vode;
4. Liaze katalizuju izdvajanje pojedinih grupa iz supstrata, bez učešća molekula vode, pri čemu se stvaraju dvogube veze, ili adiciju na takve dvogube veze;
5. Izomeraze ubrzavaju reakcije izomerizacije (aldozu pretvaraju u ketozu, D- u L-aminokiseline i sl);
6. Sintetaze (ligaze) katalizuju stvaranje složenih molekula iz jednostavnijih jedinjenja, uz utrošak energije iz ATP-a ili nekog drugog nukleozid trifosfata.

2.2.1. Kinetika enzimskih reakcija

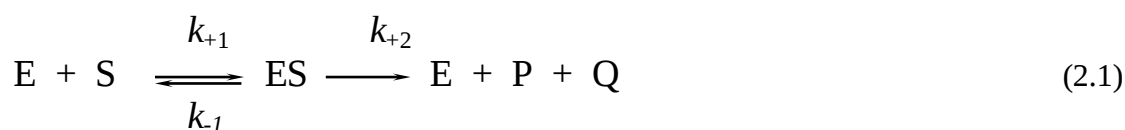
Enzimska kinetika je oblast nauke koja se bavi kvantitativnim izučavanjem reakcija katalizovanih enzimima. Ona je od ogromnog praktičnog značaja za enzimologe i biohemičare. Kinetička istraživanja omogućavaju određivanje afiniteta enzima prema supstratu i inhibitoru, specifičnost njegovog vezivanja, određivanje maksimalne brzine procesa koji je katalizovan specifičnim enzimom. Može se reći da je glavni cilj svih kinetičkih istraživanja pronaći jednačinu brzine koja povezuje brzinu reakcije sa drugim eksperimentalnim parametrima (Ž. Petronijević, u pripremi).

2.2.1.1. Kinetika jednosupstratnih reakcija

2.2.1.1.1. Michaelis-ova teorija ravnotežnog stanja

Koncentracija supstrata je jedan od najvažnijih faktora koji određuje brzinu enzimskih reakcija. Predstava o tome da enzim najpre obrazuje kompleks sa supstratom je centralni pojam za sve savremene koncepcije o mehanizmu delovanja enzima

Prema teoriji ravnotežnog stanja, jednosupstratne reakcije se mogu predstaviti jednačinom Michaelis-Menten-a:



Michaelis-Menten-ova jednačina se zasniva na pretpostavci da jedan molekul supstrata reaguje sa jednim molekulom enzima gradeći enzim-supstratni kompleks ES, i važi pod sledećim uslovima:

1. Reakcija između supstrata i enzima se nalazi u stanju ravnoteže, tako da reakcija $ES \rightleftharpoons E + P + Q$ praktično nema uticaja na ravnotežu. Ovo je ispunjeno kada je $k_{-1} \gg k_{+2}$, tj. kada je količina nastalih proizvoda reakcije veoma mala. Zbog zanemarljivo malih koncentracija proizvoda, može se uzeti da reakcija stvaranja proizvoda teče samo u jednom smeru.
2. Koncentracija slobodnog supstrata ostaje praktično konstantna u toku (početnog perioda) reakcije, tako da se može uzeti da je koncentracija supstrata $[S]$ u jednačini jednaka početnoj koncentraciji supstrata $[S]_0$. Ovaj uslov je ispunjen kada je $[S]_0 \gg [E]_0$, tj. kada je koncentracija supstrata znatno veća od koncentracije enzima.

Konstanta brzine reakcije stvaranja ES kompleksa (konstanta brzine asocijacije) je k_{+1} , konstanta brzine njegove disocijacije je k_{-1} , dok k_{+2} predstavlja konstantu brzine stvaranja proizvoda. Konstanta disocijacije ES kompleksa, tj. konstanta ravnoteže ove povratne reakcije, je data izrazom:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (2.2)$$

Konstanta disocijacije ES kompleksa predstavlja odnos konstanti brzina povratne i direktne reakcije: ako je K_s veliko, to znači da je k_{-1} mnogo veće od k_{+1} , što znači da je ES kompleks nestabilan, da se lako razlaže na polazna jedinjenja od kojih je nastao, i da se reakcija odvija sporo. Ako je K_s malo onda je k_{+1} mnogo veće od k_{-1} , ES kompleks se ne razlaže (u značajnijoj meri) na polazne komponente i enzimska reakcija može da teče brzo.

U stanju ravnoteže imamo da su brzine povratne i direktne reakcije jednake ($v_{+1} = v_{-1}$), tj. da je :

$$k_{+1} \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] \quad (2.3)$$

ili

$$[E] \cdot [S] = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} [ES] \quad (2.4)$$

Ako je $[E]_0$ ukupna koncentracija enzima na početku reakcije, a $[ES]$ koncentracija enzim-supstratnog kompleksa, tada će koncentracija slobodnog enzima (nevezanog sa supstratom) biti data izrazom.

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (2.5)$$

Zamenom jednačina 2.5 i 2.2 u 2.4 dobija se:

$$([E]_0 - [ES]) \cdot [S] = K_s \cdot [ES] \quad (2.6)$$

$$[ES] \cdot (K_s + [S]) = [E]_0 \cdot [S] \text{ tj.} \quad (2.7)$$

$$[ES] = [E]_0 \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (2.8)$$

Brzina reakcije će biti utoliko veća, što je veća koncentracija ES kompleksa. Maksimalna brzina reakcije biće onda kada je $[ES] = [E]_0$, tj. onda kada enzim bude u potpunosti zasićen supstratom. Na osnovu ovoga se može napisati da je:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[ES]}{[E]_0} \quad (2.9)$$

Pošto je prema jednačini 2.8:

$$\frac{[ES]}{[E]_0} = \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (2.10)$$

Tada se dobija da je:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (2.11)$$

Odavde se dobija da je :

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad \text{ili} \quad v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_s}{[S]}} \quad (2.12)$$

Jednačina 2.12 je poznata kao Michaelis-Menten-ova jednačina. Iz nje proizilazi sledeće:

A. Ako je koncentracija supstrata velika u poređenju sa konstantom disocijacije ES kompleksa (za invertazu je $K_s = 16,7\text{mM}$), odnosno kada je K_s zanemarljivo malo u odnosu na $[S]$, tada je $v = V_{\max}$ - tada imamo reakciju nultog reda.

B. Ako je koncentracija supstrata mala u odnosu na K_s , tada se $[S]$ u imeniocu jednačine 2.12 može izostaviti. Dobija se da je:

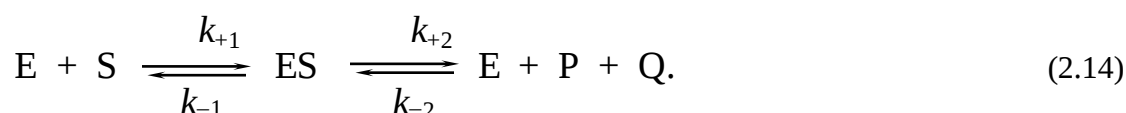
$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_s} \quad (2.13)$$

što znači da imamo reakciju prvog reda.

C. Kada je $[S] = K_s$, tada je $v = V_{\max}/2$. Veličina $[S]$, pri kojoj se u eksperimentu dobija brzina koja je jednaka polovini maksimalne brzine, obično se označava kao K_m , (Michaelis-ova konstanta), tako da u ovom slučaju imamo da je $K_s = K_m$. Ova jednakost je tačna samo ako između ES , E i S postoji ravnoteža.

2.2.1.1.2. Teorija stacionarnog stanja

Pretpostavka Michaelis-a o ravnotežnom stanju između enzima i supstrata u mnogim slučajevima ne odgovara realnosti; zbog veoma visoke katalitičke aktivnosti mnogih enzima, realne koncentracije ES-kompleksa su često različite od ravnotežnih vrednosti. To znači da k_{+2} konstanta nije zanemarljivo mala u poređenju sa k_{-1} , i da dolazi do stvaranja proizvoda P i Q u znatnijim količinama. U tom slučaju se, naravno, ne može zanemariti ni reverzibilna reakcija sa konstantom brzine k_{-2} :



Koncepcija stacionarnog stanja Brigs-Holdejn-a uzima u obzir ovu činjenicu, i prema njoj je koncentracija ES kompleksa konstantna u kratkom vremenskom periodu koji je obično potreban za merenje (početne) brzine reakcije. Drugi uslov za primenljivost ove teorije je isti kao i kod teorije ravnotežnog stanja, tj. koncentracija supstrata $[S]$ treba da bude konstantna.

Zbog prisustva viška supstrata količina stvorenog ES kompleksa je jednaka količini ES kompleksa koji se razložio, tako da je $d[ES]/dt=0$.

Za ove uslove imamo da je brzina enzimske reakcije data jednačinom koja je slična jednačini 2.12, ali sa konstantom K_m umesto K_s .

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{ili} \quad v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (2.15)$$

K_m je tzv. Michaelis-ova konstanta, koja je definisana izrazom:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_s + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \quad (2.16)$$

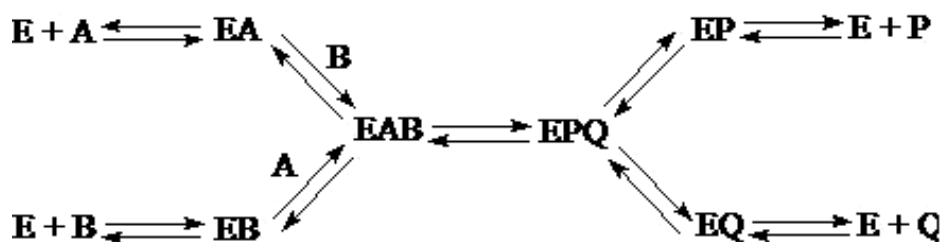
Vidi se da je Michaelis-ova konstanta K_m uvek veća od K_s za k_{+2}/k_{+1} . U slučajevima kada je $k_{+2} \ll k_{-1}$, imamo da je $K_m = k_{-1}/k_{+1} = K_s$. Iz ovoga sledi da se teorija ravnotežnog stanja Michaelis-Menten-a može posmatrati kao specijalni slučaj opšte teorije stacionarnog stanja Brigs-Holdejn-a. U slučaju kada je $k_{-1} \ll k_{+2}$ Michaelis-ova konstanta postaje jednaka tzv. kinetičkoj konstanti $K_k = k_{+2}/k_{+1}$.

2.2.1.2. Kinetika dvosupstratnih enzimskih reakcija

Kod dvosupstratnih enzimskih reakcija su najznačajniji sledeći kinetički mehanizmi:

A. Uzastopni statistički mehanizam

Kod ovog mehanizma, koji je šematski prikazan na slici 2.6, supstrati A i B se vezuju sa enzimom nezavisno, sa podjednakom verovatnoćom gradeći sa enzimom najpre dvojni, a



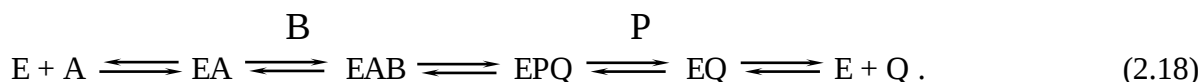
Slika 2.6 Šematski prikaz statističkog mehanizma.

zatim i trojni kompleks kada se vežu oba supstrata. Ako su konstante disocijacije odgovarajućih enzim-supstratnih kompleksa K_s^A , K_s^B , K_s^{AB} i K_s^{BA} i ako se uzme da je ovaj mehanizam ravnotežnog tipa, tada je brzina reakcije data jednačinom:

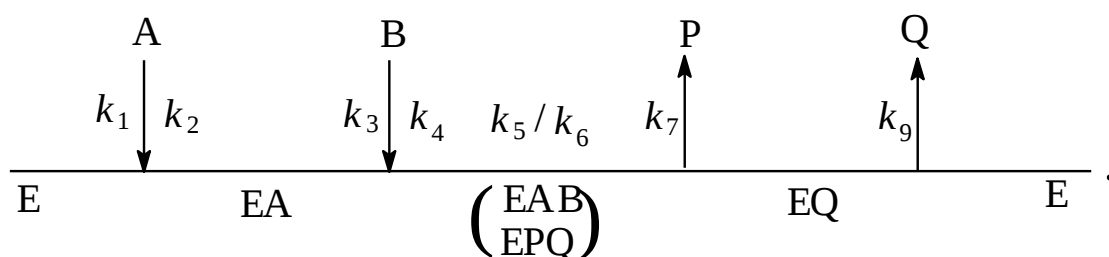
$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} + \frac{K_s^A \cdot K_m^B}{[A] \cdot [B]}} \quad (2.17)$$

B. Uzastopni usaglašeni mehanizam kod koga dolazi do stvaranja trojnog kompleksa

Za razliku od prethodnog mehanizma, kod usaglašenog mehanizma, koji je šematski prikazan (slika 2.7), se tačno zna koji se supstrat vezuje prvi, a koji kao drugi. Mehanizam se može predstaviti jednačinom 2.18.



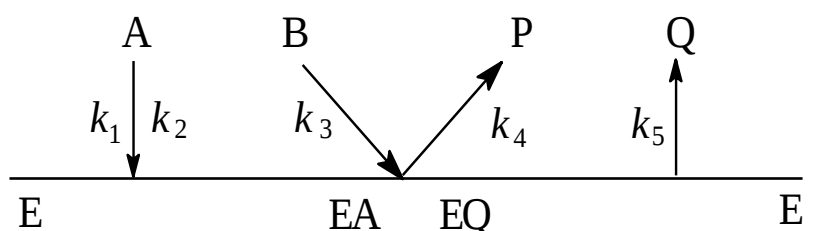
Analizom ovog sistema u stacionarnim uslovima, dolazi se do jednačine identične sa gore navedenom jednačinom, samo što u tom slučaju K_m^A i K_m^B ne predstavljaju konstante ravnoteže, nego složene veličine, koje u sebi sadrže nekoliko konstanti brzina. Ovakav usaglašeni mehanizam se šematski može predstaviti na sledeći način:



Slika 2.7 Šematski prikaz uzastopno-usaglašenog mehanizma.

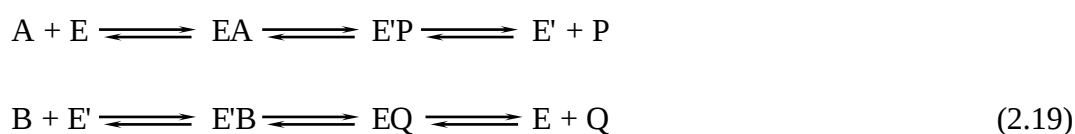
C. Usaglašeni mehanizmi sa zanemarljivo malim stacionarnim koncentracijama trojnog kompleksa (mehanizmi Teorela-Čansa).

Kod ovog mehanizma, imamo da je brzina stvaranja trojnog kompleksa tako mala, a da je brzina njegovog raspada tako velika, da je njegova koncentracija zanemarljiva i da ne utiče na kinetiku procesa. Proces se može šematski prikazati na sledeći način:



Slika 2.8 Šematski prikaz usaglašenog mehanizma sa malim stacionarnim koncentracijama trojnog kompleksa.

D. Mehanizam dvojne zamene, mehanizam dvofaznog prenosa ili ping-pong mehanizam. Kod dvosupstratnih enzimskih reakcija, koje teku po ovom mehanizmu, ne dolazi do stvaranja trojnih kompleksa. Kod ovih sistema reakcija teče uz obrazovanje niza dvojnih kompleksa, pri čemu je, u jednom od prelaznih stanja enzim vezan ne sa supstratom, nego sa grupom koja se prenosi. Takav stabilni intermedijer E' predstavlja enzim kovalentno vezan sa grupom koja se izdvaja od A u prvoj fazi, i koja se vezuje za B u drugoj fazi reakcije. Pre vezivanja drugog supstrata, stvara se jedan od proizvoda reakcije. Mehanizam se sastoji od dve nezavisne polu-reakcije razdvojene hemijski modifikovanim oblikom slobodnog enzima.



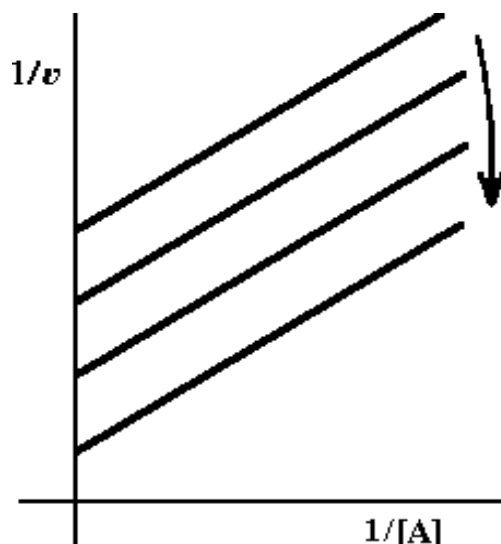
Opšta jednačina za brzinu enzimske reakcije je sledeća:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]}} \quad (2.20)$$

Jednačina recipročne vrednosti dobijena iz prethodne jednačine je sledeća:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m^A}{[A]} \cdot \frac{1}{V_{\max}} + \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]}\right) \cdot \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.21)$$

Iz nje se može videti da grafici dvostrukih recipročnih vrednosti za svaki od supstrata, pri nizu fiksiranih koncentracija drugog supstrata, obrazuju familiju paralelnih pravih linija. Prema izgledu ovih primarnih grafika mehanizam dvojne zamene se može lako razlikovati od prethodno navedena tri uzastopna mehanizma, kod kojih se prave linije seku u drugom ili trećem kvadrantu, ili na apscisnoj osi, levo od koordinatnog početka.



Slika 2.9 Zavisnost brzine enzimske reakcije od koncentracije prvog supstrata A, pri nekoliko različitih koncentracija drugog supstrata B, za slučaj mehanizma dvojne zamene. Konstante se mogu odrediti iz sekundarnih grafika zavisnosti dužina otečaka na $1/v$ osi od $1/[A]$ ili $1/[B]$.

2.2.1.3. Kinetika trosupstratnih enzimskih reakcija

Mehanizmi reakcija uz učešće tri ili više supstrata su analogni mehanizmima koji su karakteristični za dvosupstratne reakcije; međutim, nekada se sreću sistemi kod kojih se preklapa nekoliko mehanizama (hibridni mehanizmi). Trosupstratni sistemi mogu da funkcionišu po potpuno statističkom ili po potpuno uzastopnom mehanizmu; osim toga, dva supstrata mogu da interaguju po mehanizmu dvofaznog prenosa ili u skladu sa mehanizmom Teorela-Čansa, dok treći supstrat funkcioniše na delu reakcionog puta sa uzastopnom usaglašenošću, gradeći trojni kompleks (Keleti, 1986). Sreću se takođe i „hibridni“ statističko-usaglašeni mehanizmi. Ove reakcije je moguće ispitivati na isti način kao i dvosupstratne reakcije. Kao i kod njih, segmenti reakcija kod kojih se dva ili više supstrata vezuju sa enzimom statistički, daju u stacionarnim uslovima nelinearne grafike Lajnviver-Berk-a; dok su u ravnotežnim uslovima ti grafici linearni.

U literaturi je opisano da postoje šest varijanti trosupstratnih strogo usaglašenih mehanizama. Osim toga, postoje mnogobrojni ping-pong mehanizmi. Te mehanizme je teško razlikovati; ako se analizira isključivo početna brzina kao funkcija od koncentracije supstrata, tada ih je praktično nemoguće razlikovati. Za njihovo razlikovanje je moguće koristiti metodu inhibicije proizvodom, metodu korišćenja alternativnog supstrata i druge (Dixon, 1979; Keleti, 1986).

2.2.1.4. Utvrđivanje kinetičkog mehanizma

Za utvrđivanje kinetičkog mehanizma se mogu koristiti sledeće metode:

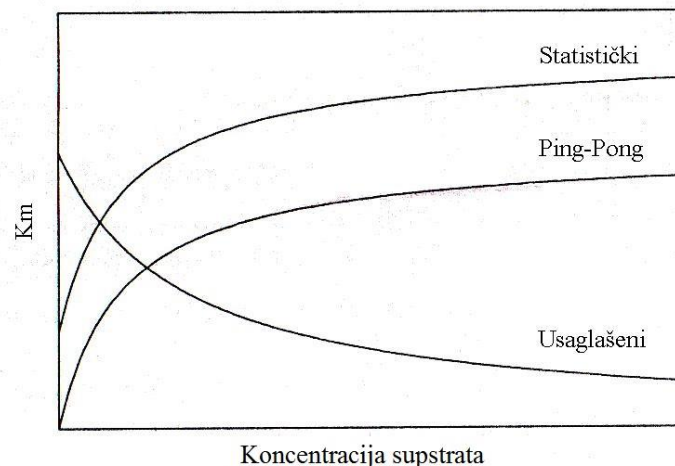
1. Korišćenje primarnih grafika
2. Ispitivanje inhibicije proizvodom
3. Ispitivanje ireverzibilne inhibicije
4. Korišćenje alterativnih supstrata
5. Jednačine Holdejna
6. Jednačine Dalcila
7. Korišćenje izotopne razmene.

Kod ispitivanja ireverzibilne inhibicije se koriste inhibitori enzima, koji nisu ni supstrati ni proizvodi date reakcije. Takva jedinjenja interaguju sa enzimom stvarajući abortivni kompleks (koji se ne nalazi na običnom putu reakcije); taj kompleks, za razliku od kompleksa koji enzim stvara sa supstratima ili proizvodima, nije sposoban za dalje transformacije. Tako npr. kod usaglašenih sistema ireverzibilni inhibitor koji je analog jednog od proizvoda reakcije može biti nekonkurentni inhibitor u odnosu na sve supstrate (Dixon, 1979; Keleti, 1986).

Poseban interes predstavlja karakter inhibicije u sistemima sa dvofaznim prenosom u prisustvu analoga proizvoda; mada ti analozi nisu u stanju da preobrate fazu oslobađanja proizvoda, kod njih veličina K_s^A ipak bi bila jednaka nuli (Dixon, 1979; Keleti, 1986).

Kod korišćenja alterativnih supstrata se u sistem sa enzimom koji katalizuje dvosupstratnu ili trosupstratnu reakciju uvode dva različita prva (ili druga, ili treća) supstrata uporedo sa drugim (i trećim) supstratom. Takvi sistemi se mogu ispitivati metodom: određivanja brzine stvaranja jednog od alternativnih proizvoda, ili metodom određivanja ukupne brzine stvaranja proizvoda (Dixon, 1979; Keleti, 1986; Marangoni, 2003).

Pored prethodno pomenutih načina za utvrđivanje kinetičkog mehanizma reakcije, takođe, moguće je utvrditi kinetički mehanizam i merenjem Michaelis-ove konstante (K_m) u zavisnosti od promene koncentracije supstrata u reakcionoj smeši (slika 2.10, Marangoni, 2003).



Slika 2.10 Zavisnost Michaelis-ove konstante (K_m) u funkciji od koncentracije supstrata za statistički, ping-pong i usaglašeni mehanizam (Marangoni, 2003).

2.2.1.5. Određivanje K_m i V_{max}

A. Michaelis-ova konstanta (K_m) je ključni parametar Michaelis-Mentenove jednačine. Ona karakteriše ponašanje datog enzima prema jednom ili drugom supstratu pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne brzine. Ona se izražava u istim jedinicama kao i koncentracija supstrata, najčešće u mM. Njena vrednost ne zavisi od koncentracije enzima, ali zavisi od temperature, pH i jonske jačine. K_m predstavlja onu koncentraciju supstrata pri kojoj je polovina aktivnih centara enzima popunjena supstratom (Ž. B. Petronijević, u pripremi).

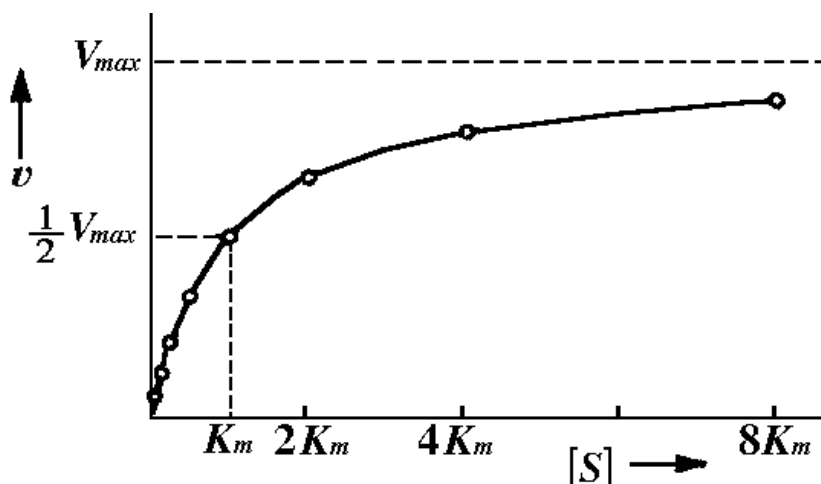
B. Maksimalna brzina (V_{max}) kod različitih enzima jako varira. Ona takođe zavisi i od vrste supstrata, pH i temperature. Kada dolazi do zasićenja enzima sa supstratom, sva količina enzima se nalazi u obliku enzim-supstratnog kompleksa, tada se brzina enzimske reakcije, tj. maksimalna brzina, može se izraziti jednačinom 2.22.

$$V_{max} = k_{+2}[ES] = k_{+2}[E] \quad (2.22)$$

Za razliku od Michaelis-ove konstante, V_{max} ima isto značenje i u ravnotežnim i u stacionarnim uslovima.

Grafik direktne zavisnosti v od $[S]$ predstavlja ustvari odsečak ravnostrane hiperbole. Ako se kao v uzme vrednost $V_{max}/2$, dobija se $[S]=K_m$ i veličina K_m će biti jednaka apscisi „srednje“ tačke eksperimentalne krive. Međutim, sasvim je očigledno da, sa izuzetkom onih

slučajeva gde je veličina K_m izuzetno mala, eksperimentalno dobijene vrednosti brzine (v) nikada neće dostići vrednosti V_{max} , već se mogu samo asimptotski približavati (slika 2.11).

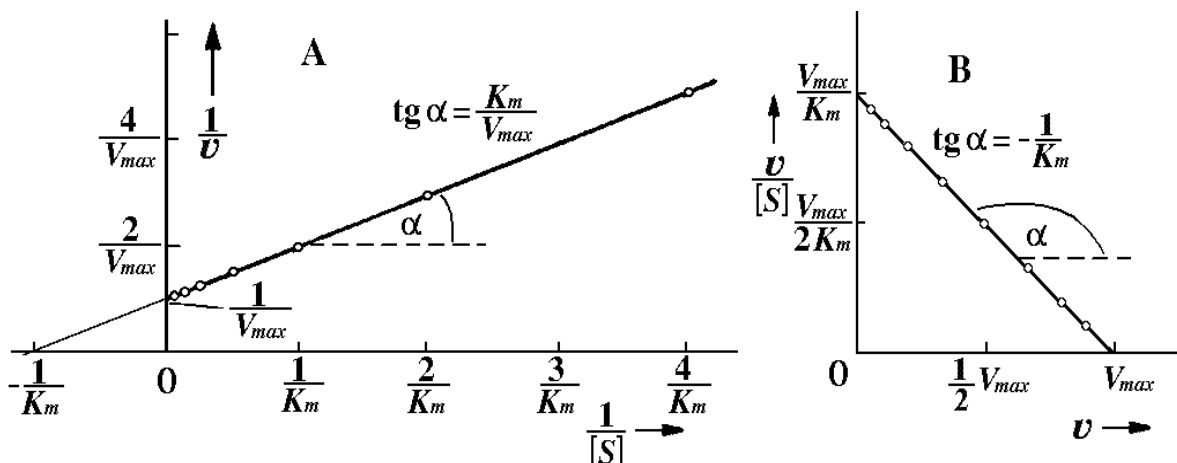


Slika 2.11 Grafik direktne zavisnosti brzine enzimske reakcije od koncentracije supstrata.

Bilo koja poteškoća da se dobiju V_{max} i K_m sa grafika zavisnosti bi nesumljivo proizvela grešku. Da bi se rešili ovaj problem, uvodi se linearna zavisnost između dve promenljive transformacijom Michaelis-ove jednačine. U ovom slučaju kinetički parametri se mogu odrediti jednostavnim crtanjem prave linije. Dva najčešća načina linearne transformacije Michaelis-Menten-jednačine su prikazana na slici 2.12. Grafičke metode koje su zaslužile posebnu pažnju su one koje su poznate pod nazivom direktna linearizacija. Direktna linearizacija je parametarski dijagram: odsecci, umesto promenljivih, predstavljaju kinetičke parametre, V_{max} i K_m , i svako eksperimentalno ispitivanje se predstavlja na grafiku u vidu prave linije. Svaka tačka na grafiku je koordinisana dajući par vrednosti parametara zadovoljavajući Michaelis-Menten-ovu jednačinu na osnovu eksperimentalnih ispitivanja (Ranaldi i sar, 1999).

Grafik naveden na slici 2.12A se obično naziva po Lajnriver-Berk-u. Kod njega prava definisana gore navedenom jednačinom seče apscisu u tački $-1/K_m$, ordinatu u tački $1/V_{max}$ i ima nagib jednak K_m/V_{max} .

Ako nisu prisutne eksperimentalne greške, „n“ linija imaju tačku preseka koja zadovoljava jednačinu Michaelis-Mentena za „n“ ispitivanja (Ranaldi i sar, 1999). U praksi, jednim presekom ćemo dobiti grupu presečnih tačaka i tako najbolje proceniti K_m i V_{max} koje mogu biti uzete kao srednje vrednosti koje odgovaraju vrednostima apscise i ordinate respektivno. Glavna prednost direktne linearizacije grafika je to što je teorijski nezavisna od prirode eksperimentalnih grešaka.



Slika 2.12 Grafik recipročnih vrednosti, ili grafik Lajnriver-Berk-a (A). Grafik zavisnosti $v/[S]$ od V_{max} , ili grafik Idi-Hofsti-ja (B).

2.2.2. Oksidoreduktaze

U metabolizmu su najzastupljeniji enzimi koji katalizuju oksido-redukcijske reakcije. To je grupa enzima koji se zajedničkim imenom nazivaju oksidoreduktaze. Enzimi koji omogućavaju prenos vodonika i elektrona, ili samo elektrona, na molekulski kiseonik nazivaju se oksidaze. Oksidaze su enzimi koji npr. katalizuju stvaranje dvostruke veze u aktiviranim masnim kiselinama tokom njihove oksidacije u peroksizomima. U toj reakciji se prenose 2 elektrona na H_2O dajući kao produkt H_2O_2 . Citohrom-oksidge učestvuju u respiratornom lancu, i prenose 2 elektrona na $1/2 O_2$ i redukuju kiseonik do H_2O .

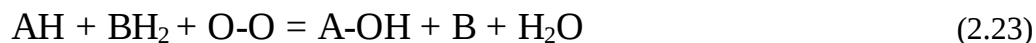
Elektroni se prenose s molekula donora na molekul akceptora na jedan od četiri načina :

- 1) direktno, preko redoks para,
- 2) prenosom elektrona i vodonikovih atoma (hidrogenacija = redukcija i dehidrogenacija = oksidacija)
- 3) prenosom hidridnog jona: H^- koji nosi 2 elektrona. U metabolizmu se hidridni joni prenose s molekula supstrata na koenzim NAD^+ pri čemu nastaje $NADH$.
- 4) tokom direktne reakcije sa kiseonikom (kiseonik se može direktno ugraditi u proizvod).

Enzimi koji uvode kiseonik u molekul supstrata stvarajući na supstratu novu funkcionalnu grupu, hidroksilnu ili karboksilnu, nazivaju se oksigenaze. Postoje dve vrste oksigenaza: dioksidgenaze koje uvode oba atoma kiseonika iz molekula kiseonika u molekul

supstrata i monooksigenaze koje uvode samo jedan atom kiseonika u supstrat, dok se drugi atom kiseonika redukuje u vodu (Hankonyi, 1996).

Monooksigenaze zahtevaju postojanje 2 redukujuća supstrata za dva atoma kiseonika. S obzirom da mnoge monooksigenaze katalizuju reakcije u kojima glavni supstrat postaje hidroksilovan, takve enzime često nazivamo hidroksilaze. Reakciju koju katališu monooksigenaze možemo uopšteno napisati (Karlson, 1993):



Stvaranje i raskidanje C-C veze:

Kovalentna veza se može cepati na dva načina homolitički ili heterolitički. Pri homolitičkom cepanju veze svaki C-atom zadržava po jedan elektron iz zajedničke veze, na taj način nastaju radikali.

Heterolitičkim cepanjem nastaju joni. Ako se molekul sastoji od atoma različite elektronegativnosti tada kod heterolitičkog cepanja elektronegativniji atom zadržava oba elektrona iz zajedničke veze i pri tom nastaje anjon, a manje elektronegativan atom ostaje bez elektrona i postaje katjon. Stvaranje novih veza često se događa supstitucijskim mehanizmom. Supstitucijske reakcije su pretežno nukleofilnog karaktera, a dešavaju se kada jedna elektronima bogata grupa ili atom zamenjuje drugi atom ili grupu koja je bogata elektronima.

Mnoge metaboličke reakcije uključuju interakcije između nukleofila, funkcionalnih grupa koje su bogate elektronima pa se ponašaju kao donori elektrona, i elektrofila - elektron deficijentnih grupa koje se ponašaju kao akceptori elektrona.

Funkcionalne grupe koje sadrže N, S, O su važni biološki nukleofili. Najčešći elektrofil je vodonikov jon (H^+). C-atom može biti nukleofilnog i elektrofilnog karaktera u zavisnosti od funkcionalnim grupa kojima je okružen (Karlson, 1993).

2.2.2.1. Peroksidaza

Peroksidaze su široko rasprostranjene u prirodi. Većina peroksidaza su hemoproteini i sadrže gvožđe (III) protoporfirin IX (feriprotoporfirin IX) kao prostetičnu grupu. Familija peroksidaza obuhvata kvašćevu citohrom c peroksidazu, biljnu askorbat peroksidazu, peroksidazu iz gljiva, i druge klasične biljne peroksidaze (Osman i sar., 2008).

Fenomen oksidacije fenola pomoću enzima je dobro poznat još od ranih šezdesetih godina, ali prva njegova primena za prečišćavanje otpadnih voda počela oko 15 godina posle. Peroksidaze, poput one iz: rena, *Coprinus macrorhizus*, *Arthromices ramosus*, i soje su dokazano efikasne za uklanjanje fenola i fenolnih jedinjenja iz vode u prisustvu vodonik-peroksida.

U prisustvu redukujućih supstrata, HRP pokazuje nepovratan, osnovni i vremenski zavistan inaktivirajući mehanizam. Ova inaktivacija je najverovatnije posledica interakcije fenoksi radikala sa aktivnim centrom enzima tokom oksidacije fenola; međutim, intermedijeri i konačni oblici enzima, koji su uključeni u ovom mehanizmu inaktivacije su nepoznati (Wu i sar., 1998).

Peroksidaza iz biljaka i sisara proizvodi aromatične oksi radikale iz nekoliko aromatičnih supstrata i reaktivne kiseonične vrste kao deo odbrambenog mehanizma protiv patogena. Ovi organski i neorganski slobodni radikali mogu da učestvuju i u fiziološkim procesima u biljkama, kao što su lignifikacija, biosinteza ćelijskog zida, katabolizam auksina i dr. Međutim, generisane ROS u reakcijama koje su katalizovane peroksidazom mogu takođe da doprinesu progresivnom oštećenju ljudskog tkiva kod hroničnih inflamatornih bolesti, kao što su ateroskleroza, astma, kao i reumatoidni artritis, što čini peroksidazu interesantnim farmakološkim agansom. Upotreba fenolnih jedinjenja, koja predstavljaju slobodne radikale koji brzo reaguju, bila je jedna od terapijskih strategija u borbi protiv zapaljenjskih oboljenja. Smanjivanje sinteze prostaglandina pomoću fenolnih jedinjenja, kako je objavljeno, omogućava inhibiciju ciklooksigenazne proksidativne aktivnosti (Papadimitrakou, 1999).

Peroksidaza iz rena (HRP) je dobro poznati i detaljno istraživani enzim iz familije peroksidaza. Oksidacija luminola katalizovana sa HRP u prisustvu H_2O_2 -a se intenzivno koristi za pretraživanje novih molekula sa antioksidativnom aktivnošću, posebno zbog visoke osetljivosti, jednostavne procedure testiranja, i relativno niske cene. Ona takođe predstavlja korisno sredstvo u proceni prirodnih bioaktivnih jedinjenja, proizvodnji, hemijskim sintezama, a prisutna je i u nekim farmaceutskim formulacijama (Veitch, 2004).

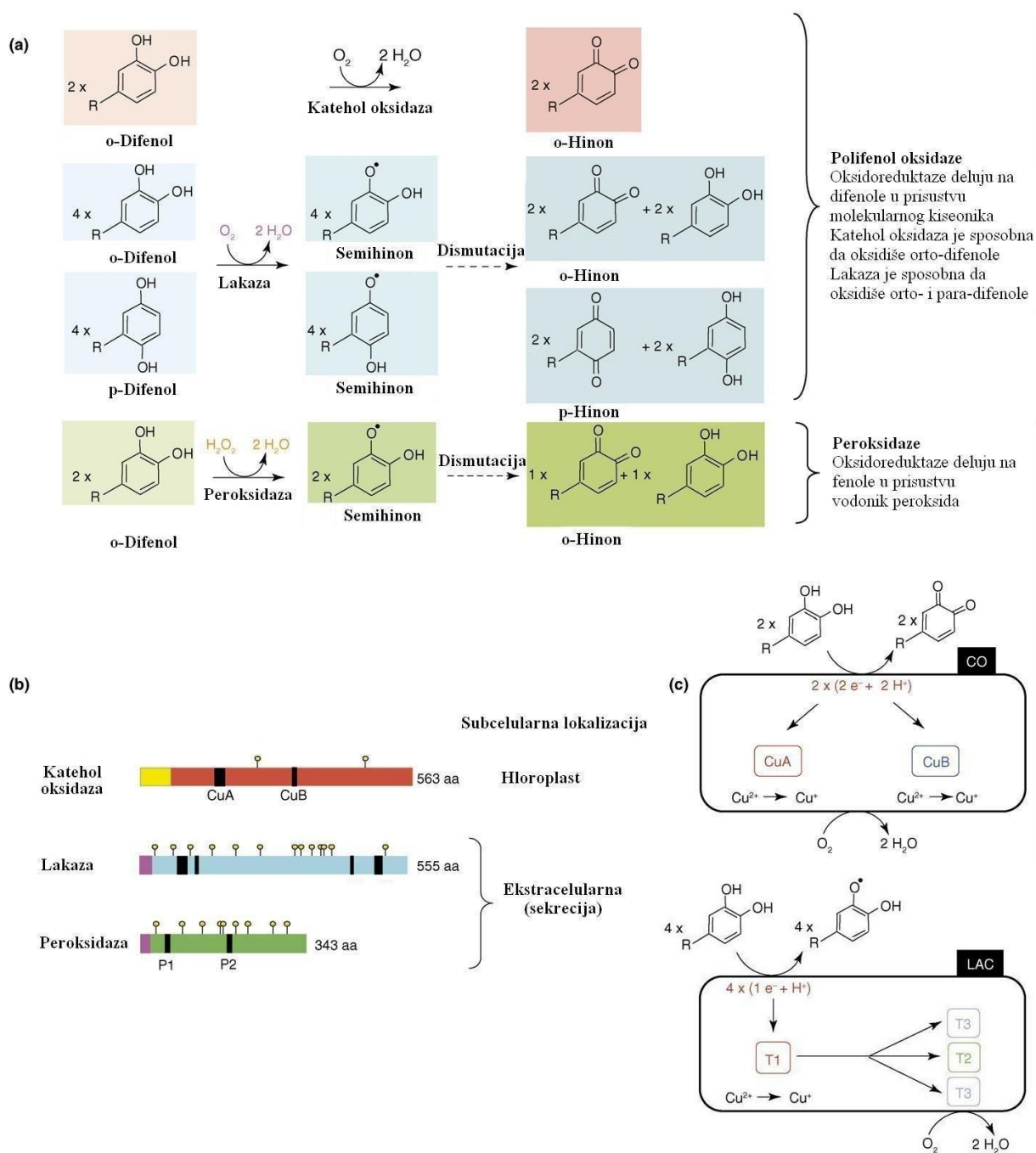
2.3. Oksidacija flavonoida pomoću enzima

Gotovo svi flavonoidi, a naročito oni koji u sebi imaju *orto*-difenolnu strukturu, mogu da se oksiduju do njihovih odgovarajućih semihinona i hinona pomoću neke od oksidaza (slika 2.13) (polifenol oksidaza (PPO) i peroksidaza (POD)). Nastali semihinoni i hinoni su visoko reaktivne vrste koje se stvaraju i u reakciji bez prisustva enzima. Oni mogu spontano

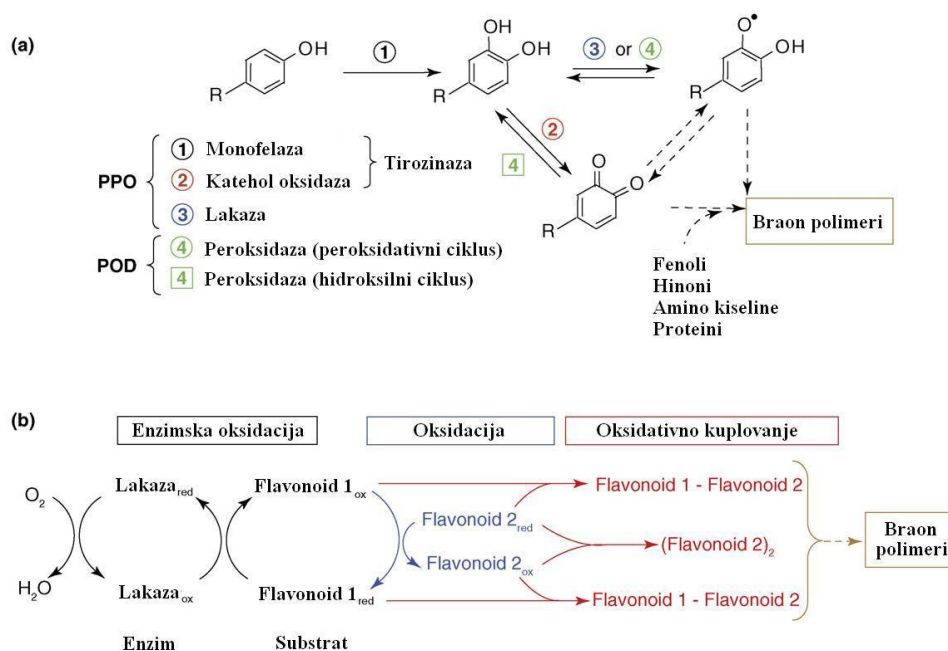
da reaguju sa fenolima, amino kiselinama ili proteinima, dajući kompleks smeše braon proizvoda (slika 2.14). Ne-enzimske oksidacije flavonoida, kao što su autooksidacija i hemijska oksidacija, takođe mogu dovesti do formiranja hinonskih jedinjenja. Kroz oksidacione reakcije, hinoni mogu da oksidišu druge polifenole, koji se ne mogu direktno oksidovati pod dejstvom enzima, čime se formiraju sekundarni hinoni, koji, za uzvrat, doprinose formiranju heterogenih polimera koji su odgovorni za „browning“ reakciju (slika 2.14b). Inače, sastav ovih braon polimernih vrsta je izuzetno teško *in vivo* okarakterisati (Pourcel i sar., 2007). Enzimska oksidacija polifenola, posebno flavonoida, se obično javlja i tokom prerade hrane biljnog porekla, kao i tokom skladištenja. Naime, odavno je poznato je da PPO katalizuje dve različite reakcije: (1) uvođenje hidroksilne grupe u monofenol, pretvarajući ga u *o*-difenol i (2) oksidacija *o*-difenola u *o*-hinon. Druga reakcija se smatra fundamentalnim korakom u enzimskoj „browning“ reakciji koja se javlja u hrani, jer su *o*-hinoni veoma reaktivni i kondenzuju se spontano u braon ili crne polimere (Makris i Rossiter, 2002; Pourcel i sar., 2007).

Vremenom je razvijeno nekoliko tehnika za inhibiranje ove reakcije, gde se pored fizičkih metoda (npr. toplota, modifikovana atmosfera) koriste i hemijski inhibitori (npr. askorbinska kiselina, halogenidni joni, karboksilna kiselina), koji mogu da utiču na enzime, supstrate ili proizvode. Genetski inženjering takođe nudi alternativu za proizvodnju voća i povrća sa povećanom otpornošću na enzimsku „browning“ reakciju (Pourcel i sar., 2007).

Glikozidi flavonola takođe mogu biti napadnuti od strane POD, s tim što su se oni pokazali kao ne idealni supstrati za POD. Ispitivanja su pokazala da se prilikom oksidacije kvercetina, morina, i rutina pomoću POD i PPO formiraju isti proizvodi, koji daju veoma slične hromatografske profile (Makris i Rossiter, 2002). Strukturne razlike nastale zamenom strukture u B-prstenu kvercetina i morina su veoma značajne, s tim što se dostupnost 3-hidroksilne grupe nikada ne dovodi u pitanje. Flavonolni glikozidi koji su strukturno povezani sa rutinom takođe mogu biti izloženi delovanju oksidaza, ali u manjoj meri nego aglikoni, kao što je to slučaj sa kvercetinom i morinom (Makris i Rossiter, 2002).

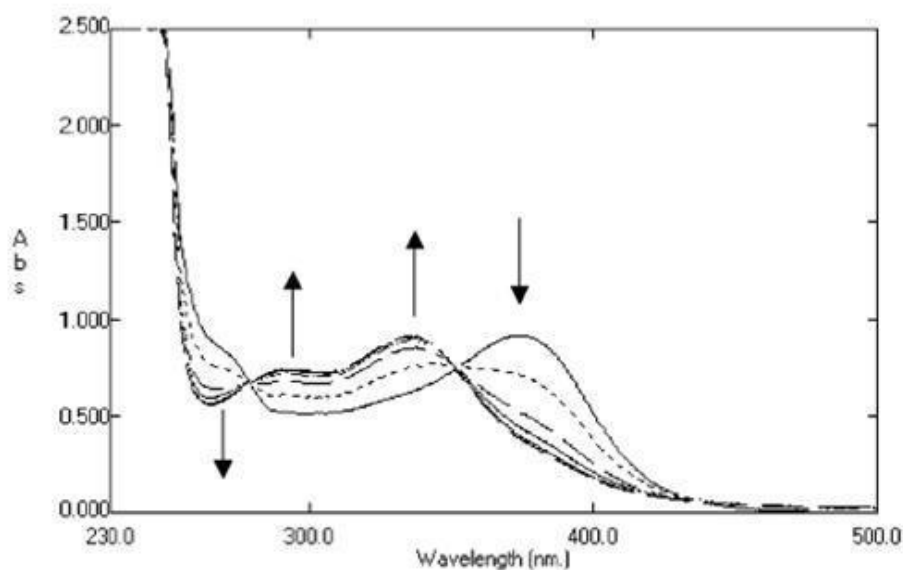


Slika 2.13 Tri ključna enzima za oksidaciju flavonoida u biljkama. **(a)** Enzimski reakcija polifenol oksidaze i peroksidaze. **(b)** Glavne strukturne karakteristike biljnih polifenol oksidaza i peroksidaza su predstavljene i međusobno upoređene. P1 i P2 hem-vezujuća mesta. Skraćenica aa se odnosi na aminokiseline. **(c)** Katalitički mehanizam polifenol oksidaze, katehol oksidaze i lakaze. CuA, CuB i T su bakar-vezujuća mesta (Pourcel i sar., 2007).



Slika 2.14 Mehanizmi oksidacije flavonoida koji dovode do braon polimera. Enzimske interakcije koje dovode do „browning“ (a). Oksidacija flavonoida (b). Skraćenica *R* se odnosi na radikal (Pourcel i sar., 2007).

Nedavna ispitivanja delovanja PPO i POD na kvercetin su pokazala da dolazi do karakterističnih promena u UV-spektru kvercetina (slika 2.15), koje se ne pojavljuju u smeši bez enzima ili kvercetina. Tačnije, u spektru kvercetina se pojavljuju dve prevojne tačke na 279 i 351 nm, dok se apsorbancija na 256 i 375 nm smanjuje sa propratnim povećanjem na 291,5 i 335,5 nm. S druge strane prilikom oksidacije kvercetina sa POD dobijena su dva maksimuma na 292 i 326 nm, pri čemu u odsustvu POD ili H_2O_2 nije bilo reakcije (Makris i Rossiter, 2002). Dobijeni metaboliti posredstvom peroksidaze, načešće su posledica reakcija oligopolimerizacije, koje se javljaju pod dejstvom peroksidaze koja katalizuje jedno elektronsku oksidaciju flavonola. Iako peroksidaze normalno daju jedno elektronsku oksidaciju, reakcioni putevi često uključuju i drugu elektronsku oksidaciju i/ili dismutaciju flavonoidnih semihinonskih radikala, koji dovode do intermedijera hinonskog tipa (Awad i sar., 2000).



Slika 2.15 Promene u UV-VIS spektru kvercetina nastale u reakciji sa tirozinazom (Makris i Rossiter, 2002).

Ipak, dejstvo POD na flavonoide ne mora uvek da rezultira razgradnjom flavonolnog skeleta. Tako na primer, sirovi preparati *Cicer arietinum* L. konvertuju flavonole, kao što su kaemferol, kvercetin i morin, u odgovarajuće 2,3-dihidroksiflavonone. HRP i peroksidaza iz biljaka *Mentha piperita* i *Mentha arvensis*, su takođe pokazale da obavljaju istu reakciju. Utvrđeno je da su transformacije sa preparatima koji su poreklom iz poslednje dve biljke nezavisni od H_2O_2 , ali su zavisni od O_2 (Makris i Rossiter, 2002). Takođe, inkubacija kvercetina sa sirovinim preparatom enzima iz crvene deteline (*Trifolium pratense* L.) dovodi do formiranja dihidroksi derivata (Makris i Rossiter, 2002).

Zahvaljujući strukturnim karakteristikama kvercetina i drugih flavonoida, moguće je vršiti i njihovu enzimsku oksidaciju u prisustvu različitih nukleofila. Nedavno je ispitivana oksidacija kvercetina pomoću HRP u prisustvu glutaciona. Rezultati ispitivanja su potvrdili da prilikom oksidacije kvercetina dolazi do inkorporiranja kiseonika u njegovu strukturu, nakon čega nastaje enzimsko degradacija intermedijera u supstituisane benzojeve kiseline, koje se kasnije transformišu pomoću reakcija hidroksilacije, dekarboksilacije, i reakcija razlaganja B prstena, što na kraju dovodi do stvaranja veoma složene mešavine polarnih jedinjenja (Cherviakovsky i sar, 2006; Miura i sar, 2003). Sa druge strane neka ispitivanja oksidacije flavonoida sa peroksidazama u prisustvu tiolnih komponenti ukazuju i na sposobnost tiolnih jedinjenja da sakupljaju stvorene flavonoidne semihononske radikale, pri čemu dolazi do regeneracije flavonoida i stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta koje imaju toksičan efekat

(Metodiewa i sar., 1999; Galati i sar., 1999). Ove reakcije su ranije posebno bile specifične za flavonoide poput apigenina, naringenina, naringina, a od 2000. godine dokazano je da ovakve reakcije važe i za kvercetin (Awad i sar., 2000; Galati i sar., 1999).

2.4. Enzimska modifikacija flavonoida

Biotransformacija predstavlja korisnu metodu za proizvodnju dragocenih proizvoda u hemijskoj sintezi, farmaceutskoj industriji, biotehnologiji i poljoprivredi. Sve veća potražnja za složenim hiralnim jedinjenjima i ekološki čistim procesima podstiče industrijska i akademska istraživanja u oblasti biokatalize (Serra i sar., 2005). Prednosti biokatalize u odnosu na konvencionalni hemijski pristup su: (1) visoka hemo-, regio- i stereo-selektivnost enzima i delovanje pod blagim reakcionim uslovima (Collins i Kennedy, 1999; Nagasawa i Yamada, 1995; Leuenberger, 1990); (2) mogućnost dobijanja visokoprečišćenih proizvoda (Kang i sar., 2005), pri čemu je prečišćavanje reakcionog sistema obično lakše nego u hemijskim sistemima; (3) biokatalizovani procesi su ekološki prihvatljivi; (4) mogućnost istovremenog odvijanja nekoliko reakcija zahvaljujući kompatibilnosti enzima. Osim toga, mikrobne ćelije ili enzimi mogu da se imobilišu i ponovo koriste u više ciklusa (Viskupičová i sar., 2009).

Zbog značajnih bioloških aktivnosti koje flavonoidi poseduju i niza korisnih efekata koje ispoljavaju, veliko interesovanje naučne i stručne javnosti je usmereno ka upotrebi flavonoida u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Međutim, njihova nedovoljna stabilnost i slaba rastvorljivost može da predstavlja ograničenje za njihovu upotrebu. Jedan od efikasnih načina za prevazilaženje ovog nedostatka jeste upotreba enzima ili celih ćelijskih sistema za specifičnu modifikaciju skeleta flavonoida čime se može povećati prirodni diverzitet flavonoida i mogu se dobiti potencijalno bioaktivni derivati sa poboljšanim osnovnim karakteristikama (Xiao-na i sar., 2012). Pored toga, u reakciji transformacije flavonoida do relevantnih estara posredstvom enzima može da se postigne i visok stepen regioselektivnosti, što je od izuzetne važnosti u ovakvim reakcijama. Najbolji primeri ovakvih enzimskih modifikacija jesu esterifikacija flavonoida i acilacija šećernih ostataka glikozida flavonoida sa alifatičnim ili aromatičnim molekulima čime može da se poboljša ne samo rastvorljivost u različitim medijumima, već i njihova stabilnost i antioksidantna aktivnost (Viskupičová i sar., 2009; Xiao-na i sar., 2012; Patti i sar., 2000; Tommasini i sar., 2004; Fossen i sar., 1998). S ciljem da se pronade najpotentniji biokatalizator za selektivnu acilaciju flavonoida, u prethodnim ispitivanjima intenzivno se

radilo na ispitivanju različitih vrsta enzima kao što su lipaza, esteraza, proteaza i acil-transferaza. Dati enzimi su često u imobilisanim oblicima koji povećavaju stabilnost enzima, olakšavaju izolaciju proizvoda i omogućavaju ponovnu upotrebu enzima (Adamczak i Krishna, 2004). Treba imati na umu da je od izuzetne važnosti dobro poznavanje glavnih faktora koji utiču na performanse biokatalitičkog procesa. Kada se primene optimalni uslovi (enzim, temperatura, medijum, supstrat itd.), prinos nakon konverzije veoma često može biti veći od 95% (Chebil i sar., 2006). U istraživanjima koja su sprovedena od strane Liang-a i njegovih saradnika (2014) ispitivana je mogućnost sinteze glukozida kvercetina u reakciji transglikozilacije katalizovane dekstransaharazom, pri čemu je dobijen novi kvercetin monoglukozid sa prinosom od 39,5%. S druge strane, regioselektivnom acilacijom kvercetina katalizovanom novom termofilnom esterazom (APE1547) iz *Aeropyrum pernix* K1, pod određenim reakcionim uslovima, postignuta je konačna konverzija kvercetina od oko 100%, pri čemu su sintetisana tri nova proizvoda (Xiao-na i sar., 2012). Danieli je sa svojim saradnicima (1989) ispitivao acilovanje izokvercitrina (glukozida flavonoida) i luteolin-7-glukozida u anhidridrovanom piridinu primenom *Carlsberg* subtilizina sa 2,2,2 trifluoroetil butanoatom kao acil donorom. Nakon 48 h inkubacije, ostvareni procenti konverzije izokvercetina i luteolin-7-glukozida su bili 86 i 76%, respektivno. U reakcijama acilovanja flavonoida lipaze spadaju u grupu enzima koja je najčešće korišćena. Mozhaev je sa svojim saradnicima (1998) testirao 15 lipaza za potrebe acilovanja bergenina. Najbolji rezultati acilovanja bergenina su dobijeni upotrebom lipaze iz *Candida Antarctica*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia cepacea* i *Rhizopus oryzae* kao biokatalizatora. Za acilovanje (+)katehina sa vinil acetatom, Lambusta je sa svojim saradnicima (1993) koristio 7 lipaza, ali samo jedna iz *Pseudomonas cepacea* (PCL) je dala značajan prinos nakon 48 sati. Pored lipaza neke od reakcija esterifikacije mogu biti katalizovane i acil transferazama, međutim one zahtevaju upotrebu aktiviranog acil donora ili prisustvo *in situ* sistema koji dozvoljava stvaranje ovih derivata (Fujiwara i sar., 1998; Nakajima i sar., 2000).

2.5. Imobilizacija enzima

Imobilizacija enzima predstavlja proces uključivanja molekula enzima u određenu izolovanu fazu koja je odvojena od slobodnog rastvora, ali je sposobna da reaguje sa u njemu prisutnim molekulima supstrata, efektorima ili inhibitora. Imobilisani enzim predstavlja harmonični sistem čije su karakteristike u celini određene pravilnim izborom tri osnovne komponente: enzima, nosača i metoda vezivanja enzima za nosač (An i sar., 2015; Di Risio i

Yan, 2009). Jedan od glavnih parametara kod imobilizacije enzima jeste efikasnost imobilizacije, za koju postoji nekoliko različitih definicija, a jedna od najpoznatijih jeste da efikasnost imobilizacije predstavlja udeo imobilisane aktivnosti u ukupnom gubitku enzima iz rastvora:

$$\text{Efikasnost imobilizacije (\%)} = \frac{\text{Imobilisana aktivnost} \times 100}{\text{Polazna aktivnost} - (\text{aktivnost u supernatantu} + \text{suma aktivnosti u vodama od ispiranja})} \quad (2.24)$$

2.5.1. Nosači za imobilizaciju enzima

Kod izbora nosača treba voditi računa o njegovoj specifičnoj površini, mehaničkoj jačini i fizičkom obliku, o željenom stepenu hidrofilnosti ili hidrofobnosti, o hemijskoj reaktivnosti koja omogućava vezivanje enzima pogodnim metodama, o hemijskoj stabilnosti u uslovima imobilizacije i primene imobilisanog enzima, o postojanosti na delovanje mikroorganizama. Nijedan poznati nosač ne ispunjava sve ove zahteve (An i sar., 2015).

2.5.1.1. Organski polimerni nosači

Od organskih polimernih nosača se koriste prirodni nosači: polisaharidni (celuloza i agaroza, a u izvesnoj meri i sefadeski, sušderasti skrob, alginati, tanin i hitin) i proteini (kolagen, keratin i dr.). Osim prirodnih koriste se i mnogi sintetički polimerni nosači. Polisaharidni nosači sadrže uvek hidroksilne, a nekada i -NH₂ ili -COOH grupe. Kod sintetičkih organskih polimernih nosača se u toku sinteze planski stvaraju reakcionosposobne grupe kao i određeni stepen hidrofilnosti ili hidrofobnosti (Petronijević, 1988).

2.5.1.1.1. Polisaharidni nosači

Celuloza

Prednosti celuloze su niska cena i odsustvo nespecifičnih interakcija proteina sa nosačem. Nedostaci celuloze kao nosača su: u kiselj sredini dolazi do hidrolize glikozidnih veza, pod dejstvom oksidanasa (npr. NaJO₄) stvaraju se -CHO i -COOH grupe, a podložna je i delovanju mikroorganizama (Linder i Teeri, 1997).

Agaroza

Agaroza je linearni polisaharid koji zadovoljava najveći broj zahteva za idealnim nosačem. Pošto je dosta skupa poželjna je upotreba metoda koje omogućavaju regeneraciju nosača posle gubitaka enzimske aktivnosti (Giacomini i sar., 1998).

Geli Sefadeksa

Geli Sefadeksa su hemijski dovoljno postojna jedinjenja, ali pri niskim vrednostima pH njihove glikozidne veze su osetljive na hidrolizu. Osetljivi su prema oksidacionim sredstvima delovanju mikroorganizama. Enzimi vezani za sefadeks pokazuju obično veću relativnu aktivnost od odgovarajućih enzima vezanih za celulozu (Porath i Axén, 1976).

Sunderasti skrob

Dobija se hemijskom modifikacijom skroba sa umrežavajućim agensima (formaldehid, glioksal, glutaraldehid). Ima veću postojanost prema enzimima koji hidrolizuju polisaharide od skroba (Petronijević, 1988).

Alginska kiselina

Alginska kiselina je polisaharid, koji se koristi za imobilizaciju enzima zahvaljujući svojoj sposobnosti da obrazuje gel sa jonima Ca^{2+} pri čemu nastaje Ca-alginat (Jeon i sar., 2012).

2.5.1.1.2. Prirodni proteinski nosači

Upotreba proteinskih nosača za imobilizaciju enzima se izbegava iz sledećih razloga:

- Podložni su mikrobiološkoj razgradnji
- Ne mogu se upotrebljavati in vivo u medicinske svrhe zbog imune reakcije.

Međutim kolagen, ako se obradi taninom, postaje otporan na mikroorganizme, a ako se kolagen ili fibrin zagreju do 140 °C, gube antigeni karakter.

Drugi protein koji je našao primenu kao nosač za imobilizaciju enzima je keratin. On je nerastvoran u vodi, razblaženim bazama i kiselinama, alkoholu, etru i acetonu, ima visok sadržaj cisteina i naročito je pogodan za imobilizaciju SH-enzima. Imobilizacija enzima na keratinu obično se izvodi pomoću umrežavajućih agenasa kao što su glutaraldehid, formaldehid ili tanin (Nakata i sar., 2015; Petronijević, 1988).

2.5.1.2. Polimeri na bazi akrilne kiseline

Poliakrilamidni geli se proizvode pod imenom Bio-Gel P. Pogodnim metodama se mogu dobiti mnogi derivati umreženog poliakrilamida koji su pogodni za imobilizaciju enzima (Abdel-Halim i Al-Deyab, 2011).

2.5.1.3. Ostali sintetički polimerni nosači

Nosači na bazi PV-alkohola umreženog sa tereftalnim aldehidom sadrži -OH grupe, hidrofilan je i može se efikasno upotrebiti za imobilizaciju enzima. Enzimi namenjeni medicini se imobilišu na vodorastvornim sintetičkim polimerima koji su postojani i biološki inertni (npr. polimeri na bazi polivinilpirolidona) (Takei i sar., 2011).

2.5.1.4. Neorganski nosači za imobilizaciju enzima

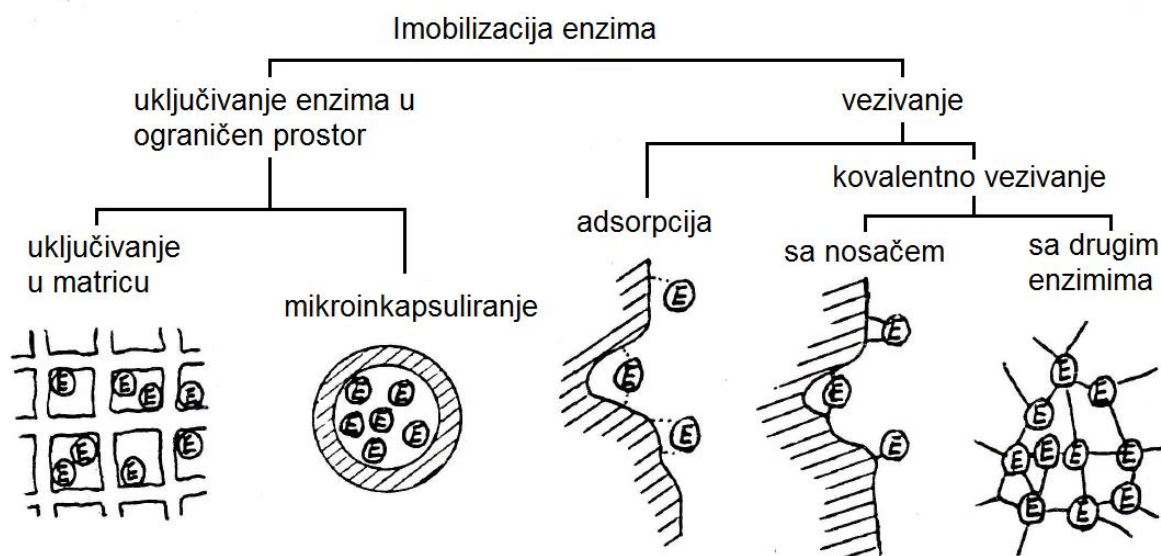
Od neorganskih nosača se upotrebljavaju sintetički silikatni materijali, metali i njihovi oksidi, nerđajući čelik, prirodni minerali, glina i keramika. Glavna prednost neorganskih nosača je u tome što se lako regenerišu i što im se može dati željena konfiguracija. Ova svojstva su veoma značajna kod primene imobilisanih enzima u industrijskim procesima. Najčešće se koriste sintetički porozni silikatni sorbenti: makroporozno staklo, silikageli i silohromi. Nedostaci vezani za njihovu upotrebu (nespecifična adsorpcija, povećana rastvorljivost pri alkalnim pH) se mogu ukloniti modifikacijom njihove površine. Modifikacija površine, pored toga obezbeđuje bolju stabilnost imobilisanih preparata i omogućava primenu novih načina vezivanja enzima za nosač. Modifikacija se može izvesti:

- Delovanjem soli prelaznih metala (TiCl_4 , FeCl_2 , FeCl_3 , SnCl_4)
- Tretiranjem različitim substancama, često i polimerima, koji pokrivaju centre nespecifične adsorpcije i zahvaljujući svojim funkcionalnim grupama omogućuju naknadno kovalentno vezivanje enzima (Suzuki, 1991).

Za industrijske svrhe važnu ulogu imaju nosači od keramike sa definisanom poroznošću. Njene osnovne prednosti su niska cena i mogućnost variranja naelektrisanja površine u zavisnosti od korišćenih sirovina.

2.5.2. Metode imobilizacije enzima

Metode imobilizacije se mogu podeliti na nekoliko glavnih grupa. Podela je zasnovana na karakteru procesa izvođenja imobilizacije.



Slika 2.16 Metode za imobilizaciju enzima.

Kod izbora metoda imobilizacije treba voditi računa o sledećem:

1. Enzim treba da bude stabilan u uslovima izvođenja procesa imobilizacije (pH i temperatura u toku imobilizacije).
2. Poželjno je, ako je moguće, da umrežavajući reagensi ne reaguju sa hemijskim grupama koje su prisutne u aktivnom centru.
3. Ako predhodni uslov nije moguće ispuniti, što je čest slučaj, tada je poželjno da umrežavajući agens bude po mogućstvu većih razmera (da ne može da prodre u aktivni centar).
4. Uvek kada je to moguće treba zaštititi aktivni centar enzima.
5. Procedura ispiranja radi uklanjanja nevezanog enzima ne bi smela da deluje štetno na imobilisani enzim.
6. Ako enzim posle imobilizacije treba da bude korišćen kao visokoefikasni katalizator određene hemijske reakcije tada treba imati u vidu i karakter date reakcije.

I kod izbora nosača i kod izbora metode za imobilizaciju teško je zadovoljiti sve postavljene uslove. Zbog toga se najčešće moraju usvajati manje ili više kompromisna rešenja (Petronijević, 1988).

2.5.2.1. Kovalentno vezivanje enzima za nerastvorne nosače

Kovalentno vezivanje enzima za nosače se može izvesti na tri načina:

1. Nosač se aktivira tako da je u stanju da reaguje sa aktivnim grupama proteina.

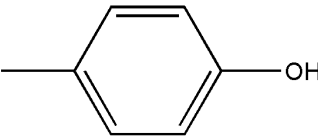
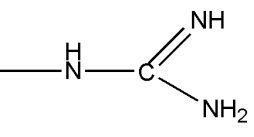
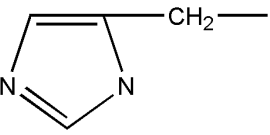
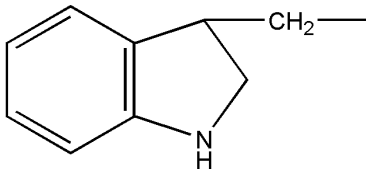
2. Upotrebljava se reagens koji povezuje nosač sa enzimom.
3. Molekul proteina enzima se aktivira tako da je u stanju da se veže aktivne grupe nosača.

Aktivne grupe, u molekulima proteina (enzima) koje bi mogle poslužiti za kovalentno vezivanje su date na slici 2.17 (Petronjević, 1988).

Reaktivnost navedenih grupa je teško porediti bez specificiranja pojedinačnih reakcija i reakcionih uslova. Može se, međutim, navesti broj poznatih reakcija u kojima učestvuje dati aminokiselinski ostatak i one se mogu upotrebiti za modifikaciju i vezivanje proteina za nosače.

Prilikom razmatranja problema kovalentnog vezivanja enzima treba imati u vidu i sledeće činjenice:

- Neke aminokiseline mogu uopšte da ne budu prisutne kod nekih enzima
- Veoma je važno da li će ostaci nekih aminokiselina da budu pristupačni za vezivanje tj. da li će se nalaziti na površini proteinskog molekula
- Aktivnost određenih hemijskih grupa jako zavisi od okruženja, npr. samo oni ostaci serina koji se nalaze u aktivnom centru „serinskih esteraza“ reaguju sa di-izopropil-fluorofosfatom dok su drugi ostaci serina neaktivni
- Nekada dolazi do dezaktivacije enzima usled reagovanja aktivnih grupa iz aktivnog centra i često treba preduzeti mere za zaštitu aktivnog centra.

—NH_2	omega-amino grupa lizina (Lys) i N-krajnja amino grupa
—SH	sulfhidrilna grupa cisteina (Cys)
—COOH	karboksilna grupa asparaginske (Asp) i glutaminske kiseline i C-krajnja karboksilna grupa
	fenolna grupa tirozina (Tyr)
	gvanidinska grupa arginina (Arg)
	imidazolni ostatak histidina (His)
—S—S—	disulfidna grupa cistina
	indolni ostatak triptofana (Trp)
$\text{CH}_3\text{—S—}$	tioetarska grupa metionina (Met)
$\text{—CH}_2\text{OH}$	hidroksilna grupa serina (Ser) i treonina (Thr)

Slika 2.17 Reaktivne grupe u molekulima proteina.

2.5.2.2. Imobilizacija enzima sa umrežavajućim agensima

Umrežavajući agensi su dvo- ili višefunkcionalni agensi koji reaguju sa hemijskim grupama molekula proteina izazivajući njihovo međusobno povezivanje i stvaranje nerastvornih taloga ili umrežavanje pojedinačnih proteinskih molekula ako se umrežavanje vrši u razblaženim rastvorima, što smanjuje pokretljivost proteinskih lanaca i stabilizuje strukturu proteina.

Važan umrežavajući agens je glutaraldehid. Njegova prednost je u tome što je aktivan u širokom opsegu pH i što može da deluje i kao višefunkcionalni reagens (Li i sar., 2012).

2.5.2.3. Imobilizacija polimerizacijom predhodno modifikovanih enzima

Metod se sastoji u modifikaciji enzima monomerom i naknadnoj polimerizaciji ili kopolimerizaciji dobijenog adukta. Modifikacija enzima se izvodi najčešće sa derivatima nezasićenih kiselina, hloridima, azidima ili anhidridima akrilne ili metakrilne kiseline ili vezivanjem enzima za monomere pomoću odgovarajućih reagenasa. Proces polimerizacije dovodi do znatnog smanjenja aktivnosti ali ne više nego kod mnogih drugih metoda imobilizacije.

2.5.2.4. Imobilizacija enzima adsorpcijom na nerastvornim nosačima

Od različitih fizičkih metoda imobilizacije enzima najšire se primenjuju metodi zasnovani na adsorpciji. Prednosti ovih metoda u poređenju sa metodama vezivanja kovalentnim vezama su u:

- Jednostavnosti izvođenja procesa imobilizacije
- Pristupačnosti i niskoj ceni nosača
- Blagim i neagresivnim uslovima izvođenja imobilizacije pri kojima se čak i kod osetljivih enzima može očuvati visoka katalitička aktivnost.

Najveći principijelni nedostatak ovih metoda je mogućnost desorpcije enzima sa nosača što dovodi do:

- Gubitka imobilisane aktivnosti
- Kontaminacije proizvoda rastvornim enzimom

Odlučujući faktori kod uspešne adsorpcije enzima primenim silikatnih i alumosilikatnih nosača su visoka koncentracija površinskih grupa za koje se enzim vezuje, kako vodoničnim vezama tako i elektrostatičkim interakcijama. Od organskih nosača se za imobilizaciju adsorpcijom najviše koriste derivati prirodnih polisaharida sa jonskim i/ili hidrofobnim bočnim grupama.

A. Imobilizacija enzima pomoću jonskih interakcija

Imobilizacija enzima pomoću jonskih interakcija se vrši vezivanjem za nosače koji nose jonske grupe suprotnog naelektrisanja. U te svrhe se koriste isti nosači koji se koriste u jonoizmenjivačkoj hromatografiji: DEAE-, AE-, SP- i QAE-sefads i polistirolni anjoniti. Najjača veza će se dobiti u slučaju kada je kod enzima izoelektrična tačka što više udaljena od pH optimuma za aktivnost enzima. Da bi se sprečila desorpcija enzima treba održavati potreban pH i jonsku silu rastvora. U nekim slučajevima se radi efikasnijeg vezivanja za jonoizmenjivačke smole enzimi predhodno modifikuju uvođenjem jonogenih grupa (Eslamipour i Hejazi, 2015).

B. Imobilizacija enzima preko hidrofobnih interakcija

Imobilizacija enzima preko hidrofobnih interakcija se vrši na istoj vrsti nosača kao i hidrofobna hromatografija. Još u prvim eksperimentima je utvrđeno da sa povećanjem dužine alkinog hidrofobnog lanca vezanog za nosač dolazi najpre do usporavanja kretanja datog enzima niz kolonu (hidrofobna hromatografija), a onda i do nepovratnog vezivanja enzima za nosač (imobilizacija enzima). Mnogi enzimi su vrlo efikasno imobilisani kako na čisto hidrofobnim nosačima, kao što su alkilagaroze i hidrofobni estri celuloze, tako i na nosačima koji pored hidrofobnih sadrže i jonske grupe. Jačina hidrofobnih interakcija se može regulisati pomoću hidrofobnosti nosača, tj. izborom vrste hidrofobnog liganda i stepena supstitucije. Kod povoljno izabranog stepena hidrofobnosti nosača veza je toliko jaka da se eluiranje može ostvariti samo tretiranjem sa deterdžentima ili haotropnim agensima. Ako je hidrofobnost nosača previše velika, tada obično dolazi i do denaturacije enzima prilikom njegovog vezivanja (Di Risio i Yan, 2009).

Nekada se imobilizacija enzima vrši i na nosačima mešovitog tipa, npr. na neorganskim nosačima prekrivenim slojem lipida (lecitin, holesterin).

Jedan od načina imobilizacije enzima je i vezivanje enzima za nerastvorni nosač na kome je prethodno imobilisan efektor ili aktivator. U tom slučaju se pored imobilizacije ostvaruje i aktivacija enzima. U nekovalentne metode imobilizacije spada i imobilizacija enzima pomoću prethodno imobilisanih antitela.

2.5.2.5. Imobilizacija enzima ugrađivanjem u matrice polimera, membrane i mikrokapsule

Glavna karakteristika metode za imobilizaciju enzima uključenjem u matrice polimera i mikrokapsule je u tome što se enzim u tom slučaju ne vezuje. Zahvaljujući tome se ne

javljaju ni sterne smetnje koje su česte pri kovalentnom ili jonskom vezivanju enzima za nosač, kada je npr. aktivni centar zaklonjen (delimično blokiran) segmentom polimernog nosača.

Ugrađivanje enzima u gel umreženog polimera se vrši jednostavnim izvođenjem reakcije polimerizovanja monomera (akrilamid, Na-metakrilat, 2-oksimetil metakrilat, vinilpirolidin i dr.) i sredstva za umrežavanje (metilenbisakrilamid) u prisustvu enzima i inicijatora (amonijum persulfat i dr.). Svojstva gela (hemijska priroda, hidrofilnost ili hidrofobnost) se mogu varirati u širokim granicama. Pri tome enzim može biti ugrađen bilo u inertni gel bilo u gel sa kojim će stupiti u jonske interakcije ili povezivanje vodoničnim vezama. U većini slučajeva se dobijaju preparati sa visokom enzimskom aktivnošću. Ta činjenica, uporedo sa dobrim mehaničkim osobinama i ravnomernom raspodelom enzima u gelu čini ovaj metod pogodnim za industrijsku primenu. Nedostaci metoda su postojanje difuzionih ograničenja koje menjaju kinetičke karakteristike reakcije i nemogućnost primene kod visokomolekularnih supstrata i proizvoda reakcije (Petronijević, 1988).

Imobilizacija enzima mikroinkapsuliranjem omogućava zadržavanje enzima u rastvoru (unutar mikrokapsule) praktično u nativnom stanju. Membrana mikrokapsule ne propušta enzim i druge makromolekule, ali omogućava slobodnu difuziju niskomolekularnih jedinjenja (npr. supstrati i proizvodi reakcije).

2.5.3. Uticaj imobilizacije na svojstva enzima

Svojstva imobilisanih enzima se razlikuju od onih kod enzima u rastvoru najviše zbog uticaja mikrookruženja uslovljenog matricom nosača i zbog uticaja samog procesa imobilizacije preko sternih efekata i promene konformacije i stabilnosti imobilisanog enzima.

Intenzitet sa kojim svaki od ovih faktora utiče na osobine enzima zavisi od upotrebljene metode za imobilizaciju. Neke metode kao što je prosto inkapsuliranje, ima minimalne efekte dok, sa druge strane, imobilizacija kovalentnim vezivanjem može da dovede do značajnih promena svojstava imobilisanog enzima u odnosu na enzim u rastvoru (Barbosa i sar., 2012; Ruiz i sar., 2013).

2.5.4. Sačuvana aktivnost

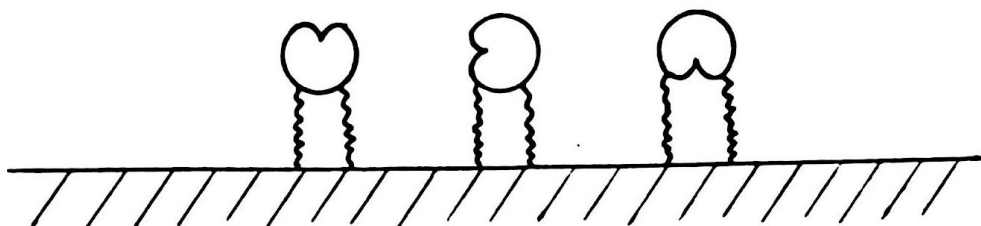
Kod imobilizacije enzima ugrađivanjem u matrice polimera, mikrokapsule i sl. može doći do denaturacije dela enzima usled delovanja reagenasa ili proizvoda koji učestvuju u stvaranju matrice. Jedan od važnih parametara kod imobilizacije enzima jeste ukupna

sačuvana aktivnost, koja je jednaka zbiru imobilisane aktivnosti, aktivnosti enzima u supernatantu i zbiru aktivnosti enzima u vodama od ispiranja. Sačuvana količina enzima bi trebalo da bude potpuno aktivna ukoliko nema pojave adsorpcije.

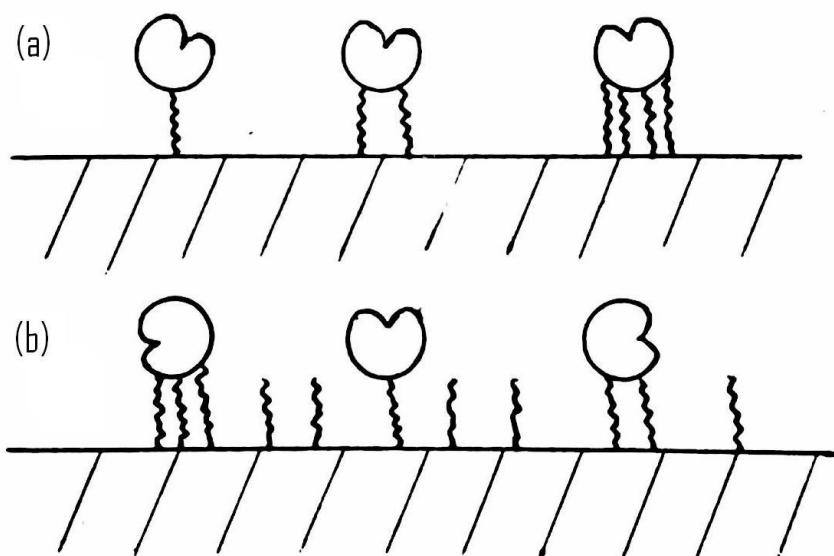
U slučajevima kada dolazi do vezivanja enzima za nosač, aktivnost enzima može biti izgubljena iz nekog od sledećih razloga:

- Neki molekuli enzima mogu biti imobilisani za nosač na takav način da je potpuno ili delimično onemogućen pristup supstrata aktivnom centru.
- Reakciona grupa aktivnog centra molekula enzima može biti uključena u proces vezivanja enzima sa nosačem.
- Uslovi reakcije vezivanja mogu dovesti do denaturacije enzima.

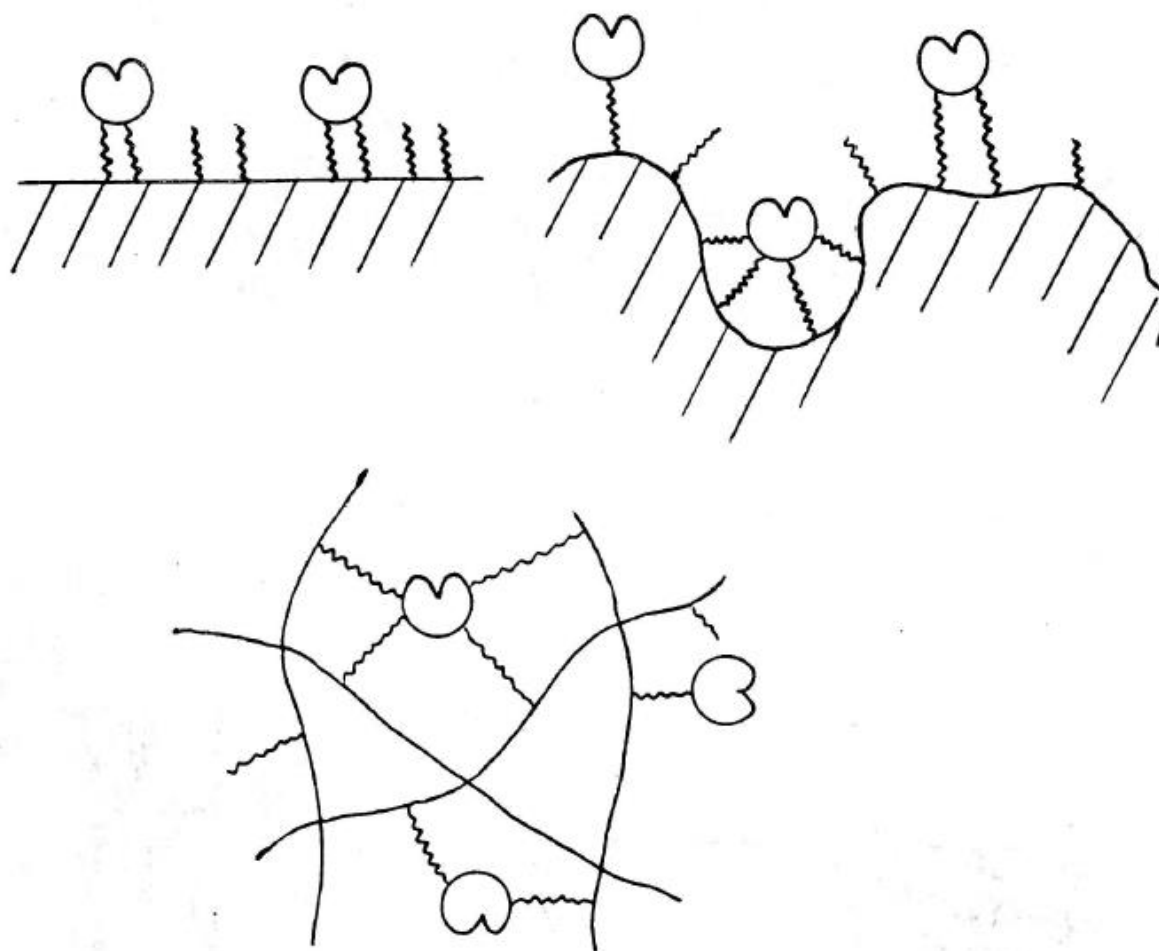
Kod vezivanja enzima za nosač, a posebno kod vezivanja kovalentnim vezama, dolazi do stvaranja izrazito heterogenih preparata. Nasumično kovalentno vezivanje enzima za površinu matrice dovodi do različitih orijentacija enzima prema matrici. Tri moguća položaja su data na slikama 2.18 i 2.19.



Slika 2.18 Mogući položaji kovalentno vezanog enzima prema matrici mostova.



Slika 2.19 Heterogenost imobilisanog enzima koja je uslovljena nejednakom raspodelom mostova na površini nosača (a), nejednakom raspodelom mostova na površini enzima (b).



Slika 2.20 Uticaj prirode površine nosača na heterogenost imobilisanog enzima.

Na slikama se vidi da uzroci heterogenosti mogu da budu i nejednaka raspodela aktivnih grupa, mostova, na površini nosača i na površini enzima kao i specifičnost površine nosača. Jasno je da neravna, vlaknasta i porozna površina nosača dovodi do veće heterogenosti imobilisanog enzima nego glatka i ravna (Petronijević, 1988).

2.5.5. Difuzioni efekti

Za razliku od enzima u rastvoru, da bi došlo do reakcije na imobilisanom enzimu, supstrat mora difuzijom da pređe iz mase rastvora kroz stacionarni granični sloj na površinu imobilisanog enzima. Spoljašnja difuziona barijera je uslovljena tankim slojem tečnosti koja okružuje česticu. Supstrat difunduje u taj sloj zahvaljujući pasivnoj molekularnoj difuziji i konvekciji. Debljina sloja zavisi od brzine mešanja – zbog toga povećanje brzine mešanja dovodi do sniženja spoljašnje difuzione barijere. Unutrašnja difuziona barijera je uslovljena ograničenjem slobodne difuzije unutar polimerne matrice. Unutar polimerne čestice dolazi do izražaja samo pasivna molekularna difuzija na koju ne utiče brzina mešanja ukupne tečnosti.

Jasno je da će unutrašnja difuziona barijera biti od ključne važnosti kod enzima imobilisanih ugrađivanjem u matricu ili mikrokapsule, dok će kod enzima vezanog za površinu nosača ukupnu brzinu difuzije limitirati spoljašnja difuziona barijera, koja se u određenom stepenu može smanjiti pojačanim mešanjem. Kod enzimske reakcije se u graničnom laminarnom sloju perpendikularno u odnosu na njega uspostavlja gradijent koncentracije supstrata. Do zasićenja imobilisanog enzima dolazi pri koncentraciji supstrata koja je veća od one koja je potrebna za zasićenje enzima u rastvoru, a to dovodi do porasta prividne Michaelis-ove konstante K_m (Petronijević, 1988).

2.5.6. Sterni efekti

Kao što se može i očekivati, aktivnost imobilisanih enzima se zbog sternih ograničenja izazvanim polimernom matricom smanjuje mnogo više u odnosu na supstrate velike molekulske mase. To je posebno jasno izraženo kod proteolitičkih enzima čiji supstrati imaju molekulsku masu od nekoliko stotina do više stotina hiljada. Na primer, tripsin, kovalentno vezan za EMA-polimer hidrolizuje samo 10 peptidnih veza u pepsinogenu, dok slobodni enzim hidrolizuje 15 takvih veza. Jasno je da do najvećih sternih ograničenja dovodi metod imobilizacije ugrađivanjem u matrice polimera ili mikrokapsule pa se zbog toga taj metod može primenjivati samo kada su reaktantni i proizvodi reakcije mali molekuli (Zhang i sar., 2012).

2.5.7. Uticaj mikrookruženja

Posle imobilizacije enzim okružuje sasvim druga sredina od one kada se nalazi u rastvoru, a to je naročito izraženo ako matrica ili nosač imaju naelektrisanje. Zajedničko svojstvo polikationskih nosača je njihova sposobnost da vrše preraspodelu proteina između faze slobodnog rastvora i mikrookruženja enzima. Polianjoni vezuju protone, snižavajući tako pH u okolini imobilisanog enzima, dok polikationi čine suprotno. Na taj način imobilisani enzim funkcioniše pri stvarnom pH koji je različit od pH koji se dobija merenjem u slobodnom rastvoru. Na taj način se i objašnjava pomeranje pH optimuma kod enzima imobilisanih npr. na EMA kopolimeru kao i promena K_m za supstrate sa naelektrisanjem kod enzima imobilisanih na CM- i DEAE-celulozi i EMA kopolimeru (Eldin i sar., 1999).

2.5.8. Uticaj imobilizacije na stabilnost enzima

Iako kod većine enzima imobilizacija povećava termičku stabilnost, zbog znatnog broja suprotnih primera to se ne može uzeti kao opšta zakonitost. Povećanje termičke stabilnosti je zapaženo i kod monomernih i kod oligomernih enzima, a ista situacija je i kod stabilnosti pri čuvanju, postojanosti na različite pH i postojanosti prema denaturacionim agensima. Kod proteolitičkih enzima koji su u rastvoru skloni autolizi, imobilizacija uvek suštinski povećava stabilnost. Posebnim metodama prethodne hemijske modifikacije enzima pre njihovog vezivanja za nerastvorne nosače, može se stabilnost takvih enzima povećati 100-10000 puta (Homaei i Etemadipour, 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali i pribor

Materijali

- BSA (Bovine albumin fraction-V, minimum assay 96,0%, HIMEDIA RM 105, „HiMedia Laboratories Pvt. Limited“, Mumbai, India)
- Coomassie brilliant blue G-250 (SERVA Blau G, C.I. 42655, research grade, $C_{47}H_{48}N_3O_7S_2 \cdot Na_2$, $M=877,0$ g/mol, „SERVA FEINBIOCHEMICA“, Heidelberg, Germany)
- Destilovana voda
- Dimetil sulfoksid (DMSO, p.a. čistoće)
- Etanol (96%, p.a. čistoće)
- Etanol (Apsolutni)
- Fosforna kiselina (p.a. čistoće)
- Kvercetin (Sigma)
- L-cistein (Sigma)
- Metanol (HPLC grade)
- Mikrokristalična celuloza (Avicel, PH 102 od firme Selectchemie AG, Zürich, Switzerland)
- HRP (298 U/mg, Sigma)
- Sve druge korišćene hemikalije su bile čistoće p.a.
- Vodonik peroksid (30%, p.a. čistoće)

Aparati i pribor

- Analitička vaga (Sartorius)
- Automatska pipeta (200-1000 μ l, BIOHIT PLC.)
- Automatska pipeta (20-200 μ l, Brand transfèrpette, Nemačka)
- HPLC sistem (Agilent 1100 series, Waldbron, Germany sa kolonom Zorbax Eclipse XDB-C18; 4,6 $\times$ 250 mm, 5 μ m)
- LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA)
- Spektrofotometar (VARIAN Cary-100 Conc. Spectrophotometer)
- UHPLC sistem (Thermo Scientific, Dionex UltiMate 3000)

- Vorteks (Snijders 34524 Scientific Tilburg, Holandija)

3.2. Korišćeni rastvori

- EtOH (70%)
- EtOH (50%)
- EtOH (45%)
- 10 mM fosfatni puffer sa 25% etanolom
- 50 mM fosfatni pufer sa 10% etanolom
- 0,2 M acetatni pufer
- rastvor smeše 5 M $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ i 8,75 M rastvora NaOH u odnosu 1:1
- 10 M rastvor HCl-a
- 3,7 M rastvor FeCl_3 u 1 M HCl
- 50 mM rastvora fenola,
- 25 mM 4-AAP,
- 50 mM fosfatni pufer pH 6,0
- 2 mM rastvor H_2O_2 ,
- Standardni rastvor etilbenzoata (5 $\mu\text{mol/ml}$) u 50% (v/v) vodenom rastvoru EtOH:
Pravljen je mešanjem apsolutnog EtOH sa odgovarajućom količinom benzoilhlorida uz stajanje na sobnoj temperaturi i kasnije dodavanje odgovarajuće količine vode.
- 10 mM rastvor H_2O_2 (odmereno je 0,206 ml 30% H_2O_2 u normalnom sudu od 200 ml i dopunjeno destilovanom vodom do crte).
- 10 mM rastvor kvercetina u dimetilsulfoksidu DMSO (odmereno je 3,56 mg kvercetina i dodato u 1ml DMSO).
- 100 mM rastvor fosfatnog pufera pH=6 (odmereno je 1,325 ml 0,5M rastvora Na_2HPO_4 i 8,675 ml 0,5M rastvora NaH_2PO_4 u normalnom sudu od 50 ml i dopunjeno destilovanom vodom do crte).
- 20 mM rastvor L-cisteina (odmereno je 24,23 mg L-cisteina u normalnom sudu od 10 ml i dopunjeno destilovanom vodom do crte).
- Bradford-ov reagens, koji se koristi za određivanje sadržaja proteina, priprema se na sledeći način: 100 mg boje Coomassie brilliant blue G-250 rastvori se u 50 ml 95% etanola, promeša sa 100 ml orto-fosforne kiseline (min. 85%) i dopuni

destilovanom vodom do 1 L. Reagens se profiltrira kroz filter papir i čuva u tamnoj boci na sobnoj temperaturi.

- Standardni rastvor BSA (Bovine Serum Albumin) za određivanje sadržaja proteina u polaznom rastvoru enzima i supernatantu priprema se u koncentraciji od 1 mg/mL rastvaranjem BSA u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH 9,2, koji sadrži 10 mM CaCl_2 . Kao standardni rastvor BSA za određivanje sadržaja proteina u vodama od ispiranja koristi se 0,1 mg/mL rastvor BSA u fiziološkom rastvoru (0,91% NaCl). Rastvori BSA se čuvaju u frižideru na 4 °C.

- Radni rastvor HRP-a:

Rastvor A: odmereno je 0,34 mg peroksidaze i rastvoreno u 10 ml hladnog 50 mM fosfatnog pufera pH=6.

Rastvor B: Uzeto je 0,5 ml rastvora A i razblaženo sa 4,5 ml hladnog 50 mM fosfatnog pufera pH=6. Za izvođenje enzimskih reakcije uvek je korišćen rastvor B.

3.3. Izvođenje enzimskih reakcija

Enzimska reakcija je izvođena na temperaturi od 20 °C, na taj način što su uvek prvo u epruvetu odmeravani voda i 100 mM fosfatni pufer (pH 7.0). Zatim je dodavan rastvor kvercetina, ne mnogo ranije pre početka reakcije zbog osetljivosti na svetlost. Nakon toga je dodavan rastvor L-cisteina, a zatim rastvor enzima, i na kraju je reakcija započinjala dodavanjem 10 mM-og rastvora H_2O_2 , uz efikasno mešanje na vorteksu. Kao slepa proba korišćen je rastvor pufera odgovarajuće pH vrednosti.

S obzirom da je u toku rada primećeno da se uporedo sa enzimskom reakcijom odvija i ne-enzimska reakcija, ispitivana je kinetika iste reakcije bez prisustva enzima, nakon čega je od ukupne brzine reakcije oduzimana brzina ove ne-enzimske reakcije, u cilju dobijanja što tačnije vrednosti brzine enzimske reakcije.

Svi UV-VIS spektri su snimani na spektrofotometru tipa VARIAN Cary-100 Conc. Spectrophotometer, u kvarcnim kivetama dimenzije 1×1×4,5 cm. Ukupna količina reakcione smeše je bila 5 ml, nakon čega je oko 2,5 ml reakcione smeše stavljano u kiveti i mereno na spektrofotometru. Nakon toga je izvršeno snimanje najpre na talasnim dužinama od 800-200 nm, a kasnije samo na talasnoj dužini na 380 nm, za vreme od 120 s, u periodu od svakih 10 s.

3.4. HPLC hromatografija

Prisustvo dobijenih modifikovanih proizvoda kvercetina, degradacionih proizvoda kvercetina kao i uticaj temperature, pH vrednosti, koncentracija kvercetina, L-cisteina i vodonik peroksida na količinu stvorenih modifikovanih proizvoda kvercetina je praćen pomoću HPLC hromatografije.

Uzorci reakcije modifikacije kvercetina sa L-cisteinom su podvrgavani HPLC analizi pod sledećim uslovima:

- kolona: RP-C18
- smeše rastvarača za eluiranje: A i B
- smeša A: 0,15% H₃PO₄ u smeši voda-metanol u odnosu 77:23
- smeša B: metanol
- gradientni režim razdvajanja:
 - 0-3,6 min - izokratski - 100% smeše A
 - 3,6-24 min - linearni gradient - do 80,5% smeše A
 - 24-30 min - izokratski - 80,5% smeše A
 - 30-60 min - linearni gradient - do 51,8% smeše A
 - 60-67,2 min - linearni gradient - do 100% smeše B
 - 67,2-90 min - izokratski - 100% smeše B
- protok: 0,6 ml/min
- temperatura kolone: 25 °C
- zapremina uzorka: 100 µl

3.5. UHPLC-DAD-HESI-MS/MS analiza

Kao dodatna metoda za identifikaciju novih proizvoda u reakciji kvercetina sa L-cisteinom, HRP i vodonik peroksidom korišćena je tečna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (LC-MS). Korišćen je *Thermo Scientific* tečno-hromatografski sistem visokih performansi (UHPLC) sastavljen od kvaternerne pumpe sa degaserom, termostatirajuće kolone, autosemplera i DAD detektora (diode array detector), koji je bio povezan sa *Fleet Ion Trap* masenim spektrometrom (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA). Softveri *Eskalibur* (verzija 2.1.0) i *LCQ Fleet* (verzija 2.7) su korišćeni za

kontrolu, obradu i analizu podataka. Razdvajanje kvercetina je vršeno na *Hypersil gold C18* ($50 \times 2,1$ mm, $1,9 \mu\text{m}$) koloni proizvedenoj od strane *Thermo Fisher Scientific*.

Mobilna faza se sastojala od (A) vode + 0,2% mravlje kiseline i (B) acetonitrila. Za hromatografsko razdvajanje korišćen je linearni gradient na način koji je opisan u tabeli 3.1. Zapremina injektiranja je bila $10 \mu\text{L}$, protok mobilne faze $0,25 \text{ ml/min}$, a razdvajanje jedinjenja je praćeno na talasnim dužinama od 230, 270, 320 i 360 nm.

Tabela 3.1. Gradientni uslovi hromatografske metode za analizu kvercetina

Vreme, min	Mobilna faza (A)	Mobilna faza (B)
0	90	10
2	80	20
4,5	10	90
4,8	10	90
4,9	90	10
12	90	10

Korišćena je elektrosprej jonizacija pri atmosferskom pritisku u negativnom modu. Parametri HESI-izvora su bili sledeći: napon izvora $4,5 \text{ kV}$, napon kapilare -48 V , napon tube $-100,40 \text{ V}$, temperatura kapilare $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, protok glavnog (*sheath*) i pomoćnog (*auxiliary*) gasa je bio 32 i 8 *au*, respektivno. Identifikacija kvercetina izvršena je na osnovu spektralnih karakteristika: PDA spektra, masenog spektra i MS fragmentacije.

3.6. Određivanje kinetičkog mehanizma reakcije

Određivanje kinetičkog mehanizma reakcije modifikacije kvercetina sa cisteinom pomoću HRP vršeno je primenom metode po Maragoniju (2003) (poglavlje 2.2.1.4.). Enzimska reakcija je izvođena na način koji je opisan u poglavlju 3.3. Vršeno je merenje Michaelis-ove konstante (K_m), u zavisnosti od promene koncentracije supstrata u reakcionoj smeši. Grafičkim predstavljanjem dobijenih vrednosti ovih dveju veličina na način koji je prikazan na slici 3.1 određivan je tip kinetičkog mehanizma reakcije. Promene koncentracija supstrata su bile u opsegu: za kvercetin od $0,04$ do $0,12 \text{ mM}$, za L-cistein od $0,1$ do $1,6 \text{ mM}$ i za vodonik peroksid od $0,04$ do $0,16 \text{ mM}$.

3.7. Sinteza nosača za imobilizaciju enzima

Fenoksiacetil-, cinamoil- i benzoil-celuloza za imobilizaciju peroksidaze iz rena su sintetizovani acilovanjem celuloze hloridima fenoksisirćetne, cimetne i benzoeeve kiseline (Petronijevic, 1988). Na isti način je vršena i sinteza estara celuloze sa γ -fenil buternom i timol sirćetnom kiselinom. Mikrokristalna celuloza (Avicel) se najpre suši na 105 °C do konstantne mase. 15 g suve mikrokristalne celuloze se pomeša sa 150 ml smeše piridina i dimetilformamida (1:1) a onda se, uz intenzivno mešanje u anhidrovanim uslovima, u malim količinama dodaje odgovarajući hlorid kiseline. Posle 1,5 sati mešanja na sobnoj temperaturi tamno-žuta suspenzija se greje do 70 °C, a onda ostavi da stoji preko noći na sobnoj temperaturi. Filtrira se na bihnerovom levku i najmanje šest puta se ispira (resuspendovanjem i ponovnim ceđenjem) sa 95%-tnim EtOH. Kod većeg stepena acilovanja (sa benzoil-hloridom) deo proizvoda prelazi u rastvor i iz njega se taloži sa EtOH. Posle sušenja na sobnoj temperaturi dobija se beli ili žućkasti prah acil-derivata celuloze. Intenzitet obojenosti zavisi od stepena acilovanja.

3.8. Određivanje stepena acilovanja celuloznih nosača

Stepen acilovanja celuloznih nosača je određivan modifikovanom hidroksamatnom metodom. U 4 ml 50% (v/v) vodenog rastvora EtOH (96%) koji sadrži suspendovani uzorak estara celuloze, ili kod određivanja kalibracionog dijagrama rastvoreni nisko molekularni estar, se doda 0,4 ml 1:1 smeše 5 M $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ i 8,75 M rastvora NaOH. Posle 5 min stajanja se doda 0,4 ml 10 M HCl i 0,1 ml 3,7 M FeCl_3 u 1 M HCl uz mešanje. Optička gustina se čita na 540 nm u odnosu na slepu probu koja nije sadržala ispitivani uzorak. Kao standard je korišćen etilbenzoat.

3.9. Imobilizacija peroksidaze iz rena

Odmerene količine suvog nosača se najpre disperguju i uravnotežavaju sa radnim puferom. U cilju efikasnijeg dispergovanja uzorci od 0,2 g nosača su najpre četiri puta po 10 minuta tretirani sa 4 ml 0,2% rastvora Triton X-100, a nakon toga je vršeno centrifugiranje. Zatim su nosači uzastopno ispirani sa rastvorima etanola prema sledećem redosledu: EtOH (96%), EtOH (70%), EtOH (45%), 10 mM fosfatni puffer sa 25% EtOH, 50 mM fosfatni puffer sa 10% EtOH i 0,1 M fosfatni puffer. pH vrednost pufera koji su korišćeni za ispiranje je bila 7,0. Kod svakog ispiranja je nosač (uz mešanje) bio u kontaktu sa rastvorom za ispiranje 10-15 min. Ovakvo tretiranje je neophodno da bi se stvorila stabilna suspenzija nosača u

radnom puferu. Tretiranje nosača je vršeno u tikvicama od 10 ml ili često direktno u kivetama za centrifugiranje (Petronijević, 1988).

Vezivanje HRP za nosače na bazi acil derivata celuloze je izvođeno šaržnim tretiranjem nosača sa 5-8 ml rastvora HRP pod definisanim uslovima (u fosfosfatnom puferu pH 7,0 i na temperaturi od 25 °C) u trajanju od 4 sata.

Posle završenog tretiranja nosača sa rastvorom enzima vršeno je centrifugiranje (3 min na 3000 o/min). Supernatant je uklanjao odlivanjem, a talog imobilisanog enzima je ispiran hladnim radnim puferom sve dok se u supernatantu posle centrifugiranja mogla detektovati aktivnost peroksidaze. Obično je već posle četvrtog ispiranja supernatant sadržao samo zanemarljivu aktivnost HRP. Talog imobilisanog enzima je čuvan u radnom puferu na temperaturi 4 °C.

3.10. Određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena

Određivanje aktivnosti HRP je rađeno na sobnoj temperaturi (25 °C) po metodi Metelitz i njegovih saradnika (1991) uz blagu modifikaciju. Odmeri se 2 ml 50 mM rastvora fenola, 1 ml 25 mM 4-aminoantipirina, 1 ml 250 mM fosfatnog pufera (pH 6,0) i 1 ml 2 mM H₂O₂, dobro promućka i doda 0,2 ml rastvora uzorka enzima. Kontrolna kiveta na spektrofotometru umesto 1 ml 2 mM H₂O₂ sadrži 1 ml destilovane vode. Meri se apsorbancija rastvora na svaka 1-2 min, ili zavisno od brzine promene apsorbancije. Nakon toga, crta se grafik promene apsorbancije na 510 nm u funkciji od vremena. Aktivnost se izračunava na osnovu molarnog koeficijenta apsorpcije ϵ za dati supstrat na datoj talasnoj dužini prema formuli:

$$A [U/ml] = \text{tg}\alpha \cdot R / \epsilon [mM^{-1}cm^{-1}],$$

gde je R (razblaženje) odnos zapremine ukupne reakcione smeše i zapremine uzorka enzima, a ϵ molarni koeficijent ekstinkcije. Za određivanje sa 4-aminoantipirinom se koristi $\epsilon_{510} = 6,28 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.11. Određivanje aktivnosti imobilisane peroksidaze iz rena

Ispitivani rastvor imobilisane HRP je dobijen odmeravanjem 0,01 g (suve mase) nosača sa imobilisanim enzimom u 100 mM fosfatnom puferu (pH 7,0). Dalji postupak određivanja aktivnosti imobilisane HRP je isti kao u prethodnom poglavlju (poglavlje 3.10).

3.12. Određivanje sadržaja proteina

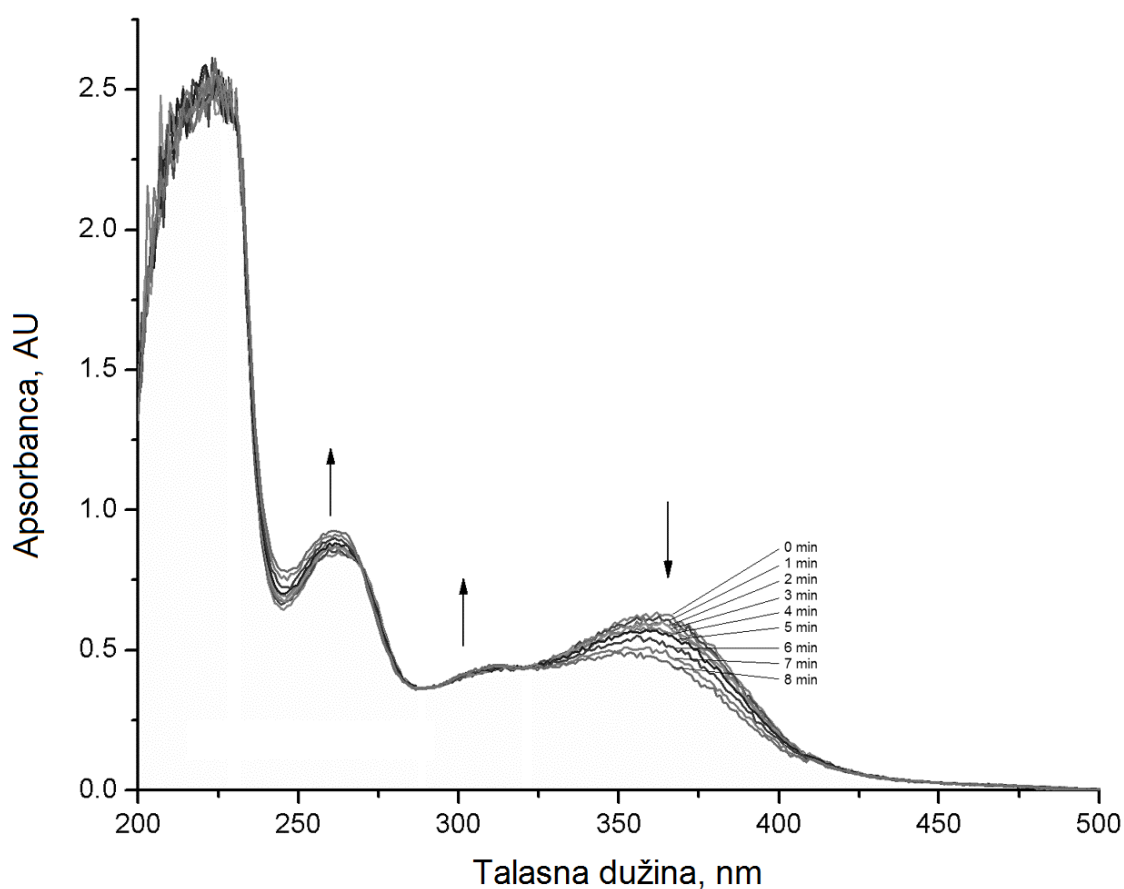
Sadržaj proteina u rastvorima enzima je određivan metodom po Bradford-u (1976). Kao standard za izradu kalibracionih dijagrama korišćen je albumin iz govede krvi (BSA). 0,1 ml uzorka pomeša sa sa ne više od 100 µg proteina u epruveti sa 4 ml Bradford-ovog reagensa. Meri se apsorbanca na 595 nm u periodu vremena od 2 do 60 minuta. Kontrola umesto uzorka sadrži 0,1 ml odgovarajućeg pufera.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Oksidacija kvercetina pomoću HRP

Ispitivanje procesa oksidacije kvercetina pomoću HRP rađeno je po metodi opisanoj u poglavlju 3.3. Umesto zapremine L-cisteina dodavana je ista količina odgovarajućeg fosfatnog pufera.

Rezultati oksidacije kvercetina pomoću HRP prikazani su na slici 4.1. Posmatranjem UV-VIS apsorpcionog spektra reakcije oksidacije kvercetina, može se primetiti prisustvo dve izrazite apsorpcione trake na 371 i 255 nm.



Slika 4.1 Promena apsorpcionog spektra reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP.

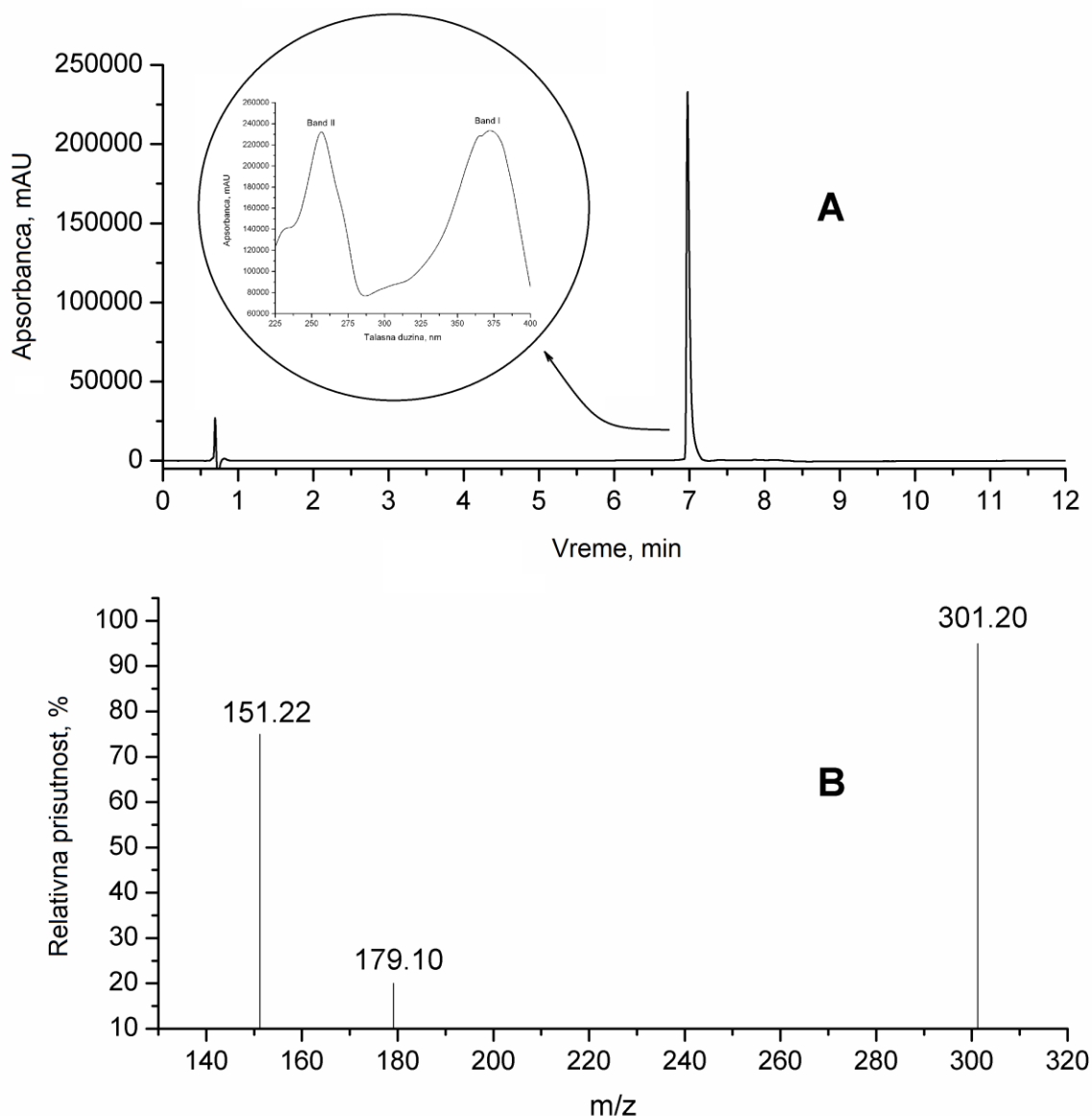
Na osnovu ranije sprovedenih ispitivanja od strane Dehghan-a i njegovih saradnika (2011) poznato je da apsorpcioni spektar kvercetina poseduje dve oštre apsorpcione trake, gde prva apsorpciona traka nastaje kao rezultat apsorpcije kateholnog B-prstena u UV-A opsegu, između 360 i 370 nm ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$, $\epsilon = 28400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), dok druga apsorpciona traka nastaje kao rezultat apsorpcije benzoilnog A-C sistema u UV-C opsegu, oko 260 nm

($\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$, $\varepsilon = 28300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Dehghan i sar., 2011; Fenoll i sar., 2003). Poređenjem oblika i položaja dobijenih pikova u UV-VIS apsorpcionom spektru reakcione smeše (slika 4.1) sa rezultatima objavljenim od strane Dehghan-a i njegovih saradnika (2011) može se zaključiti da dobijeni pikovi potiču upravo od kvercetina. Daljim posmatranjem slike 4.1 može se zaključiti da tokom vremena dolazi do smanjenja apsorpcionih traka koje potiču od kvercetina što ukazuje na činjenicu da je kvercetin supstrat za HRP i da pod dejstvom HRP dolazi do degradacije i smanjenja količine kvercetina u reakcionoj smeši. Ovakav zaključak je takođe u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima od strane Dehghan-a i njegovih saradnika (2011). Sa druge strane, pored smanjenja apsorpcionih traka koje potiču od kvercetina istovremeno dolazi i do stvaranja jednog novog apsorpcionog pika na talasnoj dužini od 296 nm, kao i povećanja inteziteta već postojeće apsorpcione trake na 257 nm. Ovakav rezultat ukazuje na to da istovremeno sa degradacijom kvercetina dolazi i do stvaranja novih jedinjenja.

4.1.1 Identifikacija nastalih proizvoda u reakciji oksidacije kvercetina pomoću HRP

U cilju identifikacije nastalih proizvoda u reakciji oksidacije kvercetina sa HRP korišćena je UHPLC-DAD-HESI-MS/MS metoda. Posmatranjem dobijenog UV-hromatograma rastvora kvercetina u DMSO (slika 4.2A), na retencionom vremenu od 6,94 min može se primetiti prisustvo jednog intenzivnog pika, za koji se na osnovu PDA spektra (slika 4.2A, inkrement) može zaključiti da potiče od kvercetina. Pseudomolekulski pik kvercetina m/z 301,20 [kvercetin-H]⁻ (teor. m/z 301,2280 [kvercetin-H]⁻) nakon MS fragmentacije daje dva jonska fragmenta na m/z 151 [kvercetin-150-H]⁻ i 179 m/z [kvercetin-122-H]⁻ (slika 4.2B). PDA spektar, dobijena molekulska masa i MS fragmentacija pseudomolekulskog pika zajedno potvrđuju da pik na retencionom vremenu od 6,94 min zaista potiče od kvercetina.

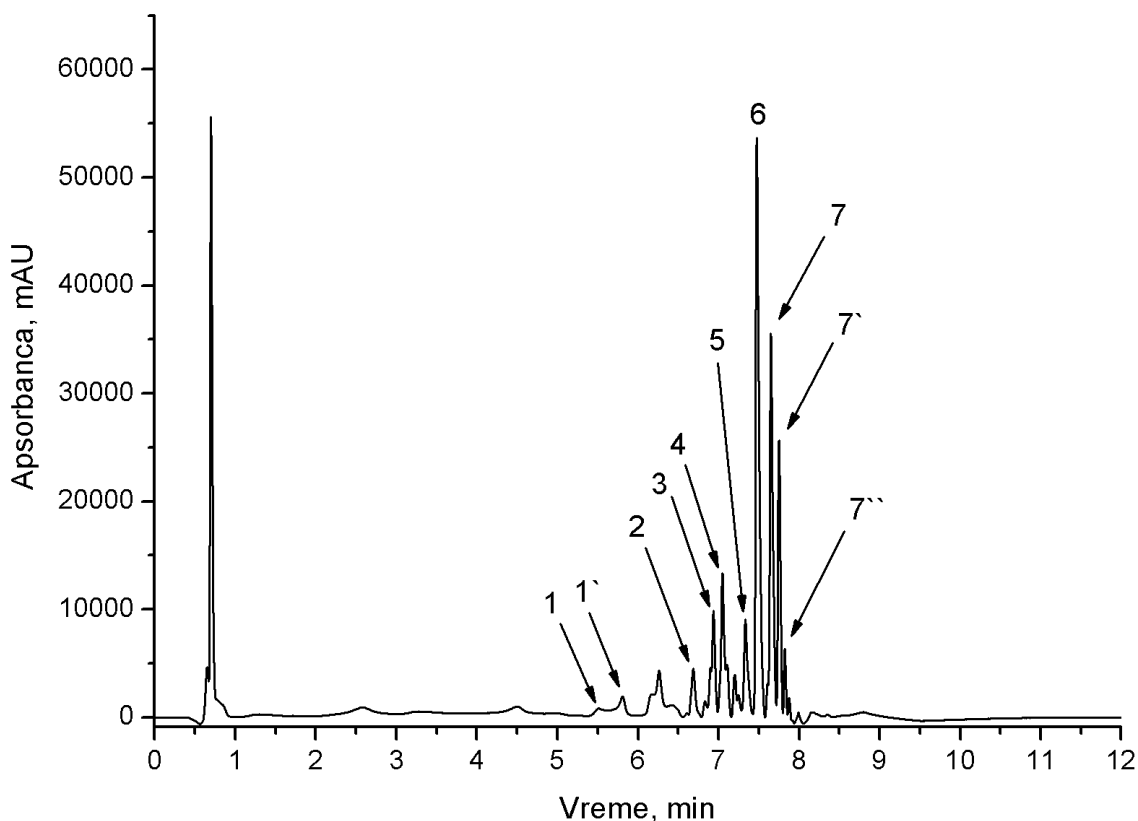
UV hromatogram reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP dobijen primenom UHPLC-DAD-HESI-MS/MS metode prikazan je na slici 4.3. Dobijeni rezultati pokazuju da je u reakciji oksidacije kvercetina pomoću HRP prisutno nekoliko proizvoda sa drugačijim retencionim vremenom u odnosu na kvercetin. Identifikovana jedinjenja u reakciji oksidacije kvercetina, označena su kao pikovi 1–7 prema eluirajućem redosledu u UV-hromatogramu i prikazana su u tabeli 4.1.



Slika 4.2 UV hromatogram rastvora kvercetina u metanolu snimljen na 360 nm (A) i PDA spektar kvercetina (u inkrementu). MS fragmentacija kvercetina (B).

Prva dva pika označena kao **1** i **1'** sa retencionim vremenima 5,55 i 5,79 min i masenim pikom m/z $329,14 \pm 0,3$ identifikovana su kao hinonski derivati kvercetina. MS fragmentacijom pomenutog pika $[\text{hinon kvercetina} + 2\text{CH}_3 - \text{H}]^-$ dobijena su dva jonska fragmenta: prvi na m/z 299 $[\text{hinon kvercetina} - \text{H}]^-$ i drugi m/z 151 $[\text{hinon kvercetina} - 148 - \text{H}]^-$ koji predstavlja karakterističan jonski fragment za kvercetin (Kečkeš i sar., 2013). Pik 2 sa masenim pikom m/z 210,07 $[\text{floroglucinol karboksilna kiselina} + \text{acetonitril} - \text{H}]^-$ nakon MS fragmentacije daje dva jonska fragmenta: prvi na m/z 169 $[\text{floroglucinol karboksilna kiselina} - \text{H}]^-$ koji predstavlja pseudomolekulski jon za floroglucinol karboksilnu kiselinu, i drugi m/z 126 $[\text{floroglucinol karboksilnu kiselinu} - 43 - \text{H}]^-$ koji je karakterističan jonski fragment za ovu

trihidroksibenzeovu kiselinu. Pik sa rednim bojem 3, i masom m/z 453,25 [hinon kvercetina+protokatehuinska kiselina-H]⁻ daje jonske fragmente na m/z 299 [hinon kvercetina-H]⁻, m/z 151 [hinon kvercetina-148-H]⁻ koji je karakterističan za kvercetin, m/z 153 [protokatehuinska kiselina-H]⁻ koji predstavlja pseudomolekulski pik za protokatehinsku kiselinu, dok je jonski fragment na m/z 109 [protokatehinska kiselina-44-H]⁻ karakterističan za protokatehinsku kiselinu i nastaje kao rezultat gubitka CO₂.



Slika 4.3 UV hromatogram reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP.

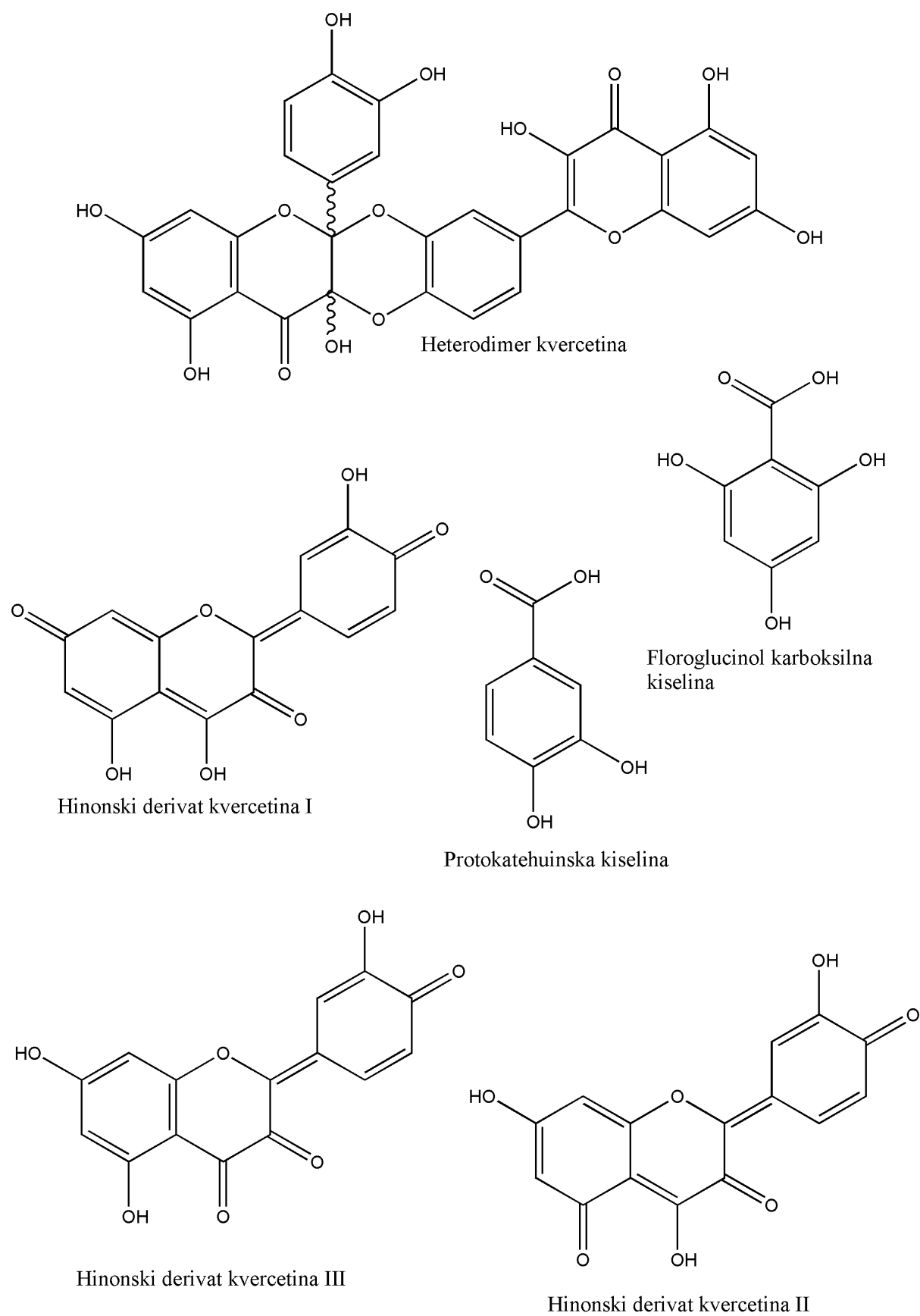
Pikovi 4, 5 i 6 su identifikovani kao derivati heterodimera kvercetina (pikovi 4, 5) i heterodimer kvercetina (6). Nakon MS fragmentacije pikova 4 i 5 dobijen je pseudomolekulski jon za heterodimer kvercetina na m/z 601 i njegov jonski fragment na m/z 301 [heterodimer kvercetina-300-H]⁻, koji ukazuje da su ova dva jedinjenja (4 i 5) zapravo derivati heterodimera kvercetina. Na osnovu prisustva pseudomolekulskog jona heterodimera kvercetina na m/z 601 [heterodimer kvercetina-H]⁻, jonskih fragmenata na m/z 301,2 [heterodimer kvercetina-300-H]⁻ i m/z 272 [heterodimer kvercetina-329-H]⁻ koji potiču od kvercetina, jedinjenje pod rednim brojem 6 je identifikovano kao heterodimer kvercetina.

Jonski fragment na m/z 272 [heterodimer kvercetina–329–H][–] je verovatno rezultat cepanja hinona kvercetina, nastao u procesu autooksidacije i/ili disproporcionisanja, nakon čega sledi korak uklanjanja CO, pri čemu se dobija derivat benzofurana (Gülşen i sar., 2007). Zbog prisustva jonskog fragmenta koji je karakterističan za kvercetin na m/z 151 [hinon kvercetina–148–H][–], poslednja tri pika su označena kao 7, 7' i 7'' sa retencionim vremenima 7,64, 7,53 and 7,82 min, i masama pikova na m/z 299,04, 299,11 i 299,24 [hinon kvercetina–H][–] identifikovani su kao hinoni kvercetina I, II and III, respektivno. Predložene strukture identifikovanih jedinjenja su date na slici 4.4.

Tabela 4.1 Identifikovana jedinjenja u reakcionoj smeši

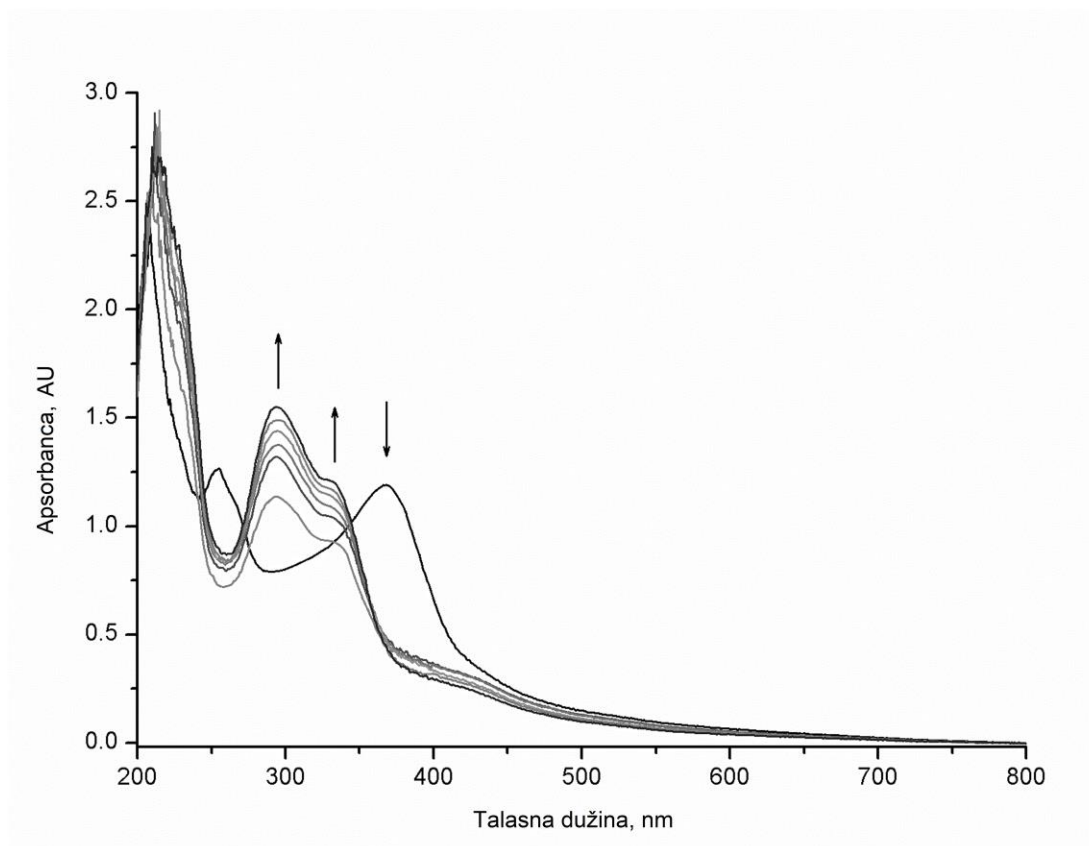
Broj pika	t_R , min	m/z [M–H] [–]	MS/MS	Identifikovano jedinjenje
1, 1'	5,55	329,14	299	Hinonski derivat kvercetina + 2CH ₃ grupe
	5,79	329,17	151	
2	6,67	210,07	169 126	Floroglucinol karboksilna kiselina + acetonitril iz mobilne faze
3	6,93	453,25	299	Hinonski derivat kvercetina + protokatehuinska kiselina
			153	
			151	
			109	
4	7,04	617,11	601 301	Kvercetin
5	7,34	646,40	601 301	heterodimer kvercetina + 3CH ₃ grupe
6	7,47	601,13	301	heterodimer kvercetina
7,	7,64	299,04	151	Hinonski derivati kvercetina I, II i III
7',	7,53	299,11		
7'',	7,82	299,24		

Prisustvo protokatehuinske i floroglucinol karboksilne kiseline u reakcionoj smeši objašnjava nastajanje promena u UV-VIS apsorpcionom spektru (slika 4.1) tokom reakcije oksidacije kvercetina. Iz rezultata objavljenih od strane Cornarda i njegovih saradnika (2013), poznato je da protokatehuinska kiselina pokazuje dve apsorpcione trake: prvu na oko 295 i drugu na oko 258 nm (Cornard i sar., 2013). Upravo stvaranje protokatehuinske kiseline kao jednog od proizvoda reakcije oksidacije kvercetina objašnjava stvaranje apsorpcionih maksimuma na talasnim dužinama od 296 i 257 nm u UV-VIS apsorpcionom spektru reakcione smeše. Pored protokatehuinske u reakcionoj smeši identifikovano je prisustvo i floroglucinol karboksilne kiseline koja poseduje jedan apsorpcioni maksimum na oko 260 nm što dodatno utiče na stvaranje i povećanje apsorpcionog maksimuma na 257 nm u UV-VIS apsorpcionom spektru reakcione smeše.

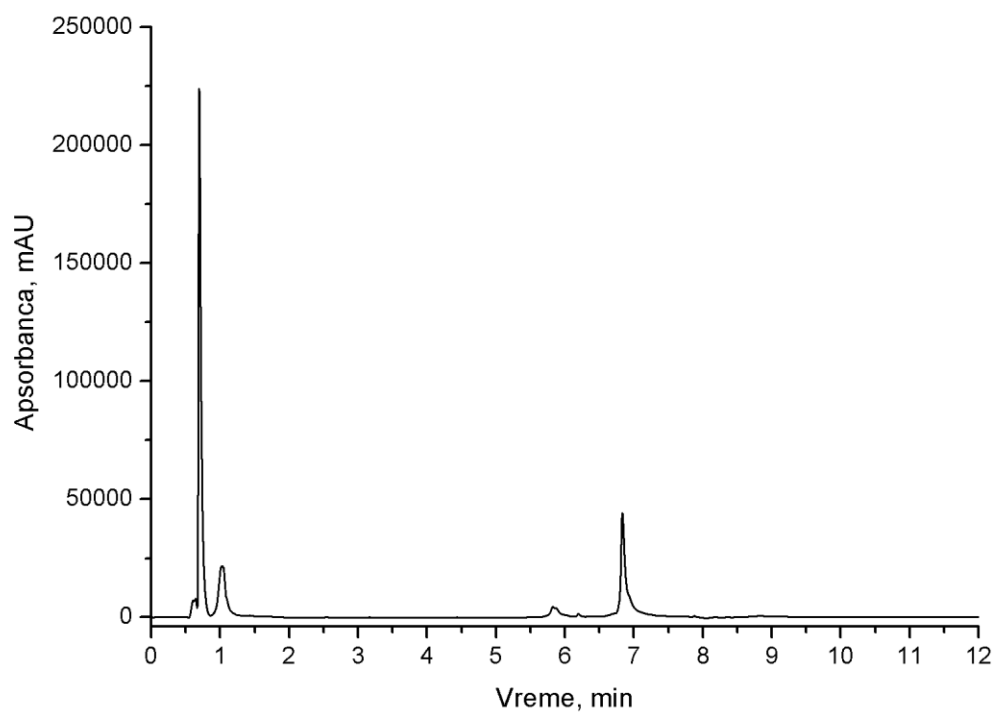


4.2. Oksidacija kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina

Ispitivanje reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina je rađeno po metodi opisanoj u poglavlju 3.3. Oksidacija kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina je izvođena u identičnim uslovima kao i u slučaju kada L-cistein nije bio prisutan u reakcionoj smeši (prethodno poglavlje). Na slici 4.5 prikazana je promena UV-VIS apsorpcionog spektra reakcione smeše tokom trajanja reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina. Posmatranjem nastalih promena u UV-VIS apsorpcionom spektru (na početku i na kraju enzimske reakcije) može se zaključiti da tokom vremena dolazi do smanjenja inteziteta apsorpcionih traka koje potiču od kvercetina (371 i 255 nm), što je u skladu sa dobijenim rezultatima u slučaju kada je ispitivana oksidacija kvercetina ali bez prisustva L-cisteina u reakcionoj smeši (poglavlje 4.1.). Sa druge strane, istovremeno između prevojnih tačaka (271 i 343 nm), dolazi do stvaranja dva nova apsorpciona maksimuma i to na talasnim dužinama od 295 i 332 nm, što ukazuje da pod dejstvom HRP dolazi do stvaranja novih proizvoda za koje se na osnovu apsorpcionih maksimuma može zaključiti da su drugačiji u odnosu na proizvode koji su dobijeni kada je ispitivana oksidacija kvercetina pomoću HRP ali bez prisustva L-cisteina. Pored toga, na osnovu stvaranja apsorpcionog maksimuma na 295 nm i nestanka apsorpcione trake na 371 nm koja potiče od kvercetina, može se zaključiti da je tokom reakcije došlo do gubitaka konjugacije između A i B prstena kvercetina.



Slika 4.5 Promena apsorpcionog spektra reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP kada je u reakcionoj smeši bio prisutan L-cistein.

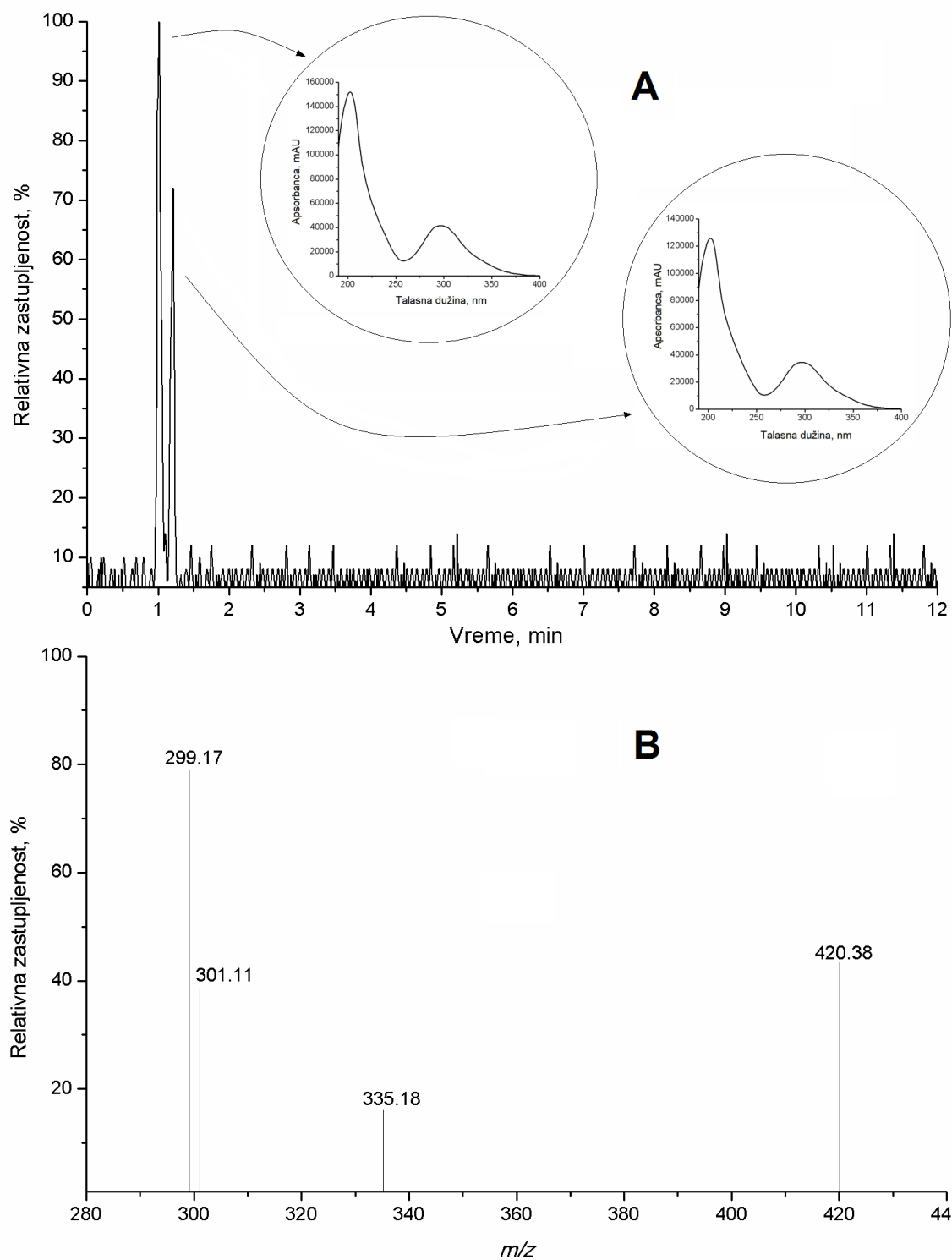


Slika 4.6 UV hromatogram reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina, snimljen na 360 nm.

4.2.1. Identifikacija nastalih proizvoda u reakciji oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina

Na slici 4.6 prikazan je UV-hromatogram reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina, dobijen primenom UHPLC-DAD-HESI-MS/MS metode. Poređenjem dobijenog hromatograma (slika 4.6) sa hromatogramom kada je ispitivana oksidacija kvercetina bez prisustva L-cisteina (slika 4.3), može se zaključiti da su u reakcionoj smeši sada prisutna samo tri proizvoda, od kojih je jedan potpuno nov sa retencionim vremenom od 1,12 min. Na osnovu dobijenih masa m/z 329,19 i 301,20, i njihove MS fragmentacije (tabela 4.1) proizvodi sa retencionim vremenima od 5,81 i 6,92 min, respektivno, identifikovani su kao derivati hinona kvercetina [hinon kvercetina+2CH₃-H]⁻ i kvercetin [kvercetin-H]⁻. Sa druge strane, MS analiza novonastalog pika na retencionom vremenu od 1,12 min je pokazala da on zapravo potiče od dva nova jedinjenja (t_R =1,01 i 1,17 min, slika 4.7A) koja imaju identične masene pikove m/z 420,04±0,1 i identičnu MS fragmentaciju (slika 4.7B). Na osnovu njihove mase i MS fragmentacije može se zaključiti da su novonastala jedinjenja adukti kvercetina i L-cisteina (eksp. m/z 420,04 i 420,03 [kvercetin+cistein-H]⁻, teor. m/z 420,0389 [kvercetin+cistein-H]⁻), gde jonski fragmenti m/z 301,1 i m/z 299,2 potiču od kvercetina i hinona kvercetina, respektivno.

Posmatranjem dobijenih PDA spektara novonastalih jedinjenja (slika 4.7A, inkrement) može se zaključiti da oba proizvoda imaju po jedan apsorpcioni maksimum na 295 nm, što ukazuje da stvaranje apsorpcionog maksimuma na 295 nm u UV-VIS apsorpcionom spektru reakcione smeše (slika 4.5) potiče upravo od stvaranja cisteinil-kvercetinskih adukata. Poređenjem dobijenih hromatograma za reakciju oksidacije kvercetina pomoću HRP u odsustvu (slika 4.3) i prisustvu L-cisteina (slika 4.6), može se zaključiti značajno smanjenje oksidacionih proizvoda kada je u reakcionoj smeši bio prisutan L-cistein. Ovakav rezultat ukazuje da L-cistein slično kao i glutation, ima sposobnost da sakuplja prethodno stvorene oksidacione proizvode kvercetina (Awad i sar., 2000). Pozicija dva nova jedinjenja u UV-hromatogramu (t_R =1,12 min, slika 4.6) može se objasniti činjenicom da vezivanje L-cisteina sa kvercetinom dovodi do povećanja njegove hidrofilnosti zbog prisustva dveju hidrofilnih (karboksi i amino) grupa u L-cisteinil ostatku. Takođe, važno je napomeniti da smo ispitivali i reakciju modifikacije kvercetina sa L-cisteinom bez prisustva HRP, ali adukti kvercetina sa cisteinom nisu detektovani. Na osnovu ovoga može se zaključiti da je HRP direktno odgovorna za formiranje adukata kvercetina sa cisteinom.



Slika 4.7 LC-MS hromatogram reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina (A) i PDA spektri dobijenih proizvoda (u inkrementu). MS fragmentacija proizvoda (B).

Posmatranjem hemijske strukture kvercetina i analizom prethodno dobijenih rezultata od strane Awada i njegovih saradnika (2000, 2002 i 2003), kada je ispitivana modifikacija kvercetina sa glutationom, može se očekivati da se adicija L-cisteina dešava u prstenu A kvercetina, na pozicijama 6 i 8. Takođe, poznato je da oksidacija semihinona kvercetina dovodi do formiranja *o*-hinona, što dalje dovodi do izomerizacije *o*-hinona u njegov izomer *p*-hinon, koji u poređenju sa *o*-hinonom ima elektrofilni karakter u pozicijama C6 i C8 u prstenu A, što pruža mogućnost za formiranje C6- i C8- cisteinil-kvercetinskih adukata (Awad i sar., 2000, 2002 i 2003).

4.3. Ispitivanje kinetičkog mehanizma reakcije enzimске modifikacije kvercetina sa cisteinom pomoću HRP

Poznavanje kinetičkog mehanizma bilo koje enzimске reakcije je od izuzetnog značaja kako zbog kontrole same reakcije, tako i zbog sprečavanja eventualno neželjenih procesa koji se stalno dešavaju unutar određenog sistema. Na osnovu prethodnih ispitivanja (Dunfor, 1991; Wu i sar., 1998) poznato je da se proces oksidacije aromatičnih jedinjenja pomoću HRP može posmatrati kao modifikovani tip ping-pong kinetike, koji se najčešće predstavlja po sledećoj reakcionoj šemi:



Tokom procesa oksidacije aromatičnih jedinjenja nativna HRP se oksiduje pomoću vodonik-peroksida i konvertuje u *HRP-I*, koje predstavlja aktivni intermedijerni oblik HRP-a. *HRP-I* oksiduje aromatična jedinjenja (AH_2) do slobodnih radikala ($\cdot AH$), pri čemu se *HRP-I* redukuje do druge aktivne forme HRP-a, *HRP-II*. Slično tome, *HRP-II* oksiduje drugo aromatično jedinjenje do slobodnih radikala i pritom se redukuje na nativni oblik HRP-a (Wu i sar., 1998).

Pored rezultata objavljenih od strane Dunfora (1991), gde je ispitivana oksidacija fenolnih jedinjenja pomoću HRP, Obinger je sa svojim saradnicima (1996) ispitivao proces oksidacije tiolnih jedinjenja pod dejstvom HRP. Dobijeni rezultati su pokazali da se oksidacija tiolnih jedinjenja pod dejstvom HRP takođe dešava pod dejstvom intermedijernih

oblika HRP (*HRP-I* i *HRP-II*) pri čemu tada dolazi do stvaranja tiolnih radikala i HRP ponovo u nativni oblik.



Imajući u vidu dobijene rezultate ispitivanja oksidacije fenolnih i tiolnih jedinjenja pomoću HRP (Dunfor, 1991; Wu i sar., 1998; Obinger i sar., 1996), postavlja se pitanje kakav je kinetički mehanizam oksidacije ovih jedinjenja kada se ona istovremeno nalaze u reakcionoj smeši zajedno sa HRP i vodonik peroksidom.

Ispitivanje kinetičkog mehanizma reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina je rađeno prema metodi opisanoj u poglavlju 3.6. Na osnovu nastalih promena apsorpcionih spektara reakcione smeše tokom trajanja reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina (slika 4.6), za dalja kinetička ispitivanja odabrana je talasna dužina od 380 nm. Uzimajući u obzir činjenicu da je tokom rada primećeno da se tokom reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP istovremeno odigravaju dve reakcije: prva enzimsko i druga ne-enzimsko (oksidacija bez prisustva HRP), njihove brzine su merene nezavisno, a dobijeni rezultati su prikazani uporedo na graficima promene apsorbanace od vremena trajanja reakcije.

Na slikama P.1-6(A-F, prilog) prikazani su rezultati merenja promene apsorbanace na 380 nm tokom trajanja reakcije, kada je koncentracija kvercetina u reakcionoj smeši bila promenljiva, koncentracija vodonik peroksida bila konstantno promenljiva, a koncentracija L-cisteina bila konstantna. Promene brzina reakcija u zavisnosti od koncentracije kvercetina prikazane su na slikama P.1-6(G, prilog), a promene recipročnih vrednosti koncentracije kvercetina u zavisnosti od recipročnih vrednosti brzine enzimske reakcije prikazane su na slikama P.1-6(H, prilog).

Rezultati promene apsorbanace na 380 nm tokom trajanja reakcije za slučaj kada je koncentracija L-cisteina u reakcionoj smeši bila promenljiva, koncentracija vodonik peroksida bila konstantno promenljiva, a koncentracija kvercetina bila konstantna su prikazani na slikama P.7-12(A-F, prilog). Na osnovu dobijenih vrednosti brzine enzimske reakcije crtani su grafici (slika P.7-12(G-H, prilog)) promene brzine reakcije u zavisnosti od koncentracije L-cisteina (slika P.7-12(G, prilog)) i promene recipročnih vrednosti

koncentracije L-cisteina u zavisnosti od recipročnih vrednosti brzine enzimske reakcije (slika P.7-12(H, prilog)).

Na slikama P.13-18(A-F, prilog) prikazane su promene apsorbance tokom trajanja reakcije, kada je koncentracija vodonik peroksida u reakcionoj smeši bila promenljiva. Koncentracija kvercetina je u ovom slučaju bila konstantno promenljiva, a koncentracija L-cisteina je bila konstantna. Promene brzine enzimske reakcije u zavisnosti od koncentracije vodonik peroksida date su na slikama P.13-18(G, prilog) a promene recipročne vrednosti koncentracije vodonik peroksida u zavisnosti od recipročne vrednosti brzine enzimskih reakcija (Lajnviver-Berk-ovi grafici) su prikazane na slikama P.13-18(H, prilog).

Rezultati promene apsorbance na 380 nm, za slučaj kada je u reakcionoj smeši koncentracija vodonik peroksida bila promenljiva pri čemu je koncentracija cisteina bila konstantno promenljiva, a koncentracija kvercetina bila stalno konstantna, prikazani su na slikama P.19-24(A-F, prilog). Sa njih su očitavane vrednosti za ukupnu brzinu i brzinu ne-enzimske reakcije nakon čega je vršeno oduzimanje vrednosti dobijene za brzinu ne-enzimske od ukupne reakcije, a zatim su crtani su grafici promene recipročne vrednosti koncentracije vodonik peroksida u zavisnosti od recipročne vrednosti brzine enzimskih reakcija. Dobijeni Lajnviver-Berk-ovi grafici su prikazani na slikama P.19-24(G-H, prilog).

Rezultati promene apsorbance na 380 nm, kada je u reakcionoj smeši koncentracija kvercetina bila promenljiva, pri čemu je koncentracija cisteina bila konstantno promenljiva, a koncentracija vodonik peroksida bila stalno konstantna, prikazani su na slikama P.25-30(A-F, prilog). Nakon očitavanja dobijenih vrednosti, crtani su grafici promene recipročne vrednosti koncentracije vodonik peroksida u zavisnosti od recipročne vrednosti brzine enzimskih reakcija. Dobijeni Lajnviver-Berk-ovi grafici su prikazani na slikama P.25-P.30(G-H, prilog).

Rezultati promene apsorbance na 380 nm, za slučaj kada je u reakcionoj smeši koncentracija L-cisteina bila promenljiva pri čemu je koncentracija kvercetina bila konstantno promenljiva, a koncentracija vodonik peroksida bila stalno konstantna, prikazani su na slikama P.31-36(A-F, prilog). Oduzimanjem dobijenih vrednosti za brzinu ne-enzimske reakcije od vrednosti za brzinu ukupne reakcije, dobijeni su podaci o brzini enzimske reakcije, a nakon toga su crtani grafici promene recipročnih vrednosti koncentracije L-cisteina u zavisnosti od recipročnih vrednosti brzine enzimskih reakcija. Dobijeni Lajnviver-Berk-ovi grafici su prikazani na slikama P.31-36(G-H, prilog).

Posmatranjem dobijenih grafika promene koncentracije supstrata u odnosu na brzinu enzimske reakcije (P1-36(G), prilog), može se primetiti da svi grafici pokazuju zavisnost Mihaelis-Mentenovog tipa. Na osnovu ovoga se mogu izvesti dva zaključka: prvi, da je

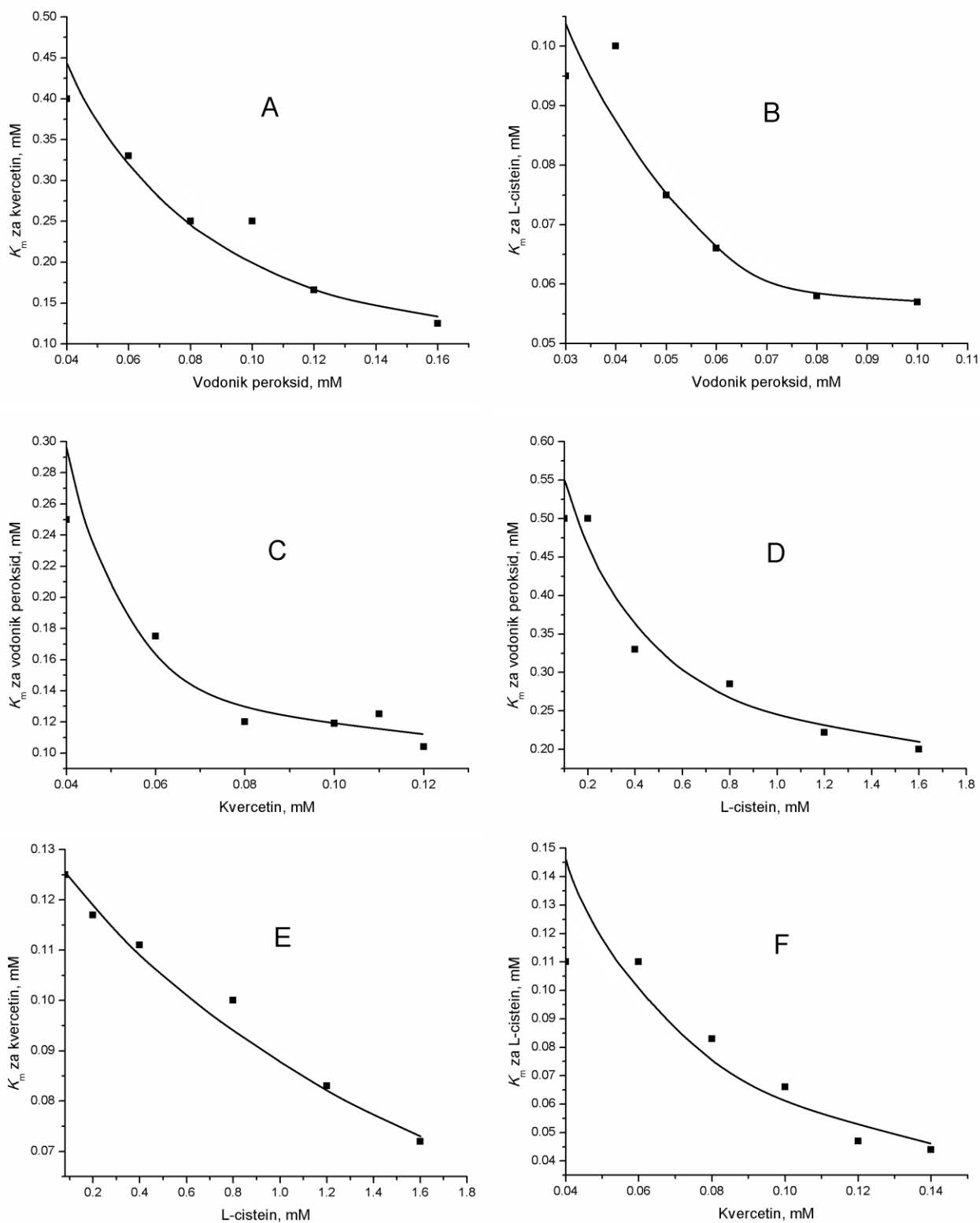
reakcija oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina enzimsko, i drugi, da su u toj reakciji prisutna tri supstrata: kvercetin, vodonik peroksid i L-cistein. S obzirom da se pri svim ispitivanim odnosima učesnika reakcije sa povećanjem koncentracije supstrata uočava i povećanje vrednosti kinetičkog parametra $V_{\max}$, može se zaključiti da tokom trajanja reakcije nije prisutna inhibicija supstratom. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u reakciji modifikacije kvercetina sa L-cisteinom istovremeno odigravaju dve reakcije: prva enzimsko i druga ne-enzimsko. Dobijeni rezultati pokazuju da je udeo ne-enzimske reakcije u ukupnoj reakciji oko 10%. Objašnjenje za ovakav rezultat leži u činjenici da je oksidacija kvercetina bez prisustva HRP moguća i samo na osnovu prisustva vodonik peroksida, koji svojim razlaganjem daje hidroksilne radikale, hidroksilne jone, peroksidne radikale i hidroperoksi radikale koji su sposobni da izvrše degradaciju kvercetina (Obinger i sar., 1997). Pored toga, ukoliko se uzme u obzir i činjenica da je reakcija oksidacije kvercetina rađena u uobičajnim laboratorijskim uslovima, dakle uz prisustvo vazduha, može se pretpostaviti da je u vodenom rastvoru kvercetina prisutan i O_2 , kao i oko 250 nM hidroksilnih jona koji su nastali kao rezultat autojonizacije vode (Barnes i Schug, 2014), može se zaključiti da je proces oksidacije kvercetina bez prisustva HRP realno moguć. Sa druge strane, ukoliko se uzmu u obzir objavljeni rezultati od strane Wardman-a i Sonntag-a (1995), proces oksidacije L-cisteina samo u prisustvu vodonik peroksida je takođe moguć, što stvara teoretsku mogućnost za stvaranje cisteinil-kvercetinskih adukata. Međutim, naši rezultati ispitivanja oksidacije kvercetina u prisustvu L-cisteina kada u reakcionoj smeši nije bilo HRP su pokazali da ne dolazi do stvaranja cisteinil-kvercetinskih adukata, o čemu je već bilo reči u prethodnom poglavlju.

Imajući u vidu da Mihaelis-ova konstanta (K_m) predstavlja koncentraciju supstrata koja odgovara polovini maksimalne brzine ($V_{\max}$), može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije supstrata opada vrednost Mihaelis-Mentenove konstante, što znači da sa povećanjem koncentracije supstrata raste afinitet enzima prema supstratu. Međutim, sa druge strane ukoliko se posmatraju dobijene vrednosti za $V_{\max}$ može se zaključiti da u slučajevima kada je ispitivan uticaj povećanja koncentracije vodonik peroksida na vrednosti K_m za kvercetin i L-cistein (slučaj A i B) nije došlo do srazmernog povećanja vrednosti maksimalne brzine ($V_{\max}$). Ovakav rezultat se može objasniti time što prisustvo L-cisteina kao tiolne komponente utiče na stvaranje vodonik peroksida procesom autooksidacije i regeneracije što znači da vodonik peroksid već postoji u reakcionoj smeši u dovoljnoj količini tako da je njegov uticaj na brzinu reakcije modifikacije kvercetina mali (Obinger i sar., 1997).

U slučajevima kada je ispitivan uticaj povećanja koncentracije L-cisteina na vodonik peroksid i kvercetin (slučaj D i E), može primetiti da opada vrednost Mihaelis-Mentenove konstante, što znači da sa povećanjem koncentracije supstrata raste afinitet enzima prema supstratu. Međutim, može se primetiti i to da sa povećanjem koncentracije L-cisteina raste i vrednost za $V_{\max}$ i k_{+2} , što znači da L-cistein svojim prisustvom pozitivno utiče na povećanje brzine reakcije modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP. Objašnjenje za ovakav rezultat je u tome što se sa povećanjem koncentracije L-cisteina istovremeno povećava i prisustvo tiolnih radikala koji učestvuju u oksidaciji kvercetina i stvaranju cisteinil-kvercetinskih adukata.

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja kvercetina na vrednosti K_m za vodonik peroksid, odnosno za L-cistein (slučaj C i F), su pokazali da, kao i u prethodnim slučajevima, sa porastom koncentracije kvercetina opada vrednost Mihaelis-Mentenove konstante što znači da sa povećanjem koncentracije supstrata raste afinitet enzima prema supstratu. Što se tiče dobijenih vrednosti parametra $V_{\max}$ i k_{+2} , u slučaju C postoji trend blagog porasta vrednosti pomenutih parametara, međutim sa druge strane u slučaju F se to ne može primetiti. Dobijeni rezultat u slučaju C se može objasniti time da povećanje koncentracije kvercetina dovodi do povećanog stvaranja slobodnih radikala kvercetina koji kasnije pomažu u procesu oksidacije L-cisteina i stvaranju tiolnih radikala, što na kraju dovodi do ubrzanja reakcije modifikacije kvercetina.

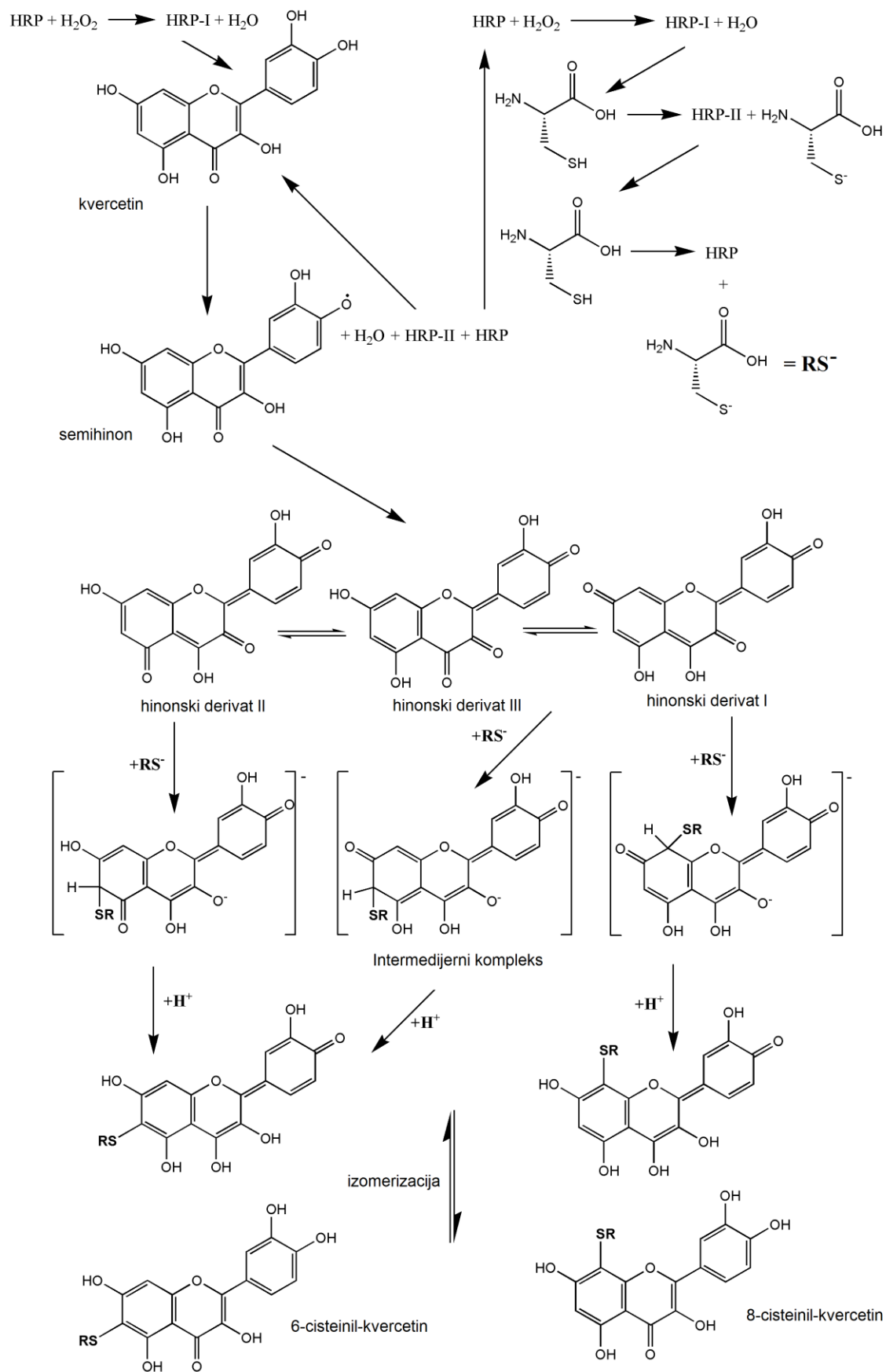
Na slici 4.8 prikazane su zavisnosti Mihaelis-Mentenove konstante od koncentracije supstrata. Posmatranjem slike 4.8 i primenom metode koja je opisana u poglavlju 3.6., može se zaključiti da se proces oksidacije kvercetina u prisustvu L-cisteina odvija po usaglašenom kinetičkom mehanizmu. Na osnovu rezultata koji su objavljeni od strane Galati-a i njegovih saradnika (1999), može se zaključiti da HRP najpre reaguje sa vodonik peroksidom što dovodi do stvaranja aktivnog intermedijernog oblika HRP. Nakon toga, aktivni intermedijerni oblik HRP najpre reaguje sa kvercetinom, pri čemu dolazi prvo do stvaranja semihinona, koji prelazi u hinonske derivate I, II i III koji međusobno predstavljaju izomerne oblike, a zatim i sa L-cisteinom gde dolazi do stvaranja tiolnih radikala. Nakon toga dolazi do reakcije između tiolnih radikala i hinonskih derivata kvercetina i stvaranja intermedijernog kompleksa nakon čega dolazi do reakcije između atoma vodonika i intermedijernog kompleksa i stvaranja 8 i 6-cisteinil-kvercetinskih adukata (slika 4.9).



Slika 4.8 Zavisnost Mihaelis-ove konstante od koncentracije supstrata.

Tabela 4.2 Kinetički parametri u reakciji oksidacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP

oznaka	Kvercetin, mM	L-cistein, mM	H ₂ O ₂ , mM	K_m , mM	V_{max} , $\Delta A_{380}/\text{min}$	k_{+2} , $\Delta A_{380}/\text{min} \cdot \text{nM}^{-1}$	V_{max}/K_m
A	Promenljiva	0,80	0,04	0,400±0,02	0,20±0,01	0,25±0,02	0,50±0,02
			0,06	0,330±0,03	0,66±0,01	0,83±0,02	2,00±0,02
			0,08	0,250±0,05	0,05±0,04	0,07±0,05	0,21±0,05
			0,10	0,250±0,02	0,17±0,04	0,21±0,04	0,68±0,05
			0,12	0,166±0,01	0,05±0,05	0,07±0,05	0,32±0,06
			0,16	0,125±0,02	0,05±0,02	0,06±0,03	0,40±0,03
B	0,08	Promenljiva	0,03	0,095±0,02	0,07±0,03	0,09±0,04	0,75±0,04
			0,04	0,100±0,01	0,17±0,02	0,21±0,02	1,70±0,02
			0,05	0,075±0,02	0,19±0,02	0,24±0,03	2,53±0,04
			0,06	0,066±0,05	0,33±0,05	0,41±0,05	5,00±0,05
			0,08	0,058±0,04	0,17±0,04	0,21±0,05	2,93±0,05
			0,10	0,057±0,02	0,33±0,02	0,41±0,03	5,79±0,03
C	0,04	0,80	Promenljiva	0,250±0,03	0,04±0,03	0,05±0,04	0,16±0,05
	0,06			0,175±0,02	0,03±0,03	0,04±0,02	0,17±0,04
	0,08			0,120±0,01	0,03±0,01	0,04±0,02	0,27±0,03
	0,10			0,119±0,02	0,41±0,03	0,52±0,03	3,47±0,04
	0,11			0,125±0,02	0,05±0,02	0,06±0,02	0,36±0,03
	0,12			0,104±0,01	0,05±0,03	0,06±0,03	0,43±0,04
D	0,08	Promenljiva	0,10	0,500±0,02	0,71±0,05	0,89±0,01	1,43±0,02
			0,20	0,500±0,03	0,77±0,05	0,96±0,02	1,54±0,02
			0,40	0,330±0,04	1,02±0,02	1,28±0,03	3,09±0,03
			0,80	0,285±0,02	1,06±0,01	1,33±0,02	3,72±0,045
			1,20	0,222±0,01	1,11±0,02	1,39±0,03	5,00±0,02
			1,60	0,200±0,01	1,37±0,03	1,71±0,03	6,85±0,03
E	Promenljiva	0,10	0,08	0,125±0,02	0,55±0,03	0,69±0,03	4,40±0,03
			0,20	0,117±0,02	0,58±0,04	0,73±0,04	4,96±0,04
			0,40	0,111±0,02	0,60±0,02	0,75±0,01	5,41±0,01
			0,80	0,100±0,03	0,66±0,01	0,83±0,02	6,60±0,02
			1,20	0,083±0,01	0,71±0,02	0,89±0,04	8,55±0,04
			1,60	0,071±0,02	0,91±0,02	1,14±0,03	12,82±0,03
F	0,04	Promenljiva	0,10	0,110±0,02	0,80±0,02	1,00±0,02	7,27±0,02
	0,06			0,110±0,01	0,56±0,01	0,70±0,01	5,09±0,01
	0,08			0,083±0,02	0,50±0,02	0,63±0,02	6,02±0,01
	0,10			0,066±0,03	0,53±0,03	0,66±0,02	8,03±0,03
	0,12			0,047±0,03	0,42±0,03	0,53±0,03	8,94±0,03
	0,14			0,044±0,02	0,50±0,04	0,63±0,04	11,36±0,02



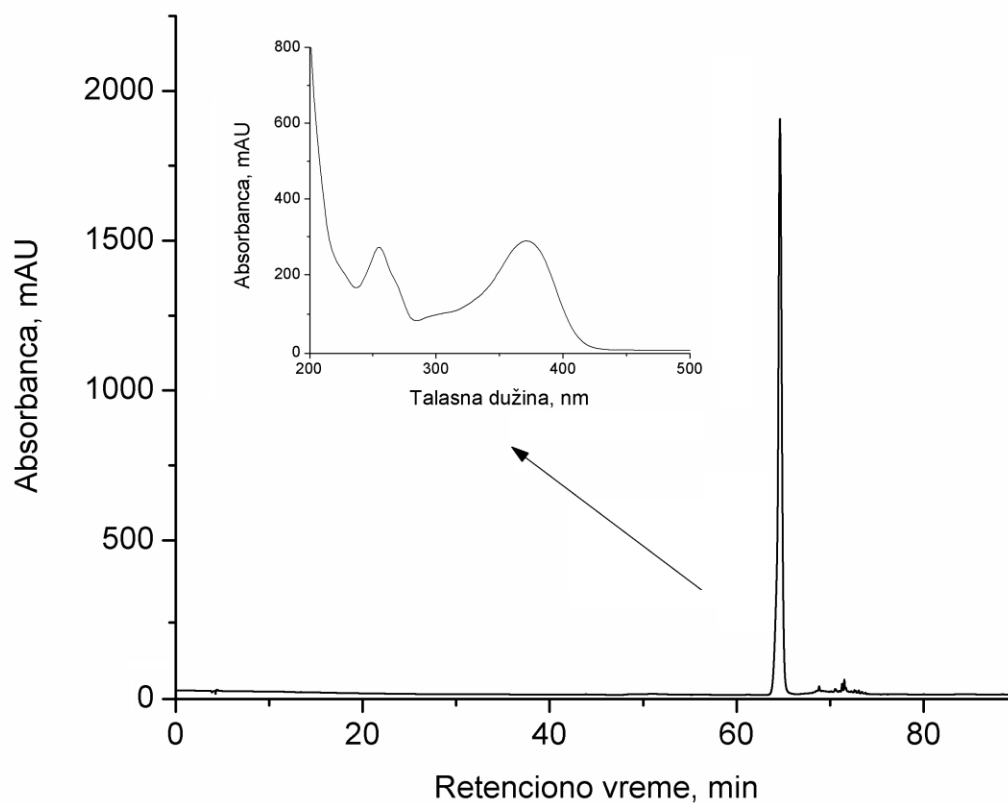
Slika 4.9 Predloženi mehanizam stvaranja cisteinil-kvercetinskog adukta (prema Awad i sar., 2000, 2002 i 2003).

4.4. Optimizacija reakcije modifikacije kvercetina sa cisteinom pomoću HRP

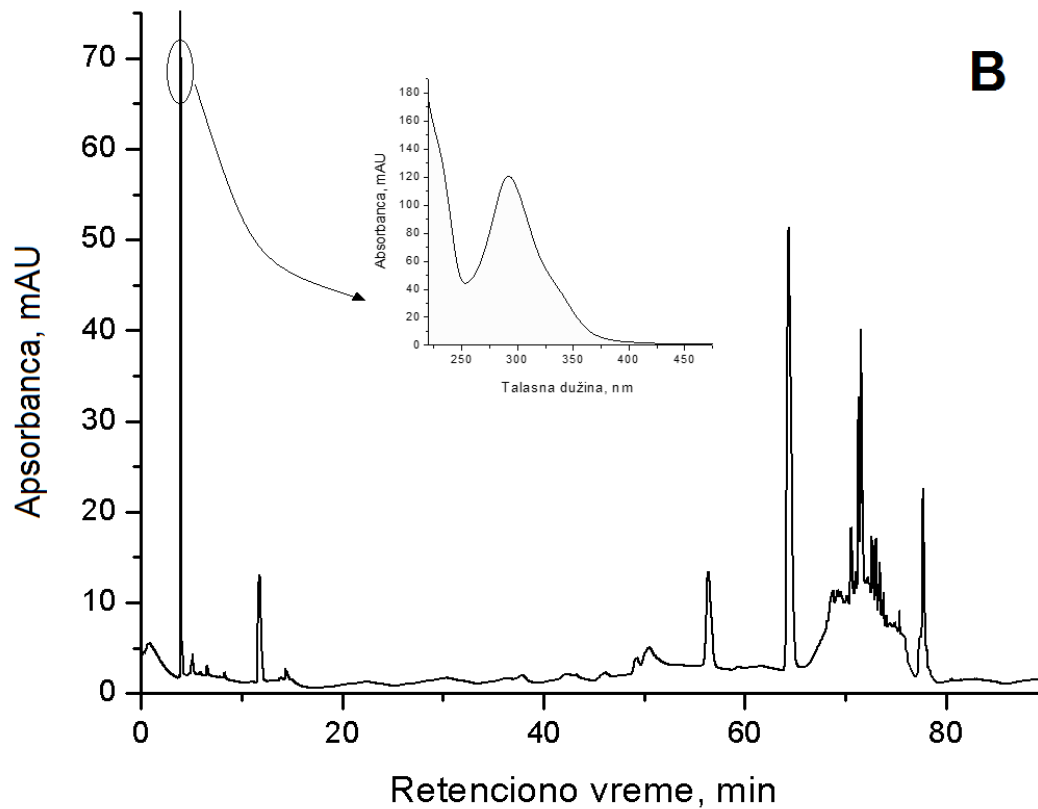
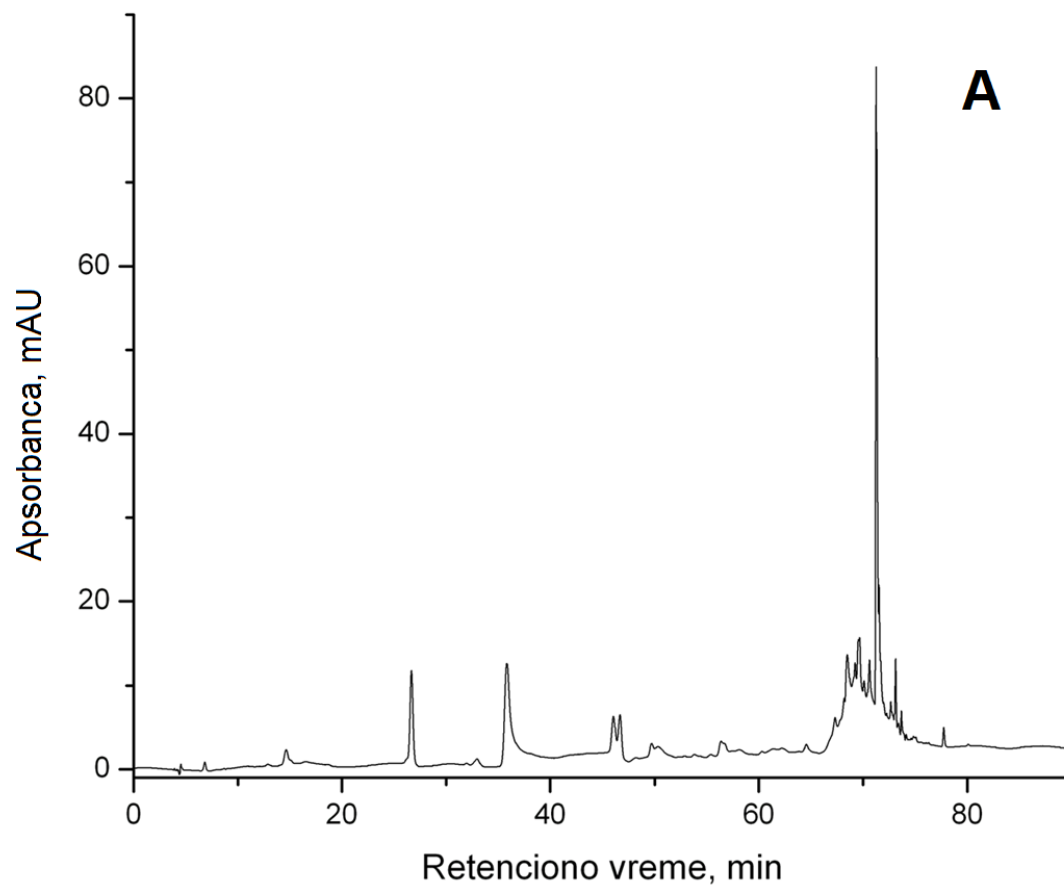
U okviru optimizacije reakcije modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP ispitivan je uticaj temperature, pH vrednosti, koncentracija kvercetina, L-cisteina i vodonik peroksida. Reakcija je izvođena na način koji je opisan u poglavlju 3.3, s tim što je jedan od parametara bio promenljiv, a ostali bili konstantni. Kao metoda identifikacije i kvantifikacije modifikovanih proizvoda kvercetina korišćena je klasična HPLC metoda, na način koji je opisan u poglavlju 3.4.

Na slici 4.10 prikazan je HPLC hromatogram rastvora kvercetina u reakcionoj smeši snimljen na 360 nm. Posmatranjem dobijenog HPLC hromatograma može se primetiti prisustvo jednog izrazitog pika na retencionom vremenu od 64,6 min. Na osnovu PDA spektra ($\lambda_{\max}$ na 372 i 256 nm) koji je dat u inkrementu slike 4.10, može se zaključiti da pik sa retencionim vremenom od 64,6 min potiče od kvercetina. Na slici 4.11 prikazani su HPLC hromatogrami reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP u odsustvu (A) i prisustvu L-cisteina (B). Posmatranjem dobijenih rezultata, u hromatogramu koji je dobijen kada je oksidacija kvercetina vršena u prisustvu L-cisteina, može se primetiti prisustvo jednog novog izrazitog pika sa retencionim vremenom od 3,9 min i $\lambda_{\max}$ na 294 nm. Poređenjem dobijenog PDA spektra sa PDA spektrom koji je prethodno dobijen (slika 4.7, A-inkrement) može se zaključiti da pik sa retencionim vremenom od 3,9 min potiče od stvorenog cisteinil-kvercetiniskog adukta.

Rezultati ispitivanja uticaja temperature, pH, koncentracije kvercetina, L-cisteina i vodonik peroksida na proces stvaranja cisteinil-kvercetiniskih adukata prikazani su na slikama 4.12–4.16, respektivno.



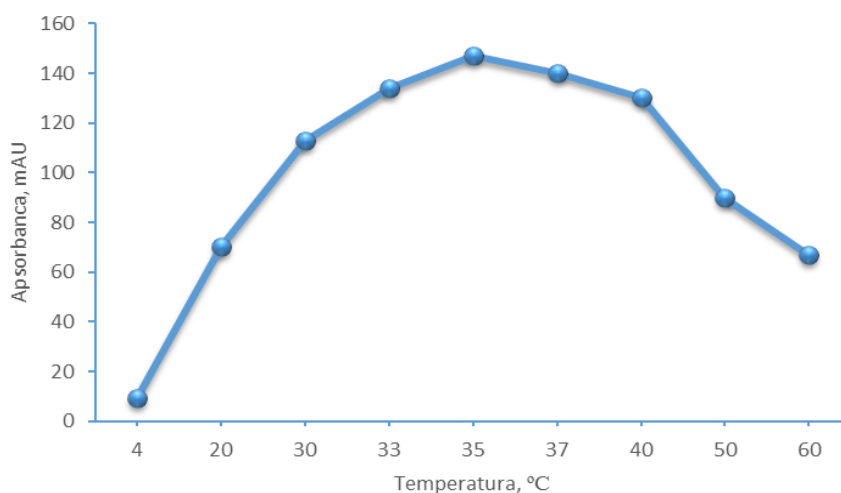
Slika 4.10 HPLC hromatogram kvercetina u puferskom rastvaraču (retenciono vreme 64,6 min i λ_{max} na 372 nm), snimljen na 360 nm. U epruvetu je odmereno je 2500 μl 100 mM fosfatnog pufera (pH 7,0), 2460 μl destilovane vode i 40 μl 10 mM rastvora kvercetina. Iz epruvete je uzet uzorak od 20 μl i podvrgnut HPLC analizi.



Slika 4.11 HPLC hromatogram reakcije oksidacije kvercetina pomoću HRP u odsustvu (A) i prisustvu L-cisteina (B) snimljen na 295 nm.

4.4.1. Uticaj temperature na reakciju modifikacije kvercetina

Na slici 4.12 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja temperature na reakciju modifikacije kvercetina. Posmatranjem dobijenih rezultata za ispitivanje uticaja temperature može se zaključiti da u prvom delu sa povećanjem temperature u opsegu od 4 do 35 °C dolazi do povećanja količine stvorenih cisteinil-kvercetinskih, a da zatim dolazi do postepenog smanjenja količine stvorenih cisteinil-kvercetinskih adukata. Imajući u vidu činjenicu da kvercetin i L-cistein imaju visoku stabilnost (tačka topljenja 316 i 240 °C, respektivno) dobijeni rezultat se može objasniti činjenicom da je za stvaranje modifikovanih proizvoda kvercetina u ispitivanim uslovima direktno odgovorna HRP. Drugim rečima, najveća količina stvorenih modifikovanih proizvoda kvercetina nastala je približno na temperaturi na kojoj prema literaturnim podacima HRP pokazuje najveću aktivnost (Veitch, 2004).

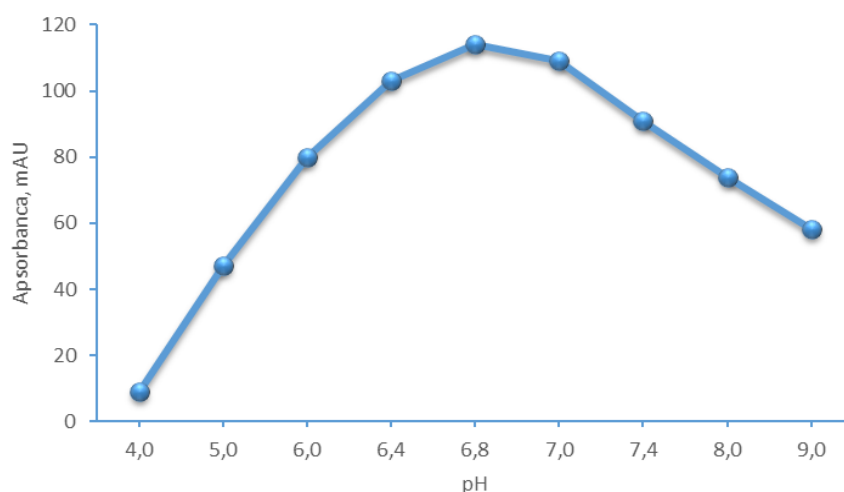


Slika 4.12 Rezultati ispitivanja uticaja temperature na reakciju modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP. U epruvetama je odmereno 2500 µl 100 mM fosfatnog pufera (pH 7,0), 2320 µl destilovane vode, 50 µl 20 mM L-cisteina, 40 µl 10 mM kvercetina, 40 µl HRP i 50 µl 10 mM vodonik peroksida sa kojim je reakcija započinjala. Nakon inkubacije od 10 minuta na datim temperaturama, reakcija je zaustavljena dodatkom 2,5 ml 96% etanola, a nakon toga su iz reakcione smeše uzimani uzorci od 20 µl i podvrgavani HPLC analizi.

4.4.2. Uticaj pH vrednosti na reakciju modifikacije kvercetina

Rezultati ispitivanja uticaja pH vrednosti na količinu stvorenih cisteinil-kvercetinskih adukata prikazani su na slici 4.13. Posmatranjem dobijenih rezultata može se zaključiti da sa povećanjem pH vrednosti do 6,8 dolazi do povećanja količine stvorenih modifikovanih proizvoda kvercetina. Međutim, sa daljim povećanjem pH vrednosti u reakcionoj smeši dolazi do smanjenja količine modifikovanih proizvoda kvercetina. Prethodna istraživanja

sprovedena od strane Obinger-a i njegovih saradnika (1997) su pokazala da proces oksidacije tiolnih komponenti u velikoj meri zavisi od pH vrednosti sredine u kojoj se dešava oksidacija, na taj način što u pH opsegu od 5 do 9 dolazi do povećane deprotonizacije tiolnih jedinjenja i povećanog stvaranja tiolnih radikala. Na osnovu ovih rezultata bilo bi očekivano da sa povećanjem pH vrednosti proporcionalno raste i količina stvorenih modifikovanih proizvoda, što nije slučaj. Objašnjenje za ovakav rezultat leži u činjenici da sa povećanjem pH rastvora (iznad 6.8) teže dolazi do protonizacije hinona (Awad i sar., 2002), što smanjuje mogućnost za stvaranje novih modifikovanih proizvoda kvercetina. Takođe, ukoliko se uzmu u obzir i dobijeni podaci za aktivnost HRP u različitom opsegu pH vrednosti (Veitch, 2004), može se zaključiti da HRP upravo u pH opsegu od 6 do 8 pokazuje najveću aktivnost.

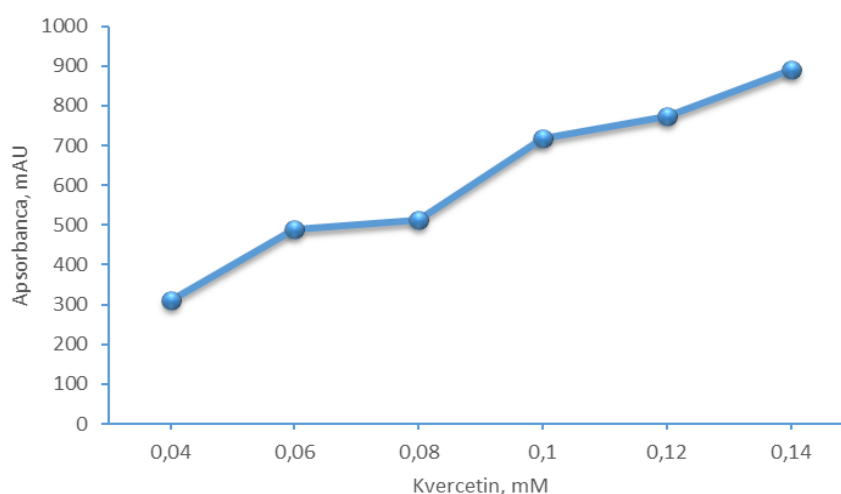


Slika 4.13 Rezultati ispitivanja uticaja pH vrednosti na reakciju enzimske modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP. Sastav reakcione smeše: 2500 μ l 100 mM fosfatnog pufera pH vrednosti 4, 5, 6, 6,4, 6,8, 7,0, 7,4 i 9, 2320 μ l destilovane vode, 50 μ l 20 mM L-cisteina, 40 μ l 10 mM kvercetina, 40 μ l HRP i 50 μ l 10 mM vodonik peroksida. Po završetku inkubacije od 10 minuta na 35 °C, reakcija je prekidana dodatkom 2,5 ml 96% etanola. Nakon prekidanja reakcije uzimani su uzorci iz reakcione smeše (20 μ l) i podvrgavani HPLC analizi.

4.4.3. Uticaj koncentracije kvercetina na reakciju modifikacije kvercetina

Na slici 4.14 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja koncentracije kvercetina na količinu stvaranja modifikovanih proizvoda kvercetina (cisteinil-kvercetinskih adukata). Rezultati ispitivanja pokazuju porast količine stvaranja cisteinil-kvercetinskih adukata sa povećanjem količine kvercetina u reakcionoj smeši. Ukoliko se uporedi odnos količina kvercetina i L-cisteina u reakcionoj smeši može se zaključiti da je količina L-cisteina u stalnom višku, čak i kada je koncentracija kvercetina bila najviša (0,14 mM). Sa druge strane,

na osnovu dobijenih rezultata primenom UHPLC-DAD-HESI-MS/MS metode (poglavlje 4.1.) poznato je da su dobijeni proizvodi bili mono-cisteinski derivati kvercetina što ukazuje na činjenicu da je u reakciji modifikacije kvercetina odnos reagovanja kvercetina i L-cisteina 1:1. Na osnovu ove činjenice, može se zaključiti da je u ispitivanom opsegu stalni porast količine proizvoda reakcije nastao zbog toga što kvercetin nije bio u višku u odnosu na L-cistein, pa je celokupna količina stvorenih hinonskih derivata kvercetina imala mogućnost da svaki put izreaguje sa već stvorenim tiolnim radikalima i dovede do stvaranja cisteinil-kvercetinuskog adukta.

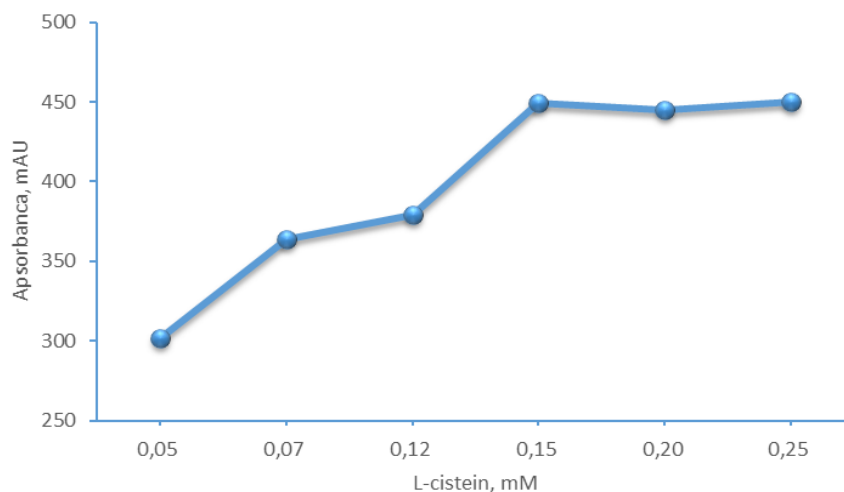


Slika 4.14 Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije kvercetina na reakciju modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP snimljeni na 295 nm. U epruvetama je odmereno 2500 μ l 100 mM fosfatnog pufera (pH 6,8), 50 μ l 20 mM L-cisteina, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 μ l 10 mM kvercetina, 40 μ l HRP i 50 μ l 10 mM vodonik peroksida. Destilovana voda je dodavana kao dopuna do 5 ml. Posle inkubacije u trajanju od 10 minuta na 35 °C, reakcija je zaustavljena sa 2,5 ml 96% etanola. Posle prekidanja reakcije uzorci iz reakcione smeše (20 μ l) i podvrgavani HPLC analizi.

4.4.4. Uticaj koncentracije cisteina na reakciju modifikacije kvercetina

Rezultati ispitivanja uticaja L-cisteina na količinu stvorenih modifikovanih proizvoda kvercetina prikazani su na slici 4.15. Analizom dobijenih rezultata može se primetiti da u opsegu od 0,05 do 0,15 mM dolazi do povećanja količine modifikovnog kvercetina, a nakon toga u opsegu od 0,15 do 0,25 mM količina modifikovanog kvercetina je približno ista. Ovakav rezultat se može objasniti time što je u opsegu koncentracija od 0,05 do 0,15 mM koncentracija L-cisteina bila limitirajući faktor jer je kvercetin bio u višku, dok je u opsegu od 0,15 do 0,25 mM bila obrnuta situacija. Drugim rečima, u opsegu nižih koncentracija (0,05–0,15 mM), količinu stvorenih modifikovanih proizvoda je diktirala količina L-cisteina

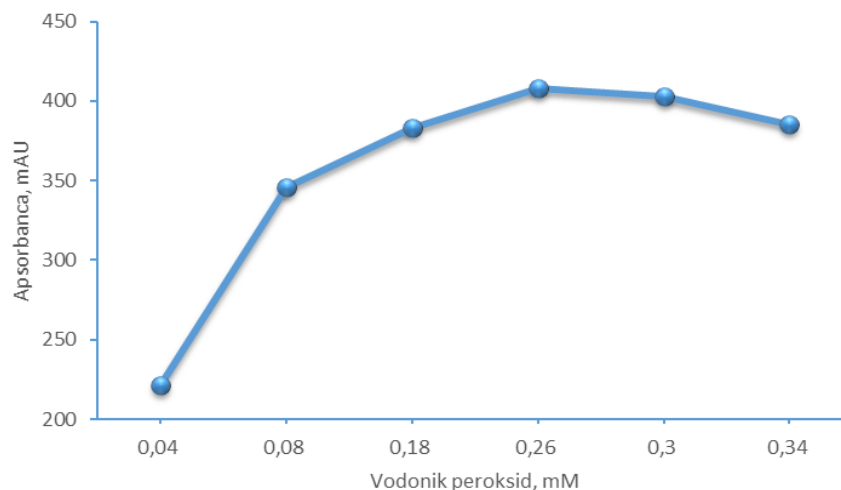
dok je u drugom delu koncentracija kvercetina bila limitirajuća (sve vreme bila konstantna), što je dovelo do stvaranja približno iste količine modifikovanih proizvoda kvercetina.



Slika 4.15 Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije L-cisteina na reakciju modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP. Sastav reakcione smeše: 2500 μ l 100 mM fosfatnog pufera (pH 6,8), 12, 17, 30, 37, 50 i 63 μ l 20 mM L-cisteina, 70 μ l 10 mM kvercetina, 40 μ l HRP i 50 μ l 10 mM vodonik peroksida. Posle inkubacije od 10 minuta na 35 °C, reakcija je zaustavljena sa 2,5 ml 96% etanola. Nakon prekidanja reakcije uzimani su uzorci iz reakcione smeše (20 μ l) i podvrgavani HPLC analizi.

4.4.5. Uticaj koncentracije vodonik peroksida na reakciju modifikacije kvercetina

Na slici 4.16 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodonik peroksida na količinu stvaranja modifikovanog proizvoda kvercetina. U početku sa povećanjem količine vodonik peroksida može se primetiti da raste i količina stvorenog modifikovanog proizvoda kvercetina i dostiže svoj maksimum pri koncentraciji vodonik peroksida od 0,26 mM. Međutim, sa daljim povećanjem količine vodonik peroksida (preko 0,26 mM) količina stvorenog modifikovanog kvercetina u reakcionoj smeši se smanjuje. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da vodonik peroksid pored toga što ima sposobnost prevođenja native HRP u njen aktivni intermedijerni oblik (*HRP-I*), može da deluje i inhibirajuće što su prethodna ispitivanja već pokazala (Nicell i Wright, 1997; Nazari i sar., 2007; Liu i sar., 2002; Nicell i sar., 1995), gde je inhibirajući efekat vodonik peroksida bio prisutan već pri koncentraciji od oko 0,3 mM, što u izvesnoj meri ukazuje na poklapanje sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju (0,26 mM).

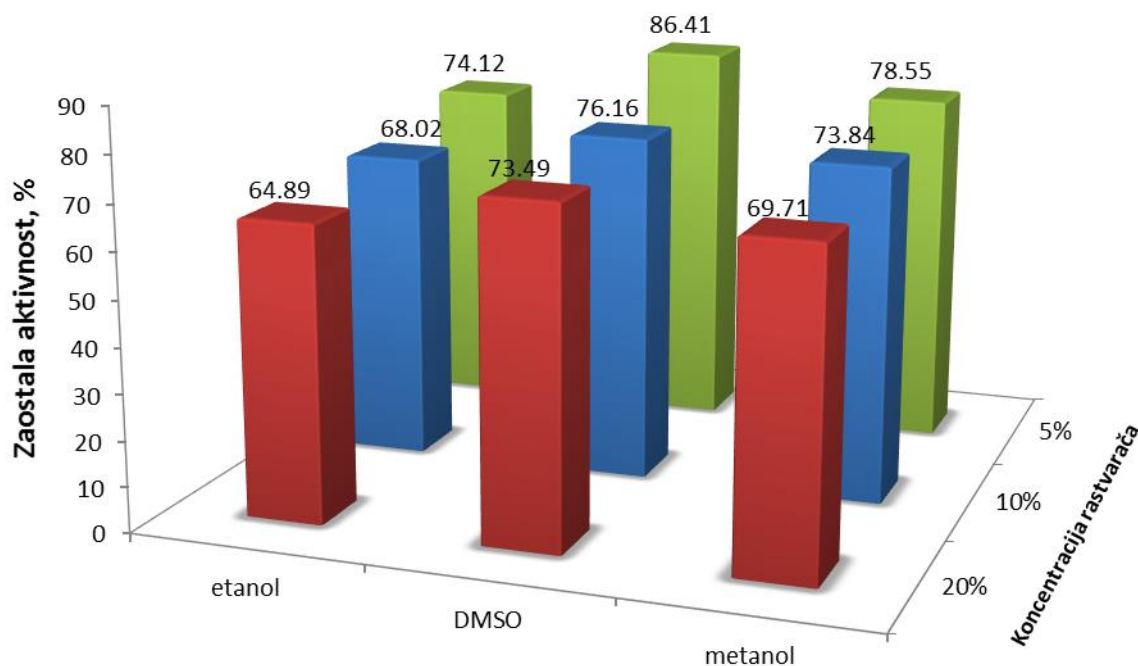


Slika 4.16 Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije vodonik peroksida na reakciju modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP. U smeši je odmereno 2500 μ l 100 mM fosfatnog pufera (pH 6,8), 63 μ l 20 mM L-cisteina, 70 μ l 10 mM kvercetina, 40 μ l HRP i 20, 40, 90, 110, 130, 150 i 170 μ l 10 mM rastvora vodonik peroksida. Destilovana voda je dodavana kao dopuna do 5 ml. Posle inkubacije od 10 minuta na 35 °C, reakcija je prekinuta dodatkom 2,5 ml 96% etanola, a posle toga su uzorci iz reakcione smeše (20 μ l) i podvrgavani HPLC analizi.

4.4.6. Uticaj organskih rastvarača na reakciju modifikacije kvercetina

Pored ispitivanja uticaja temperature, pH vrednosti i koncentracije svih supstrata u reakciji modifikacije kvercetina sa cisteinom pomoću HRP, u okviru optimizacije pomenute reakcije ispitivan je i uticaj prisustva organskih rastvarača (etanola, metanola i DMSO). Imajući u vidu slabu rastvorljivost kvercetina u vodenim rastvorima (oko 2,15 mg/L) od organskih rastvarača se očekuje da svojim prisustvom povećaju rastvorljivost kvercetina u reakcionoj smeši jer je na osnovu literaturnih podataka poznato da je na primer rastvorljivost kvercetina na 20 °C u etanolu oko 2, a u dimetilformamidu i DMSO približno 30 mg/ml (Chebil i sar., 2007; Razmara i sar., 2010). Izvođenje reakcije modifikacije kvercetina u prisustvu organskih rastvarača je rađeno na način koji je opisan u poglavlju 3.3., s tim što je umesto dela vode u reakcionu smešu dodavana određena količina organskog rastvarača.

Pre početka ispitivanja uticaja prisustva organskih rastvarača u svojstvu posrednika za bolju rastvorljivost kvercetina, ispitan je njihov uticaj na aktivnost HRP. Uticaj sva tri organska rastvarača na aktivnost HRP ispitivan je u koncentracijama od 5, 10 i 20% i prikazan je na slici 4.17.

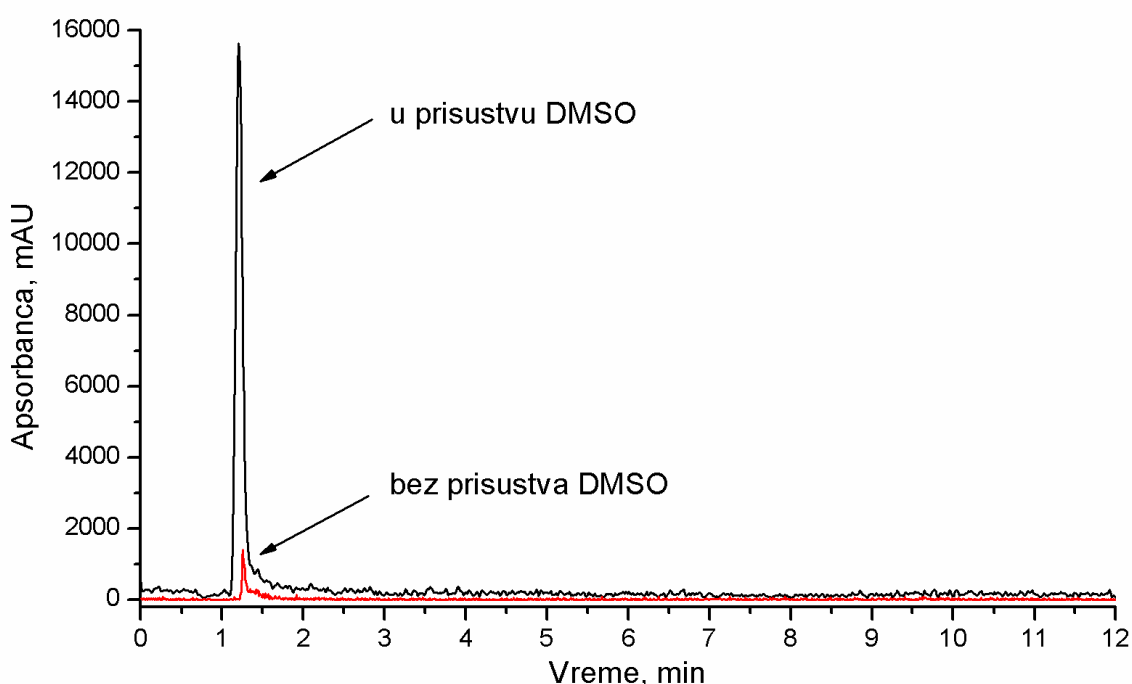


Slika 4.17 Zaostala aktivnost HRP u organskim rastvaračima. Aktivnost HRP u reakcionoj smeši kada nije bilo organskih rastvarača bila je 0,258 U/ml.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su svi organski rastvarači u određenoj meri pokazali inaktivirajuće delovanje na HRP. Međutim, od ispitivanih rastvarača najmanji stepen inaktivacije na HRP pokazao je DMSO, i to u koncentraciji od 5%, zbog čega je i odabran u datoj koncentraciji za dalja ispitivanja. Prisustvo DMSO u koncentraciji od 5% u reakcionoj smeši omogućilo je da se koncentracija kvercetina poveća na 1 mM, što je oko 12,5 puta više u odnosu na to kada DMSO nije bio prisutan. U skladu sa koncentracijom kvercetina i na osnovu dobijenih optimalnih vrednosti ispitivanih parametara za reakciju modifikacije kvercetina, podešena je i koncentracija ostalih učesnika u reakciji.

Na slici 4.18 prikazani su dobijeni hromatogrami enzimske reakcije u prisustvu i odsustvu odabranog organskog rastvarača (5% DMSO) u reakcionoj smeši. Dobijeni rezultati pokazuju da je količina dobijenog cisteinil-kvercetinskog adukta u slučaju prisustva 5% DMSO znatno veća, što je očekivano s obzirom da je početna koncentracija kvercetina bila oko 12,5 veća u odnosu na standardne reakcione smeše. Poređenjem dobijenih površina ispod pika može se zaključiti da je količina stvorenog cisteinil-kvercetinskog adukta oko 9,5 puta veća u odnosu na to kada 5% DMSO nije bio prisutan. Ukoliko se uzme u obzir da je početna koncentracija kvercetina u reakcionoj smeši približno 12,5 puta veća u odnosu na standardnu reakcionu smešu (kada 5% DMSO nije bio prisutan), a dobijena količina cisteinil-

kvercetinuskog adukta 9,5 puta veća, može se zaključiti da je izreagovala količina kvercetina oko 76%. Na osnovu ovako dobijenog rezultata, početnih količina kvercetina (1 mM) i L-cisteina (1,85 mM) u reakcionoj smeši i činjenice da je odnos reagovanja kvercetina i L-cisteina 1:1 (poglavlje 4.2.), može se očekivati da u reakcionoj smeši zapremine 5 ml stvorena količina modifikovanog kvercetina iznosi oko 1,35 mg, dok bi u reakcionoj zapremini od 100 ml stvorena količina modifikovanog kvercetina bila 27 mg. Sa druge strane, pored povećanja količine stvorenog modifikovanog kvercetina može se zaključiti da prisustvo 5% DMSO značajno povećava i ekonomičnost samog procesa što je od izuzetnog značaja ukoliko bi se modifikovani kvercetin proizvodio u većim količinama.



Slika 4.18 UV-VIS hromatogram nastalog proizvoda u reakciji kvercetina sa cisteinom u prisustvu DMSO u odnosu na reakciju kada organski rastvarač nije bio prisutan, snimljen na 295 nm.

4.5. Imobilizacija HRP preko hidrofobnih interakcija

Imajući u vidu da se proces imobilizacije sastoji u prevođenju enzima u oblik koji je nerastvoran u vodi, što iz više razloga ima veliki praktični značaj, kao i činjenicu da se procesom imobilizacije enzima povećava i stabilnost enzima, što je takođe od izuzetnog značaja za praktičnu primenu enzima, ispitivan je proces imobilizacije HRP. Iako postoji više metoda za imobilizaciju HRP, u ispitivanjima od strane Di Risi-a i Yan-a (2009), pokazano je da je imobilizacija HRP pomoću hidrofobnih interakcija bila znatno efikasnija od drugih

vidova imobilizacije. Ovakav rezultat je bio glavni razlog zbog koga je u odnosu na druge metode data prednost imobilizaciji pomoću hidrofobnih interakcija.

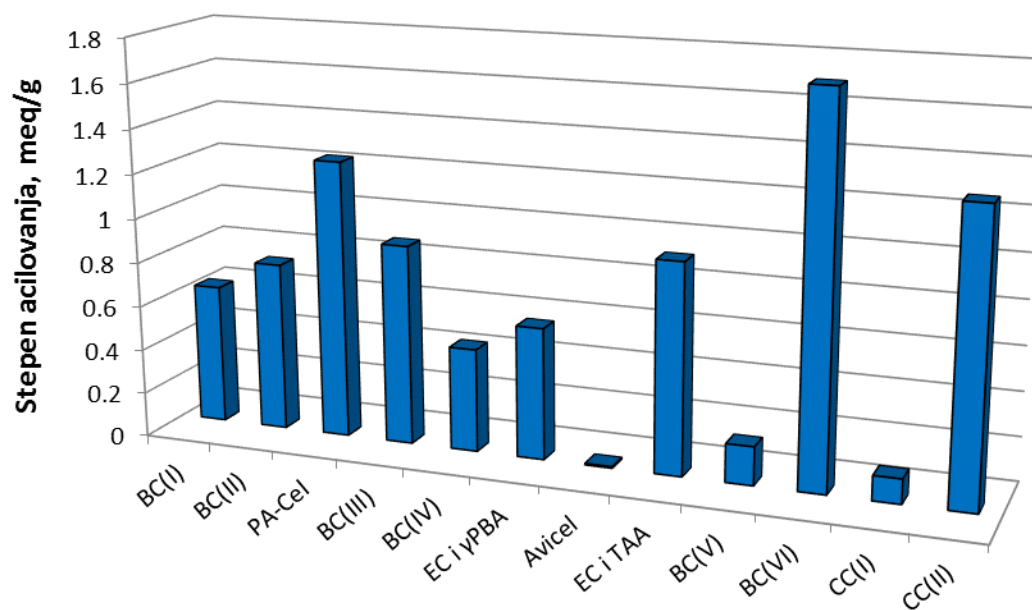
Proces imobilizacije enzima je rađen na način koji je opisan u poglavlju 3.9. U grupi od ukupno 12 nosača, 11 je sintetisano po metodi opisanoj u poglavlju 3.7., dok je nemodifikovana mikrokristalična celuloza (Avicel) dobijena od firme Selectchemie AG. Zürich. Među sintetisanim nosačima bilo je nosača tipa benzoil celuloze (6), cinamoil celuloze (2), fenoksiacetil celuloza (1), estar celuloze i γ -fenil buterne kiseline (1), i estar celuloze i timol sirćetne kiseline (1).

Pre početka imobilizacije ispitivan je stepen acilovanja svih nosača i dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.19. Kao standard za određivanje stepena acilovanja korišćen je rastvor etilbenzoata (slika 4.20), a metoda po kojoj je određivan stepen acilovanja celuloze opisana je u poglavlju 3.8.

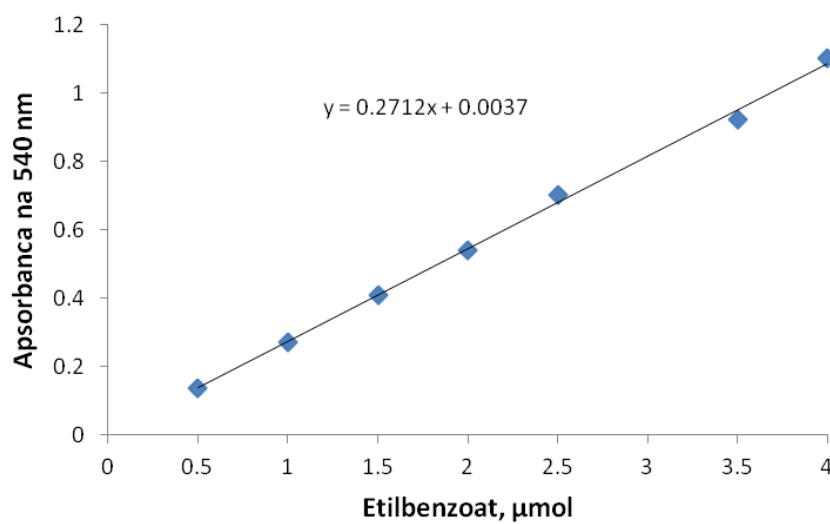
Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da je stepen acilovanja najveći kod nosača BC(VI), PA-Cel-a, CC(II) i BC(III), a među nosačima sa najmanjim stepenom acilovanja nalaze se Avicel, BC (V) i CC (I).

Imajući u vidu činjenicu da je tokom i nakon procesa imobilizacije enzima potrebno sačuvati aktivnost enzima u što većoj meri, ispitivan je i uticaj samih nosača na aktivnost HRP. Određivanje aktivnosti imobilisane HRP je rađeno po metodi opisanoj u poglavlju 3.11. Rezultati promene apsorbance tokom vremena u reakcijama ispitivanja aktivnosti HRP u prisustvu i odsustvu nosača za imobilizaciju, prikazani su na slikama 4.21 i 4.22, respektivno.

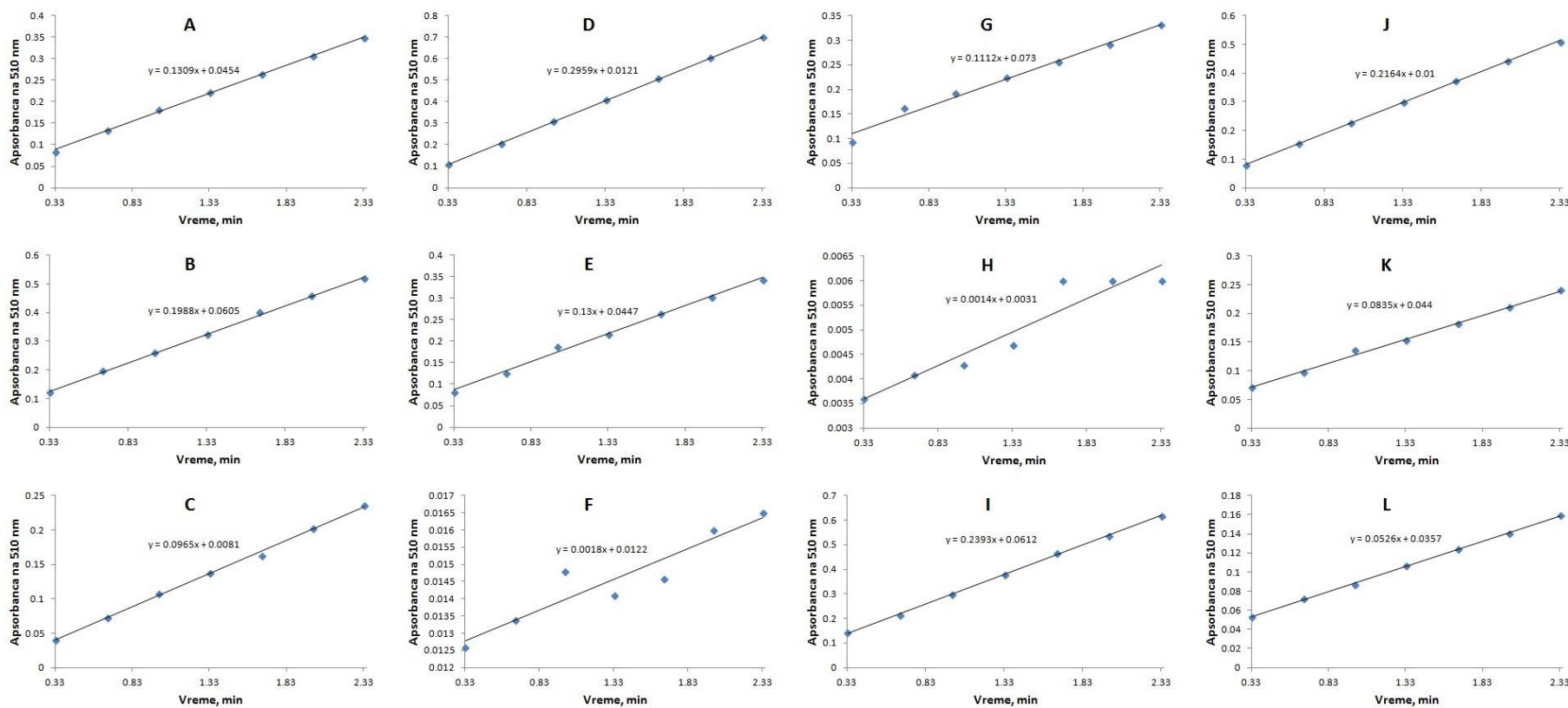
Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima za aktivnost čiste HRP u odsustvu nosača, može se zaključiti da su svi nosači pokazali određeni stepen inaktivacionog delovanja na HRP (slika 4.24). Najmanji stepen inaktivacionog delovanja na HRP su pokazali nosači BC(III), BC(V) i BC(VI), dok su najveći stepen inaktivacije pokazali nosači tipa estra (estar celuloze i γ -fenil buterne kiseline i estar celuloze i timol sirćetne kiseline).



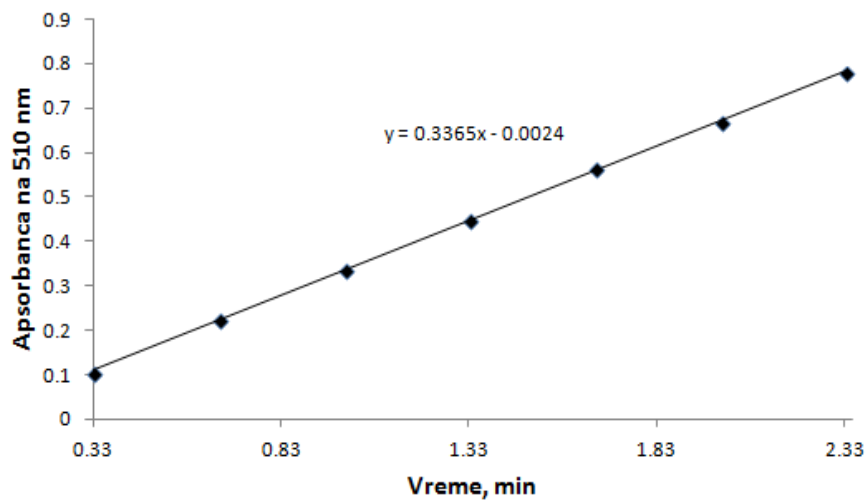
Slika 4.19 Stepen acilovanja korišćenih nosača za imobilizaciju.



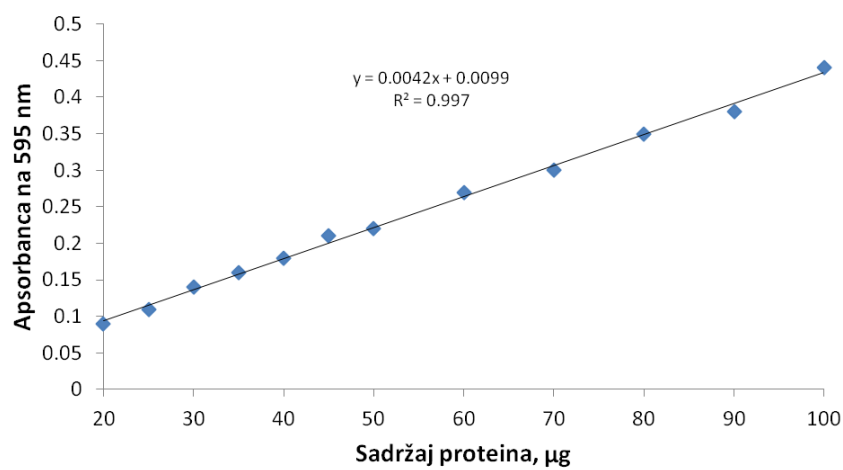
Slika 4.20 Standardna prava za određivanje stepena acilovanja. Kao standard je korišćen etilbenzoat.



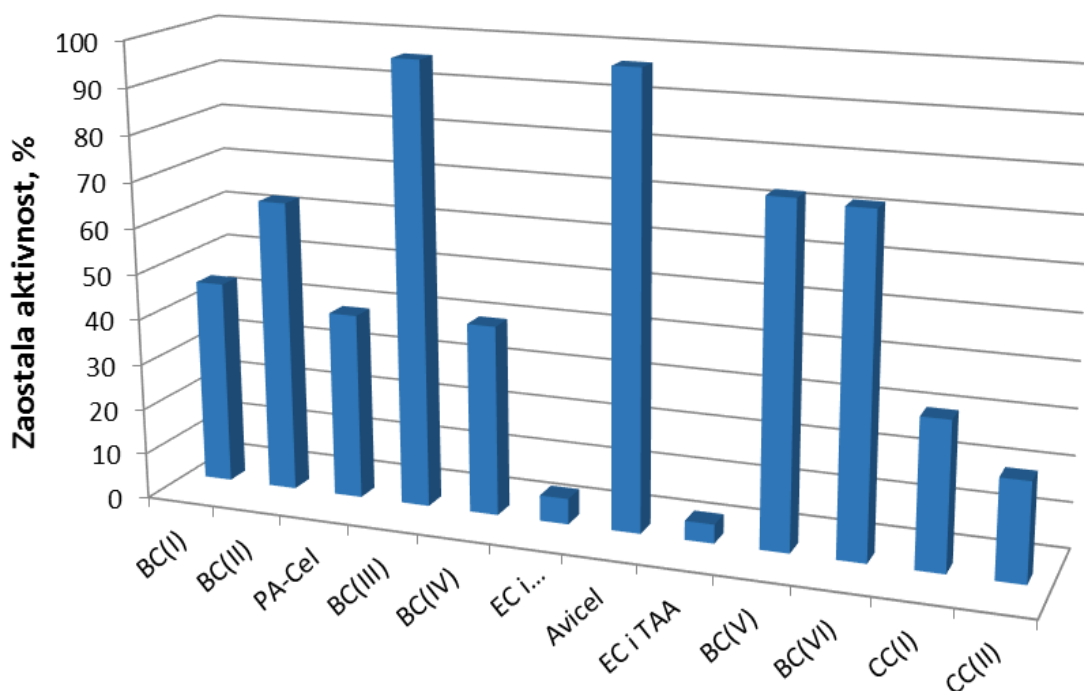
Slika 4.21 Ispitivanje uticaja različitih nosača na aktivnost HRP. A–BC(I); B–BC(II); C–PA-Cel; D–BC(III); E–BC(IV); F–Estar celuloze i γ -fenil buterne kiseline; G–Avicel; H–Estar celuloze i timol sirćetne kiseline; I–BC(V); J–BC(VI); K–CC(I); L–CC(II).



Slika 4.22 Promena apsorpcije na 510 nm u toku određivanja aktivnosti HRP na 25 °C.



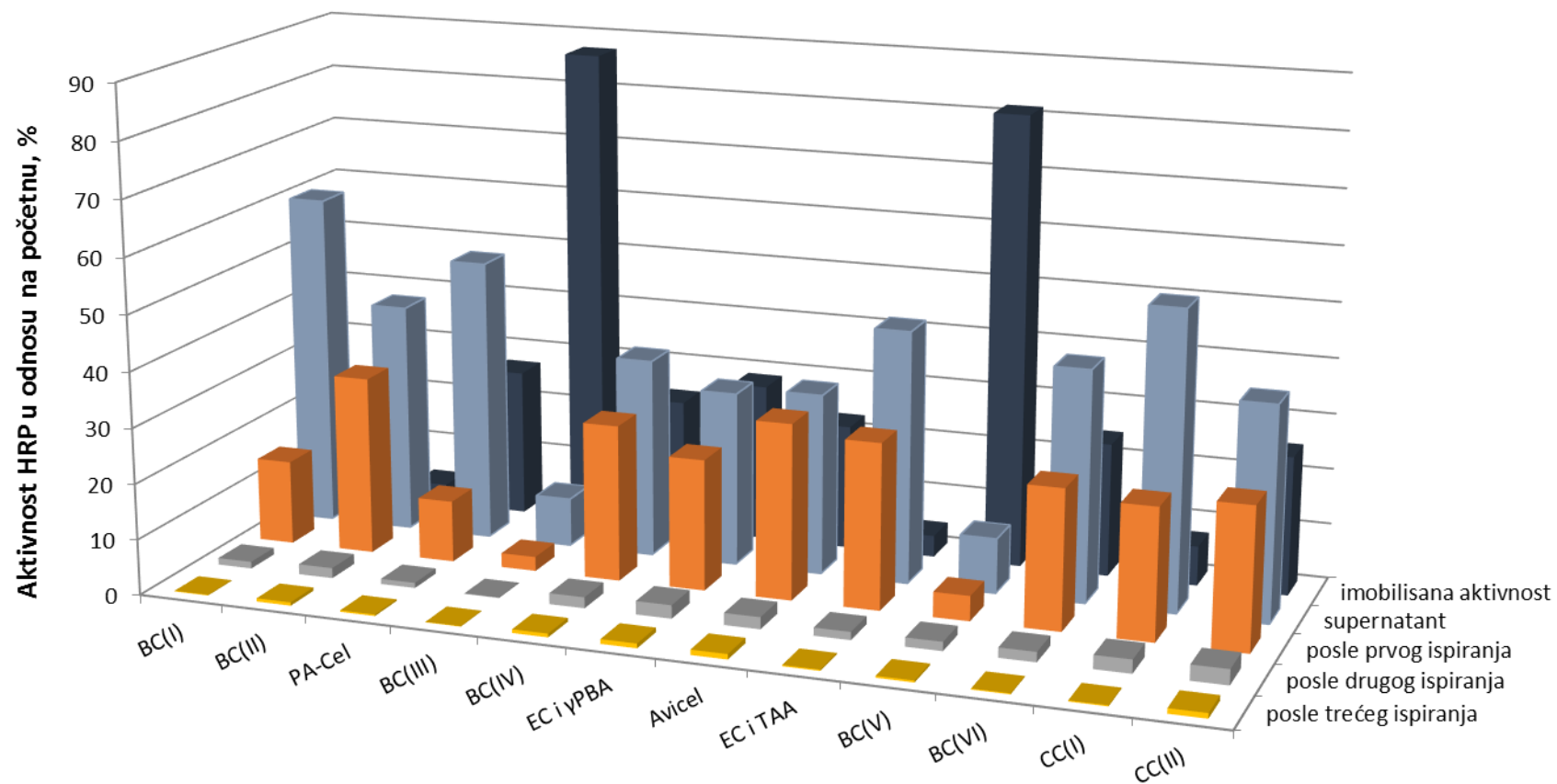
Slika 4.23 Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja proteina. Kao standard je korišćen rastvor BSA.



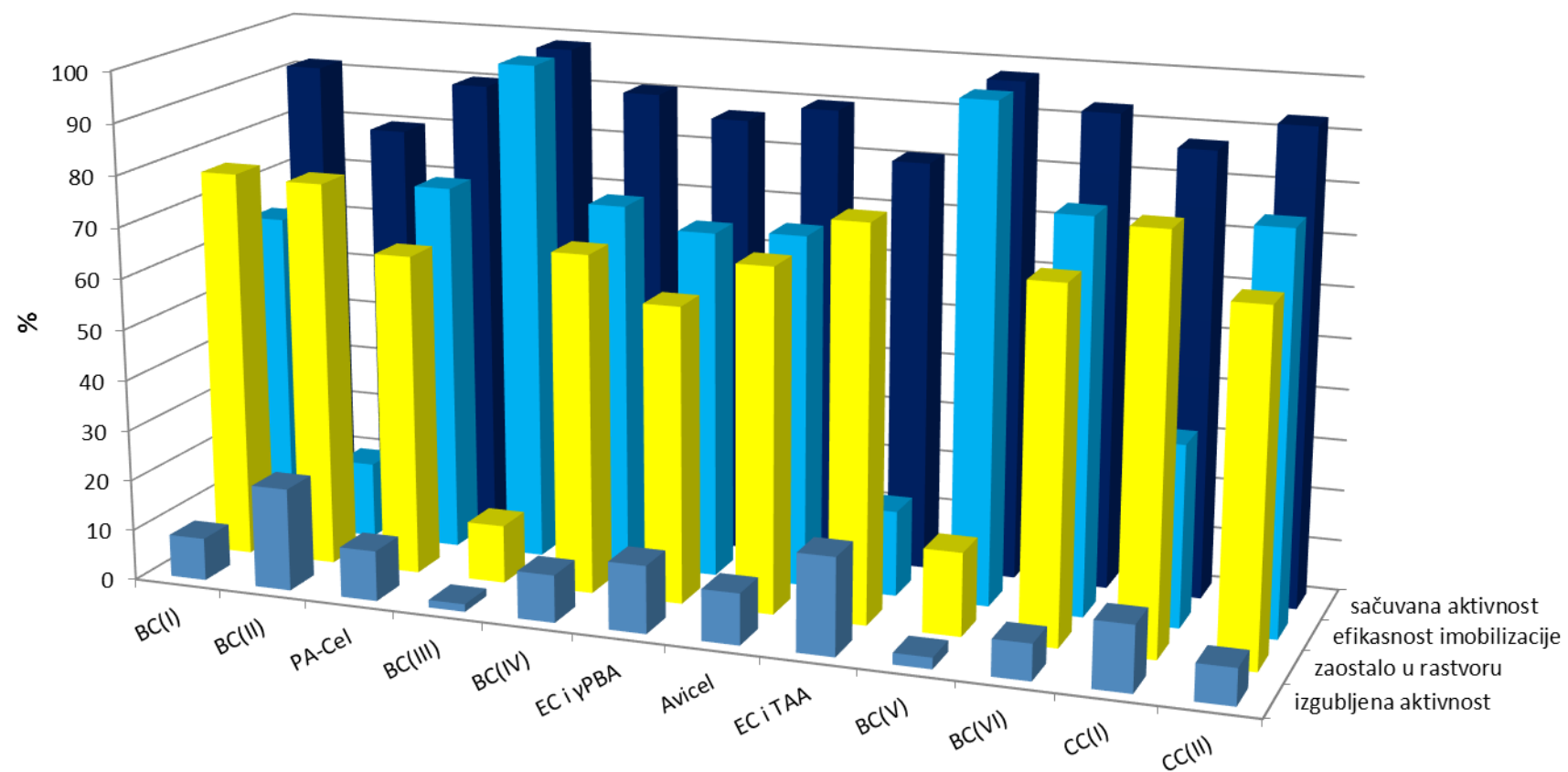
Slika 4.24 Zaostala aktivnost HRP nakon delovanja različitih nosača za imobilizaciju na aktivnost HRP.

Rezultati ispitivanja aktivnosti HRP nakon imobilizacije na sobnoj temperaturi (25 °C) prikazani su na slici 4.25. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je HRP pokazala najveću aktivnost nakon imobilizacije na nosačima BC(III) i BC(V). Dobijeni rezultati pokazuju dobro slaganje sa prethodnim rezultatima o ispitivanju uticaja različitih nosača na aktivnost HRP, jer su upravo nosači BC(III) i BC(V) pokazali najmanji inhibicioni (i/ili denaturacioni) efekat na HRP. Pored toga, parametri imobilizacije kao što su efikasnost imobilizacije i ukupna sačuvana aktivnost, takođe pokazuju dobro slaganje sa rezultatima dobijenim za imobilizaciju HRP (slika 4.26). Najveća efikasnost imobilizacije i ukupna sačuvana aktivnost HRP u toku procesa imobilizacije je ostvarena upravo imobilizacijom na nosačima BC(III) i BC(V).

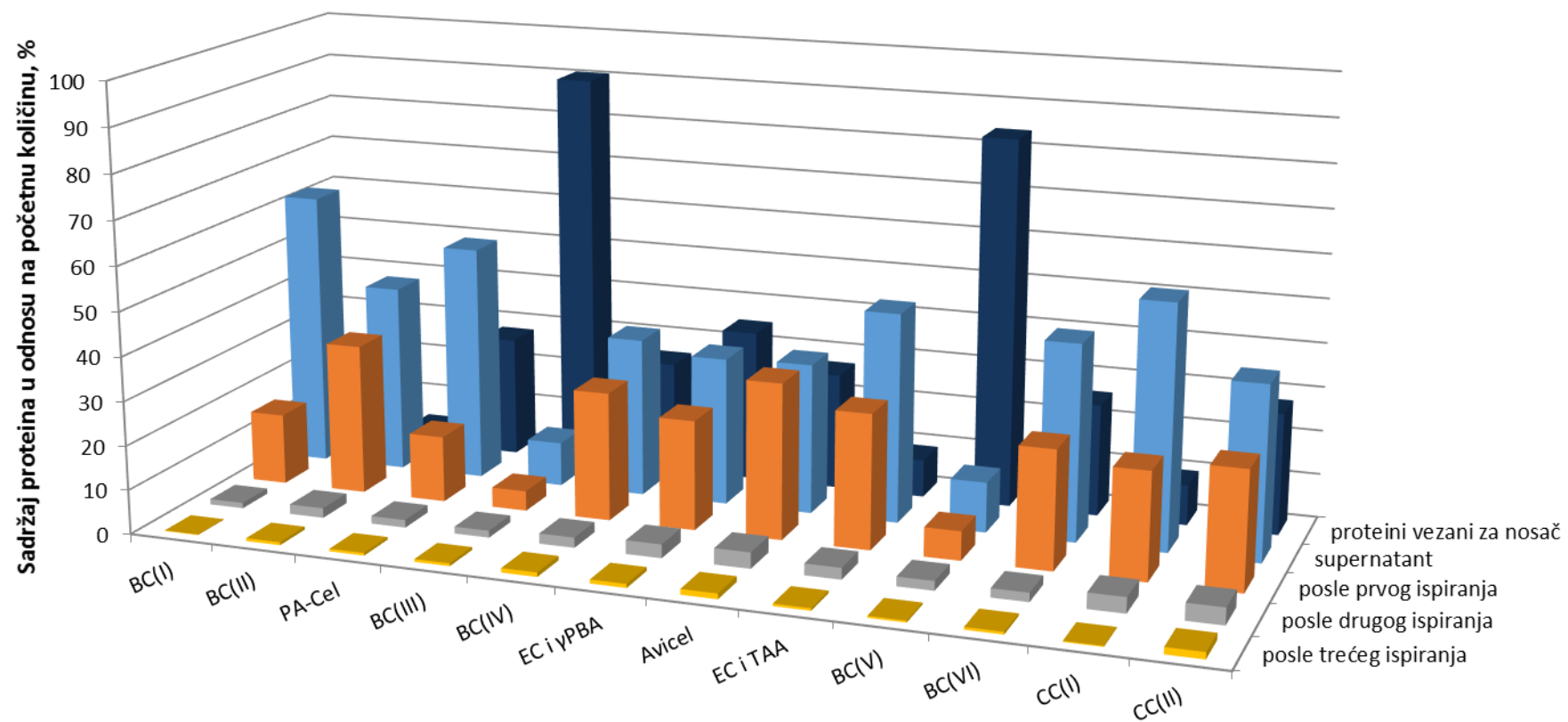
Na osnovu ovako dobijenih rezultata HRP imobilisana na nosačima BC(III) i BC(V) je odabrana za izvođenje reakcije modifikacije kvercetina sa L-cisteinom, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.28.



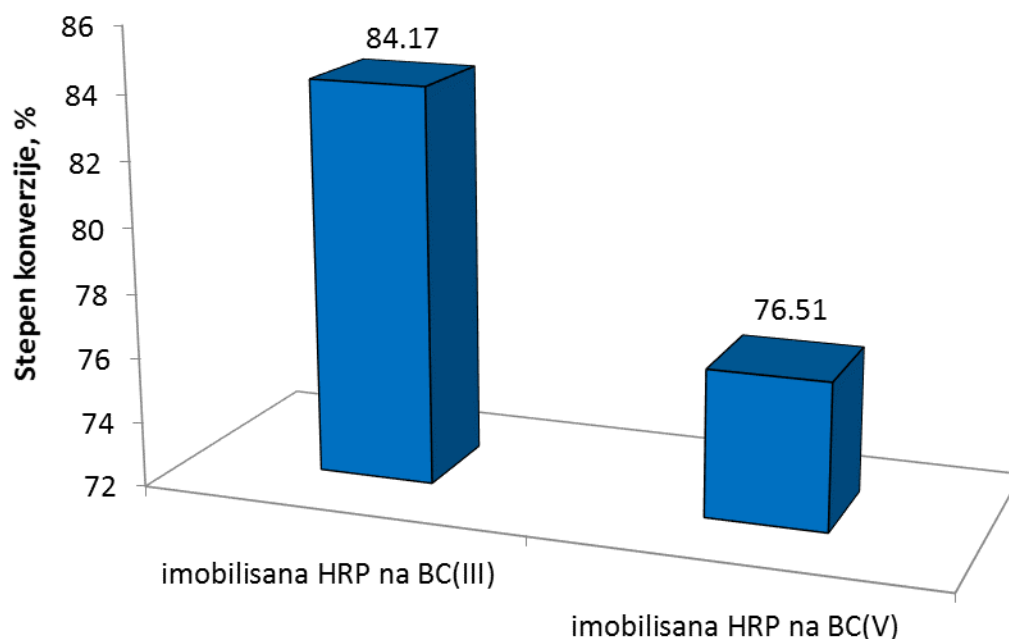
Slika 4.25 Rezultati merenja aktivnosti HRP na 25 °C u toku procesa imobilizacije na različitim hidrofobnim nosačima.



Slika 4.26 Parametri imobilizacije HRP na različitim hidrofobnim nosačima.



Slika 4.27 Bilans proteina u toku imobilizacije HRP na hidrofobnim nosačima.



Slika 4.28 Količina stvorenog cisteinil-kvercetinog adukta kada je korišćena imobilisana HRP u odnosu na HRP u rastvoru.

Poređenjem površina ispod pika može se zaključiti da je u reakciji modifikacije kvercetina sa L-cisteinom imobilisana HRP pokazala visoku efikasnost u poređenju sa neimobilisanom. Imajući u vidu činjenicu da je aktivnost imobilisane HRP na nosačima BC(III) i BC(V) bila 87,07 i 81,4% od aktivnosti neimobilisane HRP, dobijeni rezultati ukazuju na to da je imobilisana HRP pokazala visok stepen konverzije. Ukoliko se uzmu u obzir i prednosti koje donosi imobilisana HRP (višestruka upotreba, reakcija se može lako kontrolisati i zaustaviti jednostavnim izdvajanjem biokatalizatora, povećana stabilnost biokatalizatora, povećana produktivnost, mogućnost automatizacije, reakciona smeša se ne kontaminira biokatalizatorom), može se zaključiti da imobilisana u odnosu na slobodnu HRP ima određenu prednost za upotrebu u reakciji modifikacije kvercetina sa cisteinom.

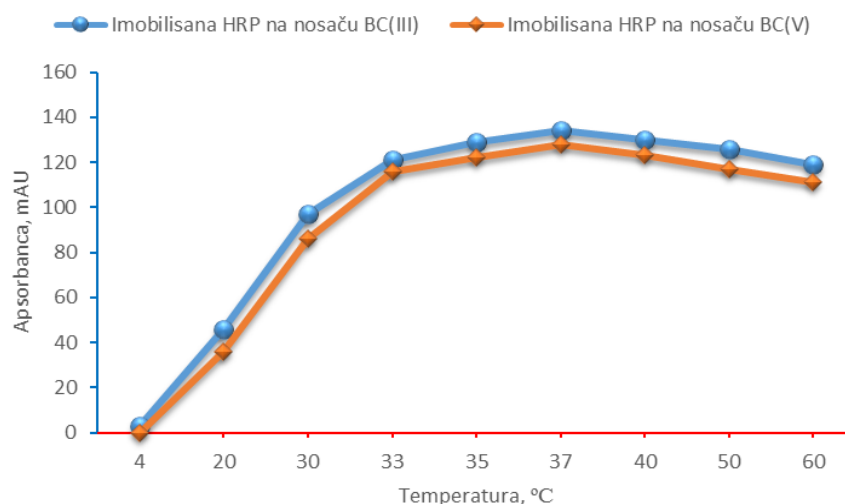
4.5.1. Optimizacija reakcije modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP

Pored ispitivanja uticaja temperature, pH vrednosti, koncentracije kvercetina, L-cisteina i vodonik peroksida na reakciju modifikacije kvercetina sa cisteinom pomoću slobodne HRP, u okviru optimizacije pomenute reakcije ispitivan je i uticaj istih parametara ali umesto slobodne korišćena je imobilisana HRP. Za optimizaciju reakcije modifikacije korišćena je HRP imobilisana na nosačima BC(III) i BC(V), jer su rezultati iz prethodnog

poglavlja pokazali da je na datim nosačima HRP bila najaktivnija. Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja temperature, pH, koncentracije kvercetina, L-cisteina i vodonik peroksida na reakciju modifikacije kvercetina sa cisteinom pomoću imobilisane HRP prikazani su na slikama 4.29–33, respektivno.

4.5.1.1. Uticaj temperature na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP

Na slici 4.29 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja temperature na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja uticaja temperature na reakciju modifikacije kvercetina sa cisteinom pomoću imobilisane HRP, može se zaključiti da je kod obe ispitivane reakcije optimalna temperatura bila 37 °C. Sa povećanjem temperature u opsegu od 4 do 37 °C dolazi do povećanja količine stvorenih cisteinil-kvercetinskih proizvoda, ali nakon toga u opsegu od 37 do 60 °C dolazi do postepenog smanjenja količine stvorenih cisteinil-kvercetinskih adukata. Poređenjem stvorenih količina cisteinil-kvercetinskih proizvoda, sa količinom kada je za reakciju modifikacije kvercetina korišćena slobodna HRP, može se zaključiti da je količina stvorenih proizvoda u reakcijama sa imobilisanom HRP bila manja. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da je početna aktivnost obe imobilisane HRP bila manja u poređenju sa aktivnošću imobilisane HRP. Međutim, iako je količina stvorenih modifikovanih proizvoda pri optimalnoj temperaturi bila manja, na višim temperaturama (50 i 60 °C) rezultat je drugačiji. Količina stvorenih cisteinil-kvercetinskih proizvoda pri većim temperaturama (50 i 60 °C), u slučaju kada je u reakciji modifikacije kvercetina korišćena imobilisana HRP je duplo veća u odnosu na slučaj kada je u reakciji korišćena slobodna HRP. Objašnjenje za ovakav rezultat leži u činjenici što je imobilisana HRP znatno stabilnija u odnosu na slobodnu HRP.

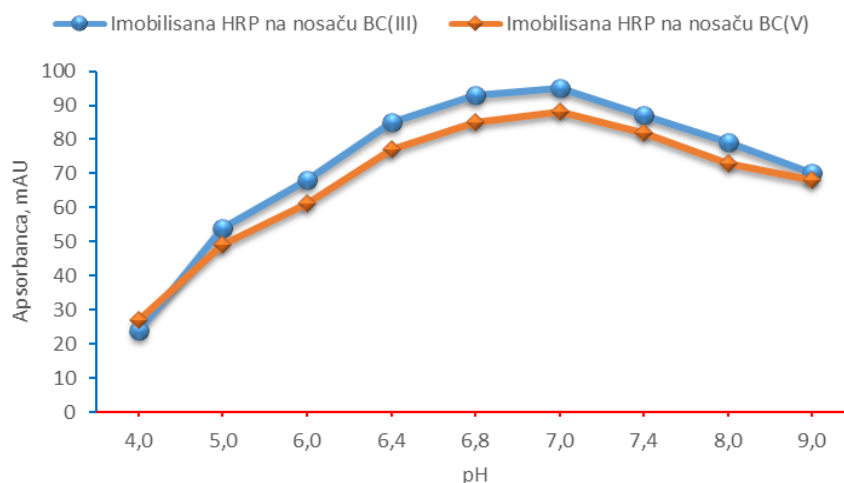


Slika 4.29 Rezultati ispitivanja uticaja temperature na reakciju modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću imobilisane HRP. Odmereno je 2500 μ l 100 mM fosfatnog pufera (pH 7,0), 2320 μ l destilovane vode, 50 μ l 20 mM L-cisteina, 40 μ l 10 mM kvercetina, 40 μ l imobilisane HRP i 50 μ l 10 mM vodonik peroksida. Po završetku inkubacije u trajanju od 10 minuta na temperaturama od 4, 20, 30, 33, 35, 37, 40, 50 i 60 °C, reakcija je zastavljena dodatkom 2,5 ml 96% etanola. Nakon toga uzimani su uzorci iz reakcione smeše (20 μ l) i podvrgavani HPLC analizi.

4.5.1.2. Uticaj pH na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP

Na slici 4.30 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja pH vrednosti na količinu stvorenih modifikovanih proizvoda kvercetina kada je u reakciji modifikacije kvercetina korišćena imobilisana HRP. Posmatranjem slike 4.30 može se zaključiti da sa povećanjem pH vrednosti u opsegu od 4,0 do 7,0 dolazi do povećanja količine stvorenih modifikovanih proizvoda kvercetina. Međutim, sa druge strane, sa daljim povećanjem pH vrednosti u opsegu od 7,0 do 9,0 dolazi do smanjenja količine stvorenih modifikovanih proizvoda kvercetina. Kao i u slučaju kada je ispitivana reakcija modifikacije kvercetina pomoću slobodne HRP objašnjenje za ovakav rezultat se može potražiti u činjenici da sa povećanjem pH rastvora do vrednosti 7,0, dolazi do povećanja količine stvaranja modifikovanih proizvoda jer je upravo u tom opsegu aktivnost HRP najveća. Korišćenjem količine stvorenih modifikovanih proizvoda kao kriterijuma za odabir optimalne pH vrednosti, može se zaključiti da je najveća količina modifikovanog kvercetina postignuta pri pH vrednosti od 7,0. Dobijena količina modifikovanih proizvoda u slučaju kada je korišćena imobilisana HRP bila je manja u odnosu na slučaj kada je u reakciji korišćena slobodna HRP (poglavlje 4.4.). Ovakav rezultat je posledica manje aktivnosti imobilisane HRP što ide u prilog činjenici da je HRP najvećim

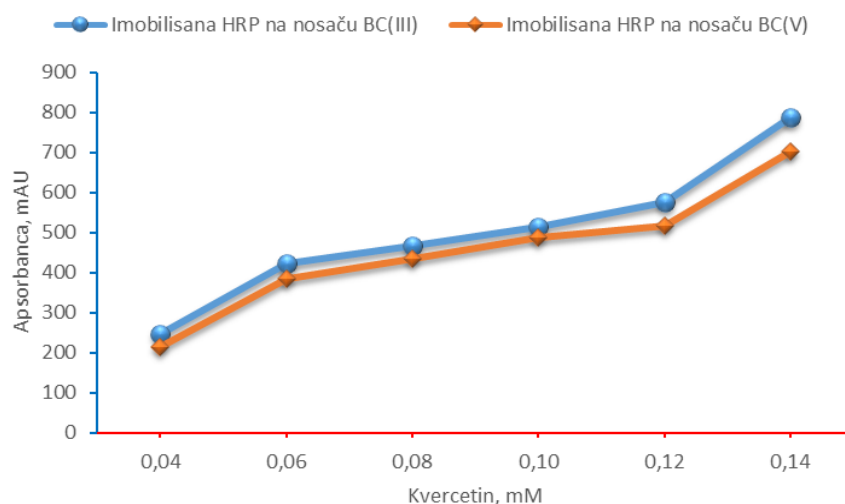
delom odgovorna za stvaranje modifikovanih proizvoda kvercetina. Sa druge strane, poređenjem dobijenih količina modifikovanih proizvoda, može se primetiti da je pri većim pH vrednostima veća količina modifikovanih proizvoda stvorena kada je za reakciju modifikacije kvercetina korišćena imobilisana HRP. Ovakav rezultat je verovatno posledica povećane stabilnosti imobilisane HRP pri većim pH vrednostima.



Slika 4.30 Rezultati ispitivanja uticaja pH vrednosti na reakciju enzimske modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću imobilisane HRP. Sastav reakcione smeše: 2500 μ l 100 mM fosfatnog pufera pH vrednosti 4, 5, 6, 6,4, 6,8, 7, 7,4, 8 i 9, 2320 μ l destilovane vode, 50 μ l 20 mM L-cisteina, 40 μ l 10 mM kvercetina, 40 μ l imobilisane HRP i 50 μ l 10 mM vodonik peroksida. Po završetku inkubacije od 10 minuta na 37 °C, reakcija je prekidana dodatkom 2,5 ml 96% etanola. Nakon prekidanja reakcije uzimani su uzorci iz reakcione smeše (20 μ l) i podvrgavani HPLC analizi.

4.5.1.3. Uticaj kvercetina na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP

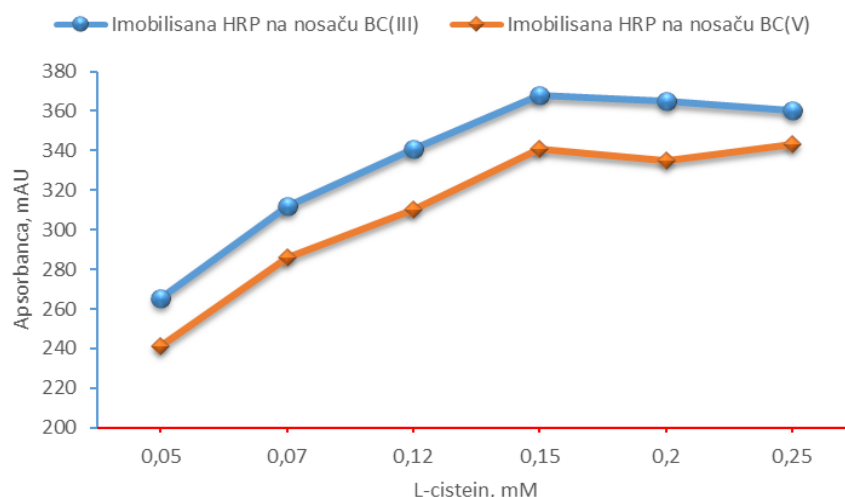
Na slici 4.31 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja koncentracije kvercetina na količinu stvorenog modifikovanog proizvoda kvercetina, kada je za modifikaciju korišćena imobilisana HRP. Rezultati ispitivanja pokazuju da, kao i u slučaju kada je u reakciji korišćena neimobilisana HRP, sa povećanjem količine kvercetina u reakcionoj smeši raste količina stvorenih cisteinil-kvercetinskih adukata. Poređenjem količine stvorenih cisteinil-kvercetinskih adukata, može se zaključiti da je u odnosu na neimobilisanu HRP (poglavlje 4.4.) količina stvorenih proizvoda manja, kada je u reakciji korišćena imobilisana HRP. Objašnjenje za dobijene rezultate treba potražiti u činjenici da je aktivnost imobilisane HRP na početku reakcije bila manja u odnosu na slobodnu HRP, što je verovatno dovelo do stvaranja manje količine cisteinil-kvercetinskih adukata.



Slika 4.31 Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije kvercetina na reakciju modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću imobilisane HRP snimljeni na 295 nm. U epruvetama je odmereno 2500 μ l 100 mM fosfatnog pufera (pH 7,0), 50 μ l 20 mM rastvora L-cisteina, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 μ l 10 mM rastvora kvercetina, 40 μ l imobilisane HRP i 50 μ l 10 mM rastvora vodonik peroksida. Po završetku inkubacije u trajanju od 10 minuta na 37 °C, reakcija je prekidana dodatkom 2,5 ml 96% etanola. Posle prekidanja reakcije uzimano je 20 μ l iz reakcione smeše i podvrgavano HPLC analizi.

4.5.1.4. Uticaj L-cisteina na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP

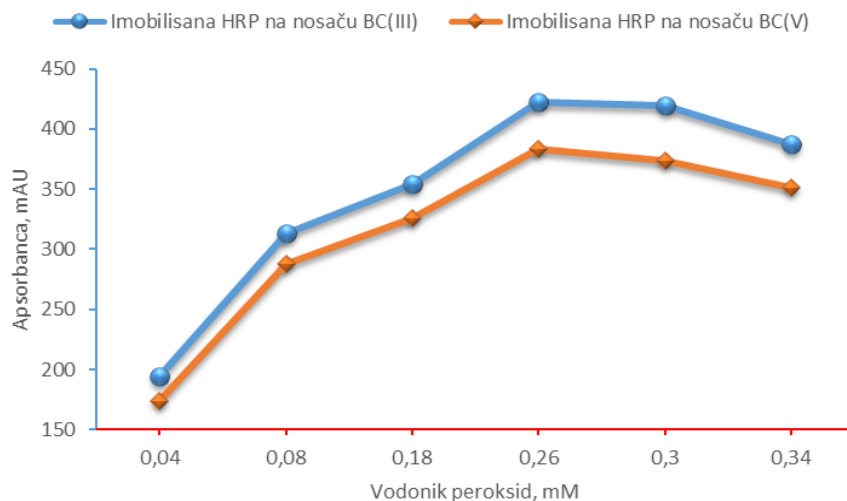
Rezultati ispitivanja uticaja L-cisteina na količinu stvorenih proizvoda kada je u reakciji modifikacije korišćena imobilisana HRP prikazani su na slici 4.32. Posmatranjem dobijenih rezultata može se primetiti da u opsegu od 0,05 do 0,15 mM dolazi do povećanja količine modifikovnog kvercetina, dok je sa daljim povećanjem količine L-cisteina (u opsegu od 0,15 do 0,25 mM) primetan pad količine stvorenog proizvoda. Kao i u prethodnim slučajevima kada je za proces modifikacije kvercetina korišćena imobilisana HRP dobijena količina modifikovanog proizvoda je bila manja za oko 20% u odnosu na to kada je u istoj reakciji korišćena neimobilisana HRP. Ovakav rezultat je verovatno takođe posledica manje aktivnosti imobilisane HRP na početku reakcije.



Slika 4.32 Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije L-cisteina na reakciju modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću imobilisane HRP. Sastav reakcione smeše: 2500 μ l 100 mM fosfatnog pufera (pH 7,0), 70 μ l 10 mM kvercetina, 12, 17, 30, 37, 50 i 63 μ l 20 mM L-cisteina, 40 μ l imobilisane HRP i 50 μ l 10 mM vodonik peroksida. Nakon inkubacije od 10 minuta na 37 °C, reakcija je prekidana dodatkom 2,5 ml 96% etanola. Posle prekidanja reakcije uzimani su uzorci iz reakcione smeše (20 μ l) i podvrgavani HPLC analizi.

4.5.1.5. Uticaj vodonik peroksida na reakciju modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP

Na slici 4.33 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodonik peroksida na količinu stvorenog modifikovanog proizvoda kvercetina, kada je u reakciji korišćena imobilisana HRP. U prvom delu sa povećanjem količine vodonik peroksida može se primetiti da raste količina stvorenog modifikovanog proizvoda kvercetina i dostiže svoj maksimum pri koncentraciji vodonik peroksida od 0,3 mM. Međutim, sa daljim povećanjem količine vodonik peroksida (preko 0,3 mM), količina stvorenog modifikovanog kvercetina u reakcionoj smeši se smanjuje. Poređenjem sa rezultatima dobijenim iz ispitivanja uticaja vodonik peroksida kada je u reakciji modifikacije korišćena slobodna HRP, može se primetiti da je maksimalna količina stvorenih modifikovanih proizvoda kvercetina bila veća kada je u reakciji korišćena HRP imobilisana na nosaču BC(III). Iako je poznato da vodonik peroksid može da ima i inaktivirajuće delovanje na HRP, dobijeni rezultat je verovatno drugačiji u odnosu na slučaj kada je u reakciji modifikacije korišćena slobodna HRP, zbog toga što je imobilisana HRP stabilnija u odnosu na slobodnu HRP.



Slika 4.33 Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije vodonik peroksida na reakciju modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću imobilisane HRP. Reakciona smeša: 2500 μ l 100 mM fosfatnog pufera (pH 7,0), 50 μ l 20 mM L-cisteina, 70 μ l 10 mM kvercetina, 40 μ l imobilisane HRP i 20, 40, 90, 110, 130, 150 i 170 μ l 10 mM vodonik peroksida. Po završetku inkubacije (10 minuta) na 37 °C, reakcija je prekidana sa 2,5 ml 96% etanola. Nakon prekidanja reakcije uzorci iz reakcione smeše (20 μ l) su podvrgavani HPLC analizi.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu teorijskih razmatranja i rezultata eksperimentalnih istraživanja u procesu enzimske modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP, predstavljenih u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Pod dejstvom HRP dolazi do oksidacije kvercetina i do stvaranja preko 10 različitih proizvoda oksidacije, od kojih je 7 uspešno identifikovano primenom UHPLC-DAD-HESI-MS/MS metode. Među identifikovanim jedinjenima nalaze se hinoni kvercetina i njegovi derivati, floroglucinol karboksilna kiselina, protokatehuinska kiselina, heterodimer kvercetina i njegovi derivati.
2. Proces oksidacije kvercetina pomoću HRP u prisustvu L-cisteina dovodi do stvaranja dva nova jedinjenja za koja je primenom UHPLC-DAD-HESI-MS/MS metode utvrđeno da predstavljaju cisteinil-kvercetinske adukte. Na osnovu dobijenih rezultata LC-MS analize i teorijskih razmatranja može se pretpostaviti da se adicija L-cisteina dešava u pozicijama 6 i 8 u prstenu A kvercetina. Takođe, utvrđeno je da L-cistein ima sposobnost da sakuplja prethodno stvorene oksidacione proizvode kvercetina (ROS), što može biti od izuzetnog značaja ukoliko se uzmu u obzir neželjeni efekti koji nastaju kao rezultat dejstva ROS-a. Pored toga, važno je napomeniti da je reakcija oksidacije kvercetina u prisustvu L-cisteina bez prisustva HRP ispitivana, ali adukti kvercetina sa cisteinom nisu detektovani, što znači da je HRP odgovorna za formiranje cisteinil-kvercetin adukta.
3. Rezultati ispitivanja kinetičkog mehanizma reakcije modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP su pokazali da se proces modifikacije kvercetina odvija po usaglašenom kinetičkom mehanizmu. Na osnovu teorijskih razmatranja i dobijenih rezultata može se zaključiti da HRP najpre reaguje sa vodonik peroksidom što dovodi do stvaranja aktivnog intermedijernog oblika HRP. Nakon toga, aktivni intermedijerni oblik HRP prvo reaguje sa kvercetinom, a zatim i sa L-cisteinom pri čemu u reakciji sa kvercetinom prvo dolazi do stvaranja semihinona koji kasnije prelaze u hinonske derivate I, II i III, dok u reakciji sa L-cisteinom dolazi do stvaranja tiolnih radikala. Nakon toga, dolazi do reakcije između tiolnih radikala i hinonskih derivata kvercetina i stvaranja intermedijernog kompleksa. Reakcijom atoma vodonika sa intermedijernim kompleksom i izomerizacijom dolazi do stvaranja 8 i 6-cisteinil-kvercetinskih adukata.

4. Optimizacija reakcije modifikacije kvercetina sa L-cisteinom pomoću HRP je pokazala da se pri temperaturi od 35 °C i pH 6,8 dobija najveća količina modifikovanih proizvoda kvercetina. Pored toga, rezultati ispitivanja uticaja koncentracije kvercetina i L-cisteina su pokazali da je prilikom izvođenja reakcije potrebno voditi računa da oba supstrata budu u odnosu približno 1:1. Sa druge strane, rezultati ispitivanja uticaja vodonik peroksida su pokazali da je najveća količina modifikovanih proizvoda kvercetina stvorena pri koncentraciji od 0,26 mM, dok je pri većoj koncentraciji vodonik peroksida prisutan njegov inhibirajući efekat na HRP.
5. Ispitivanja uticaja organskih rastvarača prisutnih u reakcionoj smeši su pokazala da je u reakcionoj smeši u prisustvu 5% DMSO moguće rastvoriti čak oko 12,5 puta veću količinu kvercetina u odnosu na reakcionu smešu bez prisustva organskih rastvarača. Dobijeni rezultati su pokazali da se rastvaranjem kvercetina u prisustvu 5% DMSO dobija oko 9,5 puta veća količina cisteinil-kvercetinskog adukta. Uzimajući u obzir činjenicu da je odnos reagovanja kvercetina i L-cisteina 1:1, može se zaključiti da je izreagovala količina kvercetina oko 76%. U reakcionoj smeši zapremine 100 ml očekivana količina stvaranja modifikovanog kvercetina u prisustvu 5% DMSO je oko 27 mg.
6. U grupi od 12 sintetisanih nosača, imobilizacija HRP preko hidrofobnih interakcija je bila najuspešnija na nosačima tipa benzoil celuloze, konkretno na nosačima sa oznakom BC(III) i BC(V). Rezultati optimizacije reakcije modifikacije kvercetina pomoću imobilisane HRP su pokazali nešto manju količinu modifikovanih proizvoda kvercetina pri optimalnim vrednostima u odnosu na slučaj kada je korišćena slobodna HRP, što je verovatno rezultat manje početne aktivnosti imobilisane HRP. Sa druge strane, pri nešto drastičnijim uslovima količina stvorenih modifikovanih proizvoda kvercetina kada je u reakciji korišćena imobilisana HRP je bila veća u odnosu na slučaj kada je u reakciji korišćena neimobilisana HRP, što je rezultat povećane stabilnosti imobilisane HRP.
7. Iako je količina stvorenih modifikovanih proizvoda bila nešto veća u slučaju kada je u reakciji modifikacije korišćena slobodna HRP, prednost ipak treba dati imobilisanoj HRP zbog niza pogodnosti koje ona sa sobom nosi. Dobijene optimalne vrednosti temperature, pH vrednosti, koncentracije kvercetina, L-

cisteina i vodonik peroksida za dobijanje cisteinil-kvercetinskog adukta su: 37 °C, 7, 0,14 mM, 0,15 mM i 0,26 mM, respektivno.

6. LITERATURA

- Abdel-Halim E.S., Al-Deyab S.S., Hydrogel from crosslinked polyacrylamide/guar gum graft copolymer for sorption of hexavalent chromium ion, *Carbohydr. Polym.*, 86, 1306–1312 (2011).
- Adamczak M., Krishna S.H., Strategies for Improving Enzymes for Efficient Biocatalysis, *Food Technol. Biotechnol.* 42(4), 251–264 (2004).
- An N., Zhou C.H., Zhuang X.Y., Tong D.S., Yu W.H., Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors, *Appl. Clay Sci.*, 114, 283–296 (2015).
- Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., Bladeren P.J.V., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M., Quenching of Quercetin Quinone/Quinone Methides by Different Thiolate Scavengers: Stability and Reversibility of Conjugate Formation, *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 822–831 (2003).
- Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., Bladeren P.J.V., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M., The Regioselectivity of Glutathione Adduct Formation with Flavonoid Quinone/Quinone Methides Is pH-Dependent, *Chem. Res. Toxicol.*, 15, 343–351 (2002).
- Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., van Der Woude H., van Zanden J., van Bladeren P.J., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M., Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular *in vitro* system, *FEBS Lett.*, 520, 30–34 (2002).
- Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M., Peroxidase-Catalyzed Formation of Quercetin Quinone Methide±Glutathione Adducts, *Arch. Biochem. Biophys.*, 378(2), 224–233 (2000).
- Barbosa O., Torres R., Ortiz C., Fernandez-Lafuente R., Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida Antarctica*, *Process Biochem.*, 47, 1220–1227 (2012).
- Barková K., Kinne M., Ullrich R., Hennig L., Fuchs A., Hofrichter M., Regioselective hydroxylation of diverse flavonoids by an aromatic peroxygenase, *Tetrahedron*, 67, 4874–4878 (2011).
- Barnes J.S., Schug K.A., Oxidative Degradation of Quercetin with Hydrogen Peroxide Using Continuous-Flow Kinetic Electrospray-Ion Trap-Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 4322–4331 (2014).

- Boersma M.G., Vervoort J., Szymusiak H., Lemanska K., Tyrakowska B., Cenas N., Segura-Aguilar J., Rietjens I.M.C.M., Regioselectivity and Reversibility of the Glutathione Conjugation of Quercetin Quinone Methide, *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 185–191 (2000).
- Bolton J.L., Pisha E., Zhang F., Qiu S., Role of Quinoids in Estrogen Carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.*, 11(10), 1113–1127 (1998).
- Bradford M.M, Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248–254 (1976).
- Chan T., Galati G., O'Brien P.J., Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones, *Chem-Biol. Interact.* 122, 15–25 (1999).
- Chebil L., Humeau C., Anthoni J., Dehez F., Engasser J., Ghoul M., Solubility of Flavonoids in Organic Solvents, *J. Chem. Eng. Data*, 52, 1552–1556 (2007).
- Chebil L., Humeau C., Falcimaigne A., Engasser J.M., Ghoul M., Enzymatic acylation of flavonoids, *Process Biochem.*, 41, 2237–2251 (2006).
- Chervakovsky E.M., Bolibrukh D.A., Baranovsky A.V., Vlasova T.M., Kurchenko V.P., Gilep A.A., Usanov S.A., Oxidative modification of quercetin by heme proteins, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 342, 459–464 (2006).
- Chung J.E., Kurisawa M., Tachibana Y., Uyama H., Kobayashi S., Enzymatic Synthesis and Antioxidant Property of Poly(allylamine)–Catechin Conjugate, *Chem. Lett.*, 32(7), 620–621 (2003).
- Collins A.M., Kennedy M.J., Biotransformations and bioconversions in New Zealand: past endeavours and future potential, *Austral Biotechnol.*, 9(2), 86–94 1999.
- Cornard J., Lapouge C., André E., pH influence on the complexation site of Al(III) with protocatechuic acid. A spectroscopic and theoretical approach, *Spectrochim. Acta A*, 108, 280–287 (2013).
- Danieli B., De Bellis P., Carrea G., Riva S., Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides, *Heterocycles*, 29, 2061–2064 (1989).
- de Oliveira I.R.W.Z., Fernandes S.C., Vieira I.C., Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 41, 366–372 (2006).

- Dehghan G., Dolatabadi J.E.N., Jouyban A., Zeynali K.A., Ahmadi S.M., Kashanian S., Spectroscopic studies on the interaction of quercetin–terbium (III) complex with calf thymus DNA, *DNA Cell Biol.*, 30, 195–201 (2011).
- Di Risio S., Yan N., Adsorption and inactivation behavior of horseradish peroxidase on cellulosic fiber surfaces, *J. Colloid Interf. Sci.*, 338, 410–419 (2009).
- Di Risio S., Yan N., Adsorption and inactivation behavior of horseradish peroxidase on various substrates, *Colloid Surface B*, 79, 397–402 (2010).
- Dixon M., Webb E.C., *Enzymes*, Cambridge, UK, (1979).
- Dufour C., Loonis M., Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation, *BBA-Gen Subject*, 1770, 958–965 (2007).
- Dunford H.B., In: *Peroxidases in Chemistry and Biology* (Everse J., Everse K.E. & Grisham M.B., eds), CRC Press, Boca Raton, 2, 225–227 (1991).
- Eldin M.S.M., Portaccio M., Diano N., Rossi S., Bencivenga U., D’Uva A., Canciglia P., Gaeta F.S., Mita D.G., Influence of the microenvironment on the activity of enzymes immobilized on Teflon membranes grafted by γ -radiation, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 7, 251–261 (1999).
- Eslamipour F., Hejazi P., Effects of surface modification and activation of magnetic nanoparticles on the formation of amylase immobilization bonds under different ionic strength conditions, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 119, 1–11 (2015).
- Fenoll L.G., García-Ruiz P.A., Var  n R., García-C  novas F., Kinetic Study of the Oxidation of Quercetin by Mushroom Tyrosinase, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7781–7787 (2003).
- Fischer V., Mason R.P., Stable Free Radical and Benzoquinone Imine Metabolites of an Acetaminophen Analogue, *J. Biol. Chem.*, 259, 10284–10288 (1984).
- Fossen T., Cabrita L., Andersen O.M., Color and stability of pure anthocyanins influenced by pH included the alkaline region, *Food Chem.*, 63, 435–440 (1998).
- Fujiwara H., Tanaka Y., Fukui Y., Ashikari T., Yamaguchi M., Kusumi T., Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*, *Plant Sci.*, 137, 87–94 (1998).

- Galati G., Chan T., Wu B., O'Brien P.J., Glutathione-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species by the Peroxidase-Catalyzed Redox Cycling of Flavonoids, *Chem. Res. Toxicol.*, 12, 521–525 (1999).
- Galati G., Moridani M.Y., Chan T.S., O'Brien P.J., Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin i quercetin: glutathione oxidation and conjugation, *Free Radical Bio. Med.*, 30(4), 370–382 (2001).
- Ghidouche S., Es-Safi N., Ducrot P., Mechanistic study on the enzymatic oxidation of flavonols, *Tetrahedron Lett.*, 49, 619–623 (2008).
- Giacomini C., Villarino A., Franco-Fraguas L., Batista-Viera F., Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 4, 313–327 (1998).
- Gülşen A., Makris D.P., Kefalas P., Biomimetic oxidation of quercetin: Isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its *in vitro* antioxidant properties, *Food Res. Int.*, 40, 7–14 (2007).
- Hankonyi V., *Organska kemija za studente medicine*, Samizdat, Zagreb, (1996).
- Homaei A., Etemadipour R., Improving the activity and stability of actinidin by immobilization on gold nanorods, *Int. J. Biol. Macromol.*, 72, 1176–1181 (2015).
- Hosseinimehr S.J., Flavonoids and genomic instability induced by ionizing radiation, *Drug Discov. Today*, 15, 21–22 (2010).
- Jeon C., Park J.Y., Yoo Y.J., Novel immobilization of alginic acid for heavy metal removal, *Biochem. Eng. J.*, 11, 159–166 (2002).
- Jiménez-Atiénzar M., Escribano J., Cabanes J., Gandía-Herrero F., García-Carmona F., Oxidation of the flavonoid eriodictyol by tyrosinase, *Plant Physiol. Bioch.*, 43, 866–873 (2005).
- Kabeya L.M., de Marchi A.A., Kanashiro A., Lopes N.P., da Silva C.H.T.P., Pupo M.T., Lucisano-Valim Y.M., Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: Synthesis and structure–activity relationships, *Bioorgan. Med. Chem.*, 15, 1516–1524 (2007).
- Kang I.J., Pfromm P.H., Rezac M.E., Real time measurement and control of thermodynamic water activities for enzymatic catalysis in hexane, *J. Biotechnol.*, 119, 147–154 (2005).
- Karlson P., *Biokemija za studente kemije i medicine*, Zagreb, Školska knjiga, 1993.

- Kečkeš S., Gašić U., Ćirković-Veličković T., Milojković-Opsenica D., Natić M., Tešić Ž., The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry, *Food Chem.* 138, 32–40 (2013).
- Keleti T., Basic enzyme kinetics, Akadémiai Kiadó, Budapest, (1986).
- Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Domina N.G., Kirpotina L.N., Quinn M.T., Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems, *Bioorgan. Med. Chem.*, 15, 1749–1770 (2007).
- Lambusta D., Nicolosi G., Patti A., Piattelli M., Enzyme-mediated region protection deprotection of hydroxyl groups in (+)-catechin, *Synthesis*, 11, 1155–1158 (1993).
- Leuenberger H.G.W., Interrelations of chemistry and biotechnology - I. Biotransformation - a useful tool in organic chemistry, *Pure Appl. Chem.*, 62, 753–768 (1990).
- Li B., Chen Y., Chen X., Liu D., Niu H., Xiong J., Wu J., Xie J., Bai J., Ying H., A novel immobilization method for nuclease P1 on macroporous absorbent resin with glutaraldehyde cross-linking and determination of its properties, *Process Biochem.*, 47, 665–670 (2012).
- Linder M., Teeri T.T., The roles and function of cellulose-binding domains, *J. Biotechnol.*, 57, 15–28 (1997).
- Liu J., Song H., Weng L., Ji L., Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 18(4), 225–232 (2002).
- Ma H., Kermasha S., Gao J., Borges R.M., Yu X., Laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds in organic media, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 57, 89–95 (2009).
- Makris D.P., Rossiter J.T., An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols, *Food Chem.*, 77, 177–185 (2002).
- Marangoni A.G., Enzyme kinetics - a modern approach, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, (2003).
- Metelitz D.I., Litvinchuk A.V., Savenkova M.I., Peroxidase-catalyzed co-oxidation of halogen-substituted phenols and 4-aminoantipyrine, *J. Mol. Catal.*, 67, 401–411 (1991).

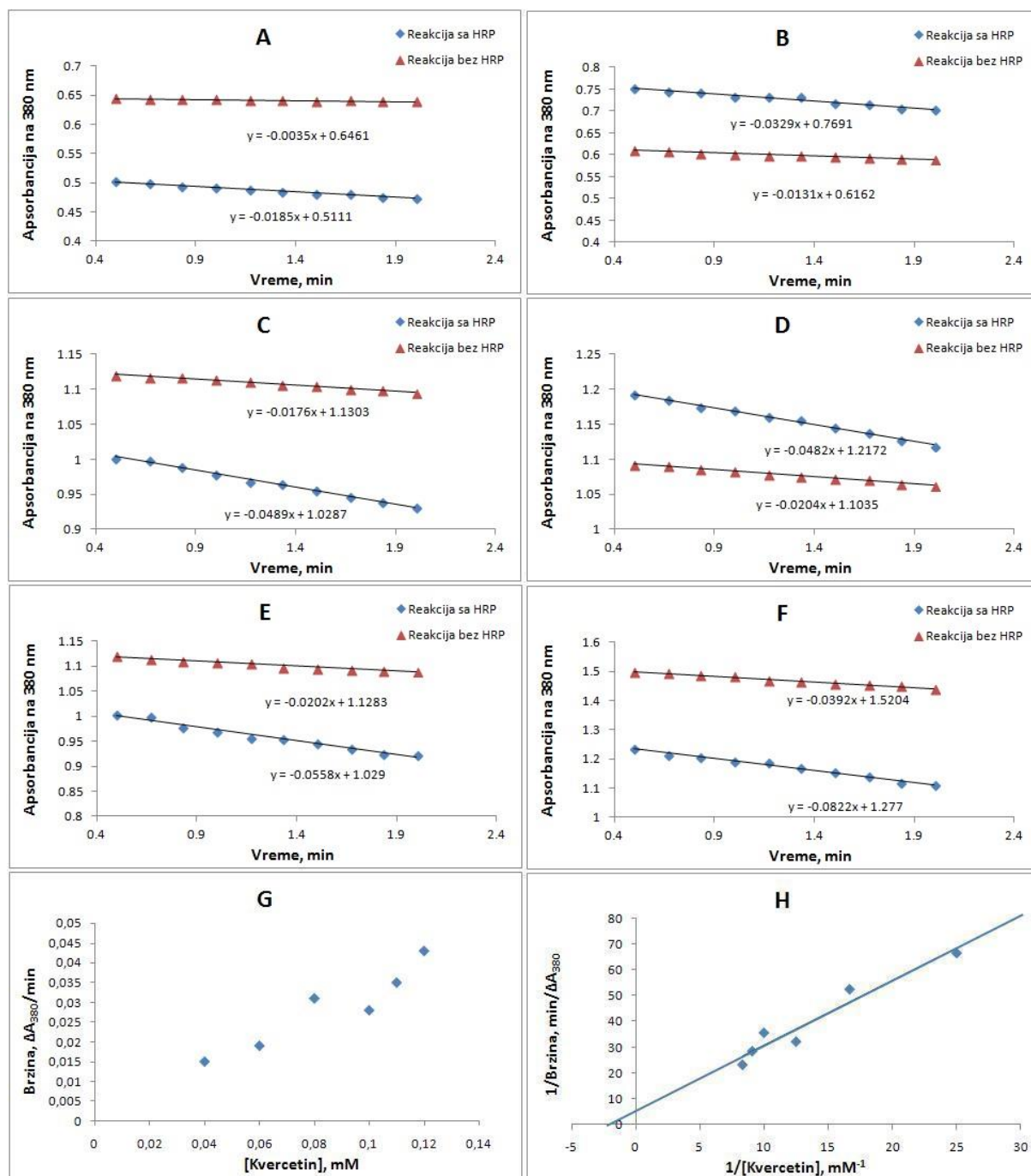
- Metodiewa D., Jaiswal A.K., Cenas N., Dickançaitė E., Segura-Aguilar J., Quercetin may act as cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product, *Free Radical Bio. Med.* 26, 107–116 (1999).
- Miura T., Muraoka S., Fujimoto Y., Inactivation of creatine kinase induced by quercetin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: pro-oxidative and anti-oxidative actions of quercetin, *Food Chem. Toxicol.*, 41, 759–765 (2003).
- Mozhaev V.V., Budde C.L., Rich J.O., Usyatinsky A.Y., Michels P.C., Khmel-Nitsky Y.L., Clark D.S., Dordick J.S., Regioselective enzymatic acylation as a tool for producing solution-phase combinatorial libraries, *Tetrahedron*, 54, 3971–3982 (1998).
- Nagasawa T., Yamada H., Microbial production of commodity chemicals, *Pure Appl. Chem.*, 67, 1241–1256 (1995).
- Nakajima N., Ishihara K., Hamada H., Kawabe S.I., Furuya T., Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*, *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 347–349 (2000).
- Nakata R., Osumi Y., Miyagawa S., Tachibana A., Tanabe T., Preparation of keratin and chemically modified keratin hydrogels and their evaluation as cell substrate with drug releasing ability, *J. Biosci. Bioeng.*, 120(1), 111–116 (2015).
- Nazari K., Esmaeili N., Mahmoudi A., Rahimi H., Moosavi M., Peroxidative phenol removal from aqueous solutions using activated peroxidase biocatalyst, *Enzyme Microb. Tech.*, 41(3), 226–233 (2007).
- Nicell J.A., Saadi K.W., Buchanan I.D., Phenol polymerization and precipitation by peroxidase and an additive, *Biores. Technol.*, 54(1), 5–16 (1995).
- Nicell J.A., Wright H., A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide, *Enzyme Microb. Tech.*, 21, 302–310 (1997).
- Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.*, 74, 418–425 (2001).
- Obinger C., Burner U., Ebermann R., Generation of Hydrogen Peroxide by Plant Peroxidases Mediated Thiol Oxidation, *Phyton*, 37(3), 219–226 (1997).
- Obinger C., Burner U., Vötsch B., Hofstetter W., Ebermann R., Reaction of peroxidases with thiols: hydrogen peroxide generation and the influence of phenols. - In: Obinger C,

- Burner U., Ebermann R., Penel C., Greppin H., (eds.), Plant peroxidases: Biochemistry and physiology, 106–112 (1996).
- Omololu P.A., Rocha J.B.T., Kade I.J., Attachment of rhamnosyl glucoside on quercetin confers potent iron-chelating ability on its antioxidant properties, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 63, 249–255 (2011).
- Osman A., Makris D.P., Kefalas P., Investigation on biocatalytic properties of a peroxidase-active homogenate from onion solid wastes: An insight into quercetin oxidation mechanism, *Process Biochem.* 43, 861–867 (2008).
- Papas A.M., Antioxidant status, diet, nutrition and health, United Kingdom, CRC Press, (1999).
- Patti A., Piattelli M., Nicolosi G., Use of *Mucor miehei* lipase in the preparation of long chain 3-O-acylcatechins, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 10, 577–582 (2000).
- Petronijević Ž.B., Dobijanje, prečišćavanje i imobilizacija enzima dekstransaharaze iz *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F, Doktorska disertacija, TMF, Beograd, (1988).
- Petronijević Ž.B., Opšta i primenjena enzimologija I, Tehnološki fakultet, Leskovac, 2000.
- Petronijević Ž.B., Opšta i primenjena enzimologija II, Tehnološki fakultet, Leskovac, u pripremi.
- Porath J., Axén R., Immobilization of enzymes to agar, agarose, and sephadex support, *Method Enzymol.*, 44, 19–45 (1976).
- Pourcel L., Routaboul J., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I., Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions, *Trends Plant Sci.*, 12(1), 29–36 (2007).
- Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N., Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*, 82, 513–523 (2011).
- Ranaldi F., Vanni P., Giachetti E., What students must know about the determination of enzyme kinetic parameters, *Biochem. Educ.*, 27, 87–91 (1999).
- Rawel H.M., Rohn S., Kroll J., Influence of a sugar moiety (rhamnosylglucoside) at 3-O position on the reactivity of quercetin with whey proteins, *Int. J. Biol. Macromol.*, 32, 109–120 (2003).

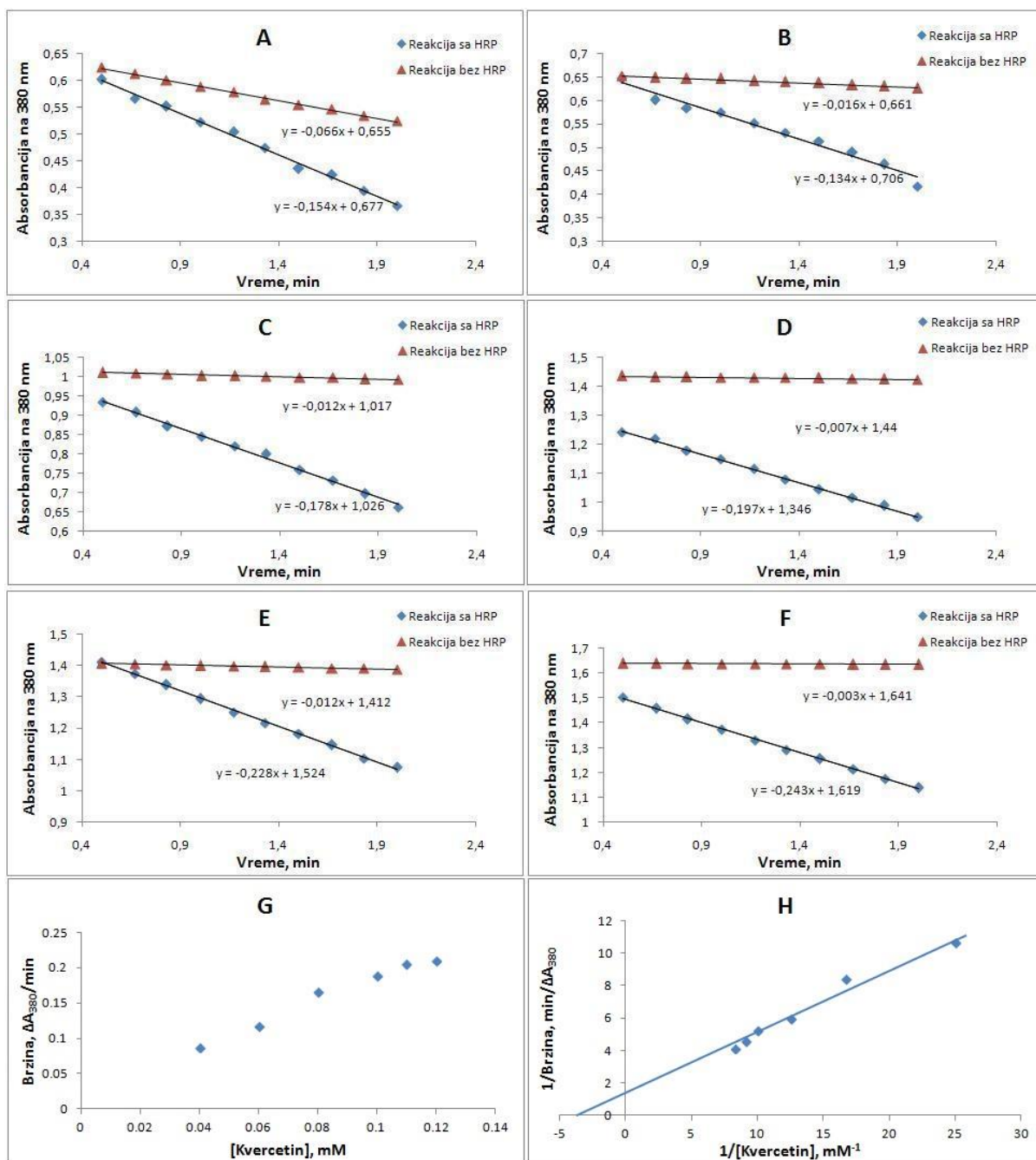
- Razmara R.S., Daneshfar A., Sahraei R., Solubility of Quercetin in Water + Methanol and Water + Ethanol from (292.8 to 333.8) K, *J. Chem. Eng. Data*, 55, 3934–3936 (2010).
- Ruiz M., Galvis M., Barbosa O., Ortiz C., Torres R., Fernandez-Lafuente R., Solid-phase modification with succinic polyethyleneglycol of aminated lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the immobilization protocol on enzyme catalytic properties, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 87, 75–82 (2013).
- Sánchez-Gallego J.I., López-Revuelta A., Sardina J.L., Hernández-Hernández A., Sánchez-Yagüe J., Llanillo M., Membrane cholesterol contents modify the protective effects of quercetin and rutin on integrity and cellular viability in oxidized erythrocytes, *Free Radical Bio. Med.*, 48, 1444–1454 (2010).
- Schreiber W., Action of horse radish peroxidase upon some flavones, *FEBS Lett.*, 41(1), 50–52 (1974).
- Serra S., Fuganti C., Brenna E., Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances, *Trends Biotechnol.*, 23, 193–198 (2005).
- Sivaramakrishnan V., Shilpa P.N.M., Kumar V.R.P., Devaraj S.N., Attenuation of *N*-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinogenesis by a novel flavonol—Morin, *Chem-Biol. Interact.*, 171, 79–88 (2008).
- Suzuki T., Toriyama M., Hosono H., Abe Y., Application of a Microporous Glass-Ceramics with a Skeleton $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$ to Carriers for Immobilization of Enzymes, *J. Ferment. Bioeng.*, 72(5), 384–391 (1991).
- Takahama U., Hydrogen Peroxide-Dependent Oxidation of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Epidermal and Guard Cells of *Tradescantia virginiana* L, *Plant Cell Physiol.*, 29(3) 475–481 (1988).
- Takahama U., Spectrophotometric study on the oxidation of rutin by horseradish peroxidase and characteristics of the oxidized products, *BBA-Gen Subject*, 882, 445–451 (1986).
- Takei T., Ikeda K., Ijima H., Kawakami K., Fabrication of poly(vinyl alcohol) hydrogel beads crosslinked using sodium sulfate for microorganism immobilization, *Process Biochem.*, 46, 566–571 (2011).
- Tommasini S., Raneri D., Ficarra R., Calabro M.L., Stancanelli R., Ficarra P., Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 35, 379–387 (2004),

- Veitch N.C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, 65, 249–259 (2004).
- Viskupičová J., Šturdík E., Ondrejovič M., Enzymatic transformation of flavonoids, *Acta Chim. Slov.*, 2(1), 88–106 (2009).
- Walle T., Vincent T.S., Walle U.K., Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells, *Biochem. Pharmacol.*, 65, 1603–1610 (2003).
- Wardman P., Von Sonntag C., Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells, *Methods in Enzymol.*, 251, 31–55 (1995).
- Wu Y., Taylor K.E., Biswas N., Bewtra J.K., A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol, *Enzyme Microb. Tech.*, 22, 315–322 (1998).
- Xiao-na X., Chun-li Z., Er-na X., Jia-xin W., Hong Z., Lei W., Zhi W., Acylation of Quercetin with a Novel Thermophilic Esterase as Biocatalyst, *Chem. Res. Chinese U.*, 28(2), 225–229 (2012).
- Yang J., Guo J., Yuan J., In vitro antioxidant properties of rutin, *LWT*, 41, 1060–1066 (2008).
- Zhang D.H., Yuwen L.X., Li C., Li Y.Q., Effect of poly(vinyl acetate–acrylamide) microspheres properties and steric hindrance on the immobilization of *Candida rugosa* lipase, *Bioresource Technol.*, 124, 233–236 (2012).

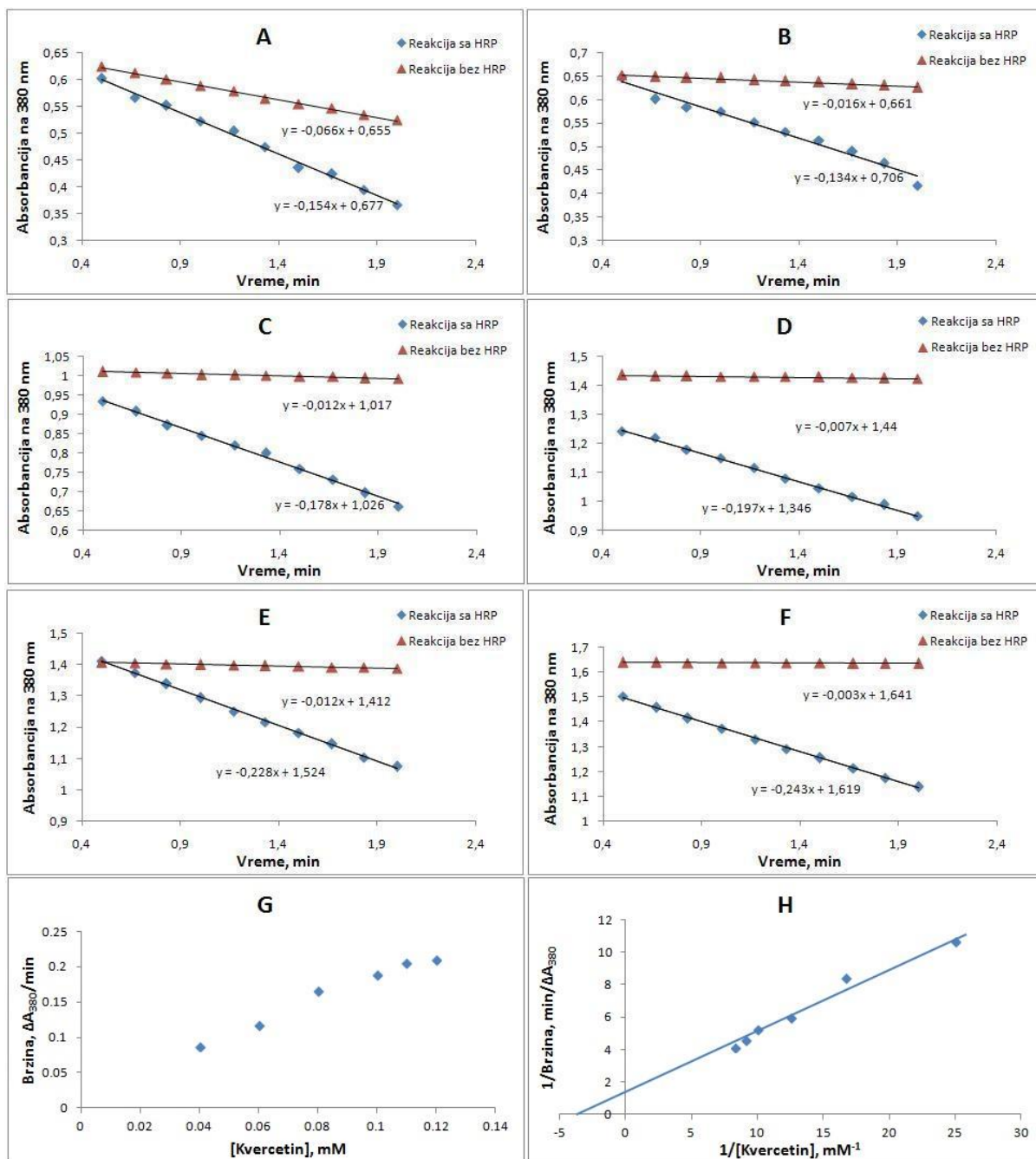
PRILOG



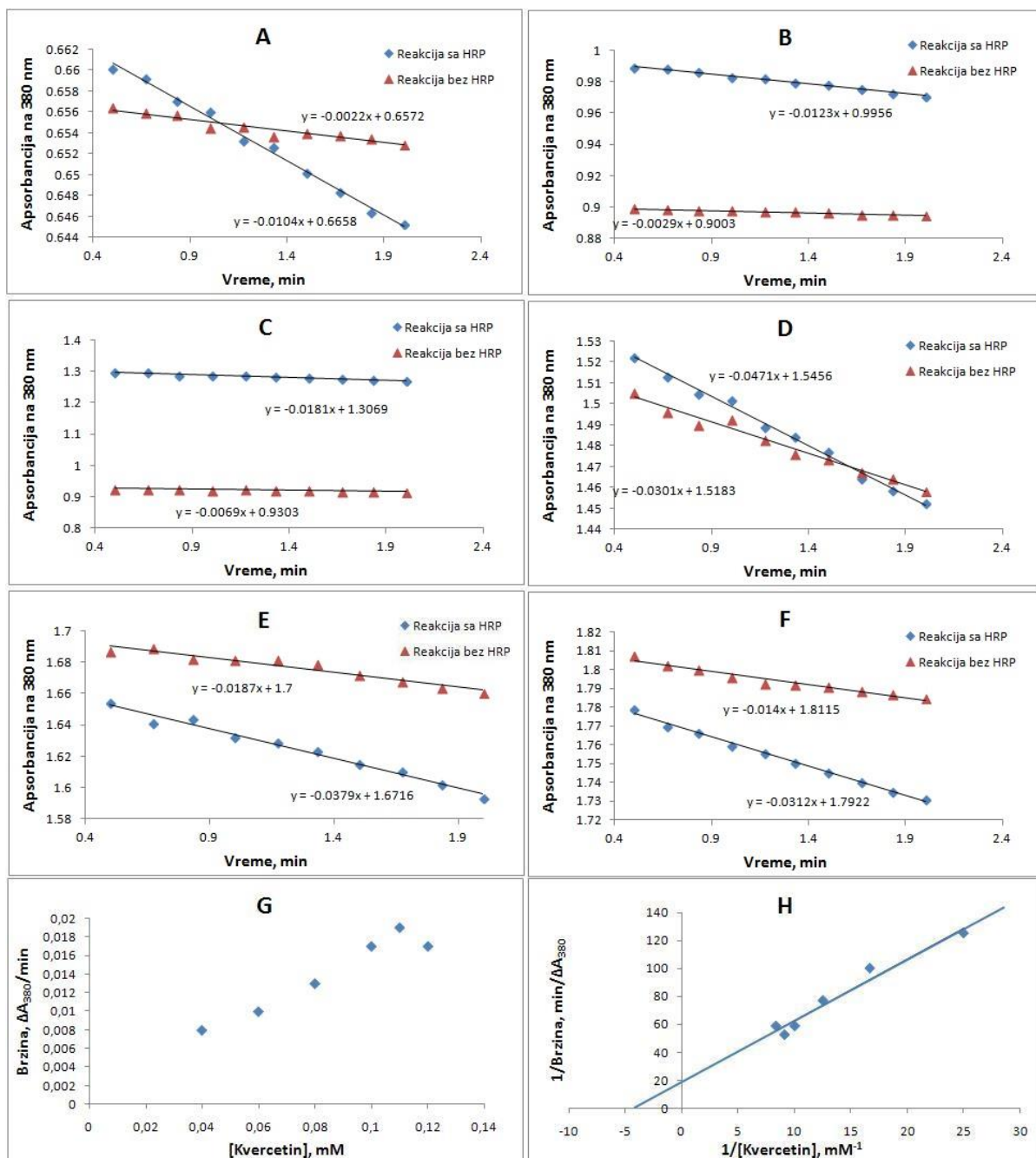
Slika P.1 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,04 mM) i L-cisteina (0,8 mM).



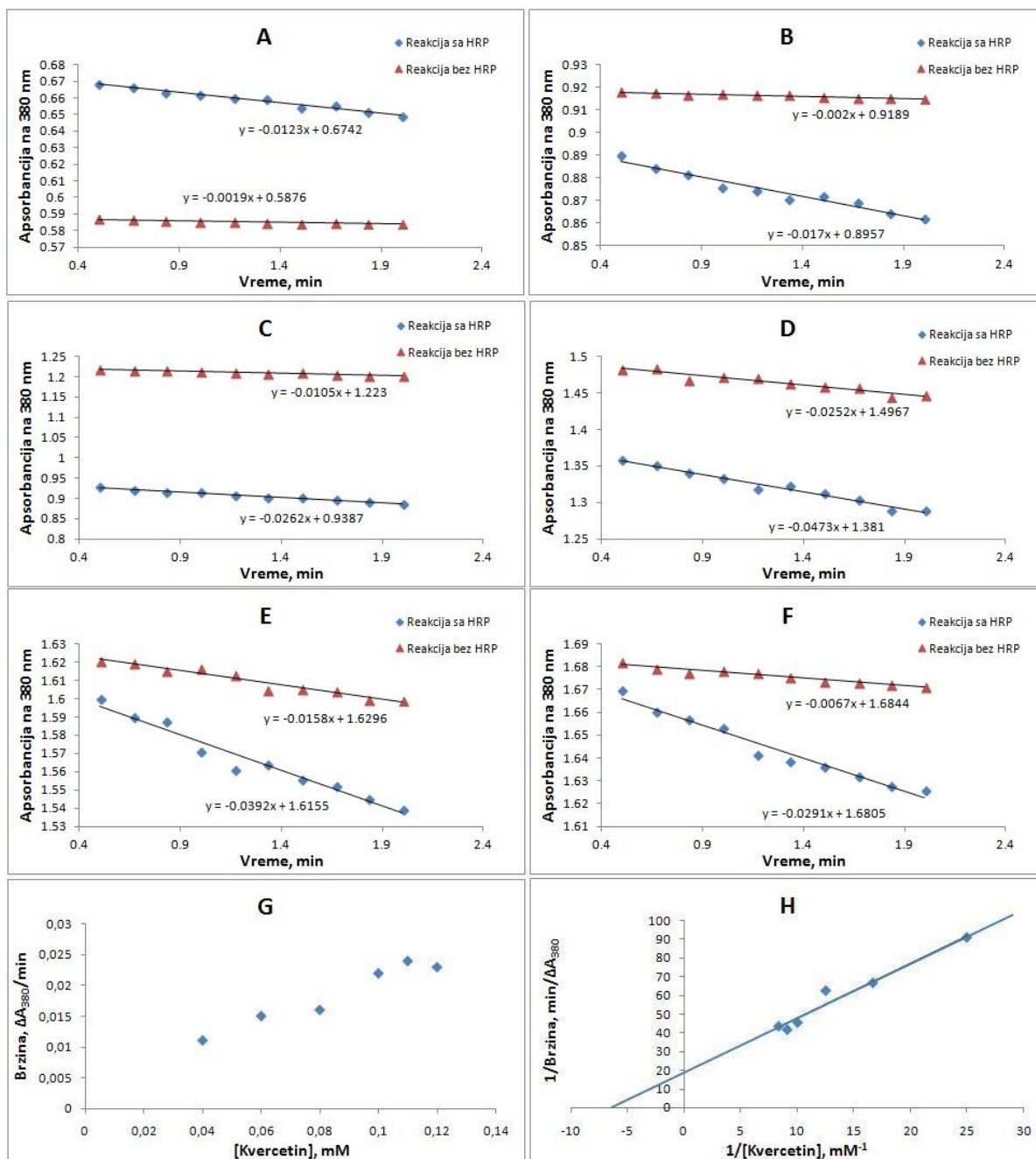
Slika P.2 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,06 mM) i L-cisteina (0,8 mM).



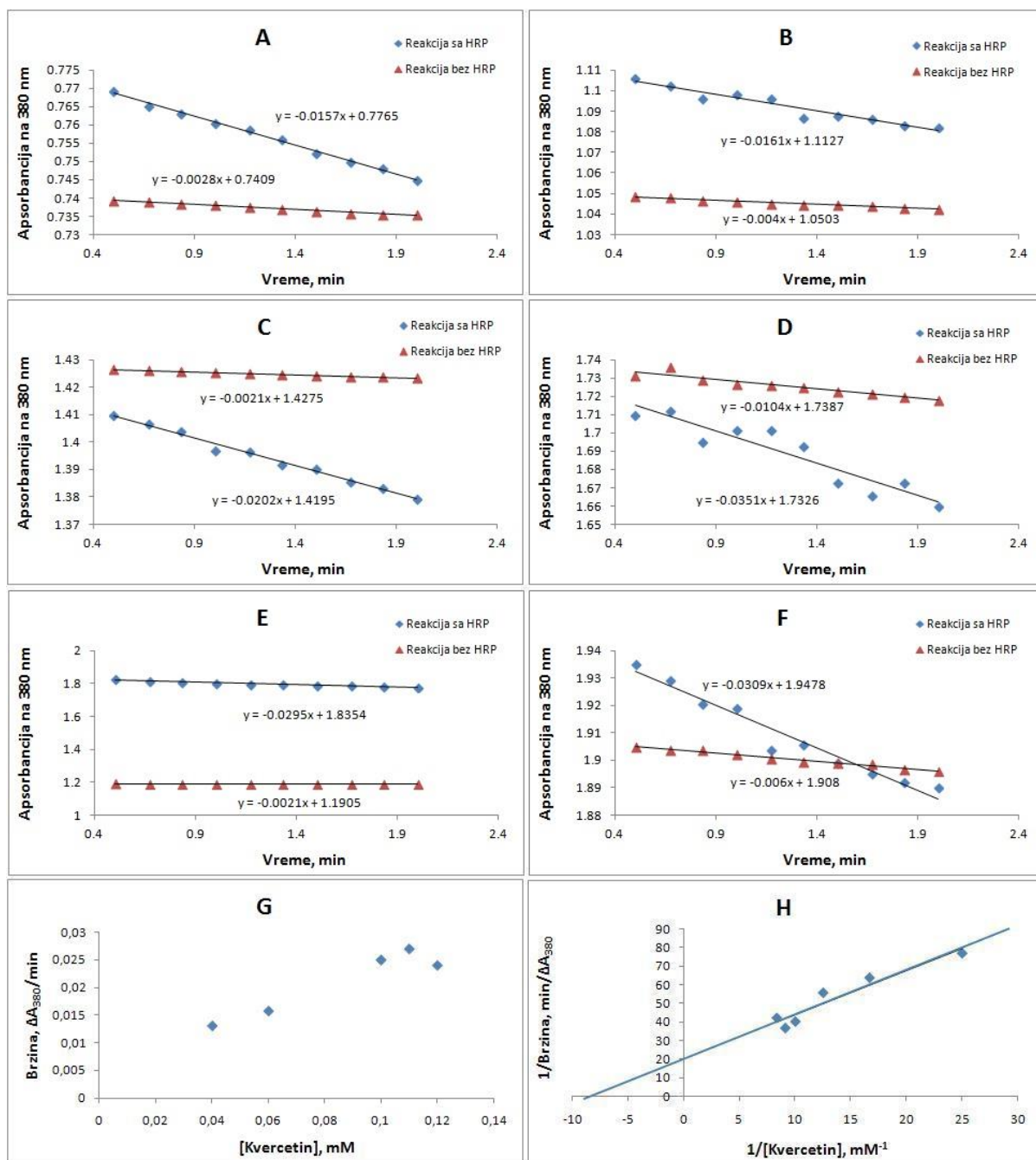
Slika P.3 Promena apsorbancije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,08 mM) i L-cisteina (0,8 mM)



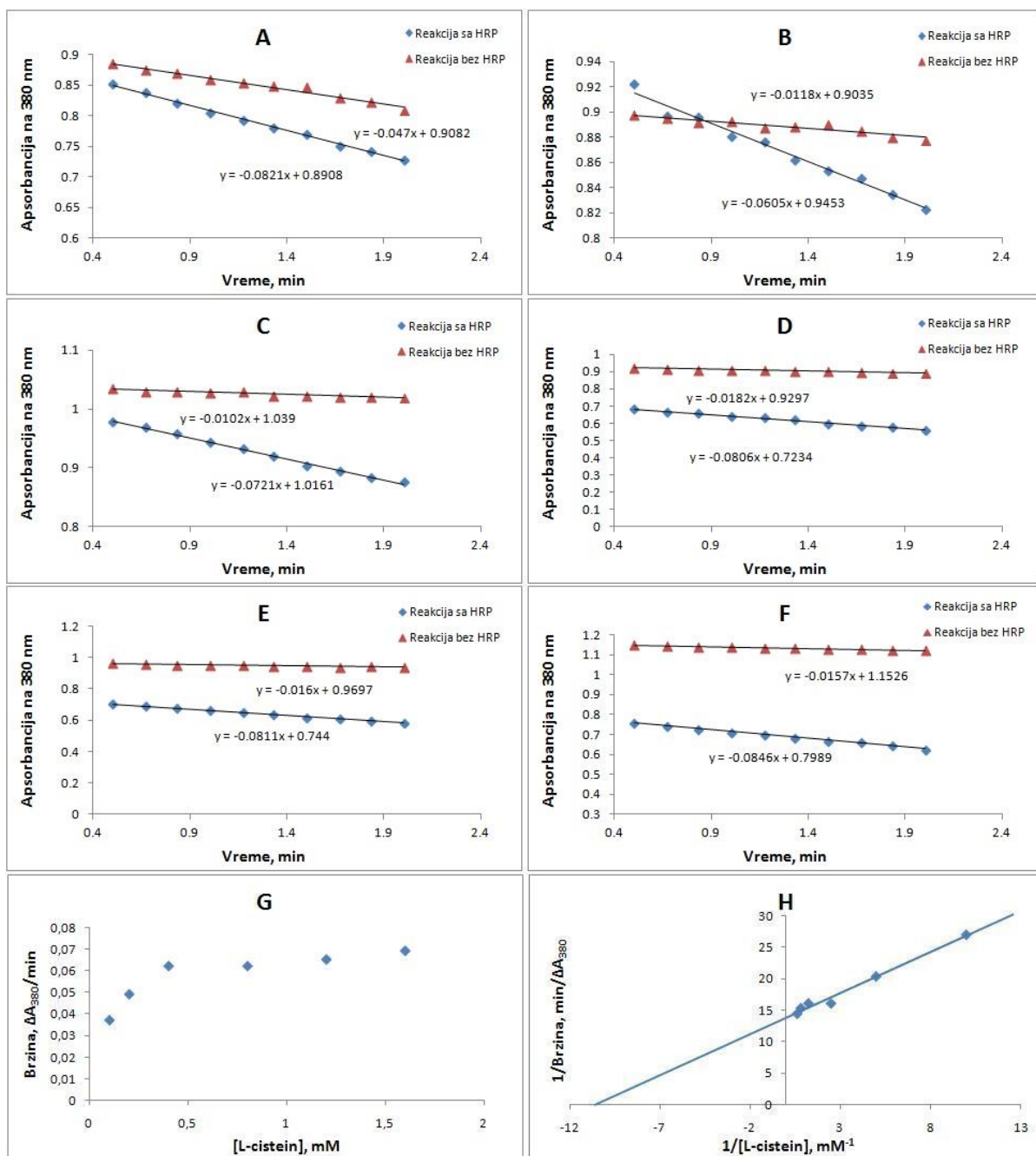
Slika P.4 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,1 mM) i L-cisteina (0,8 mM)



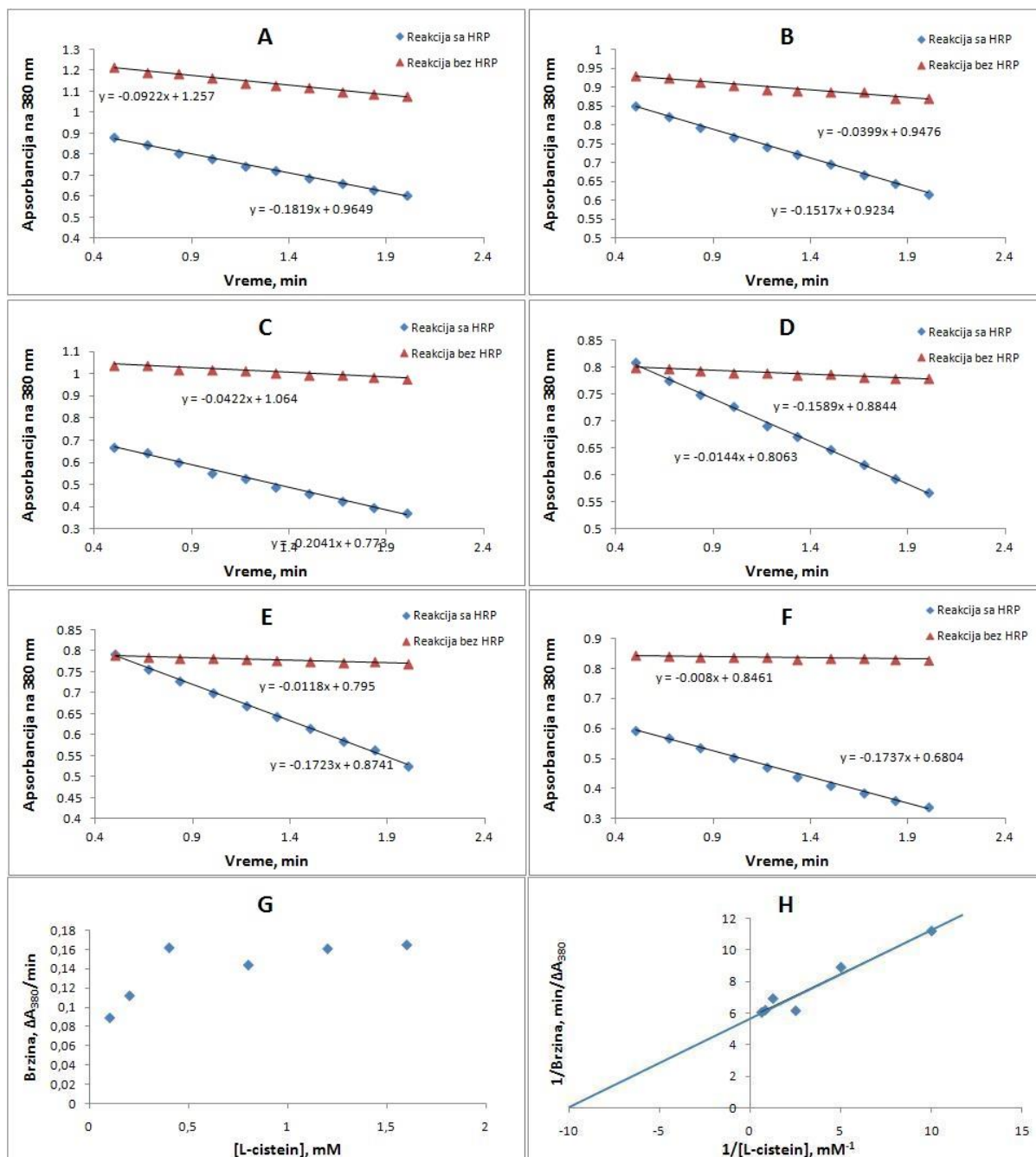
Slika P.5 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,12 mM) i L-cisteina (0,8 mM)..



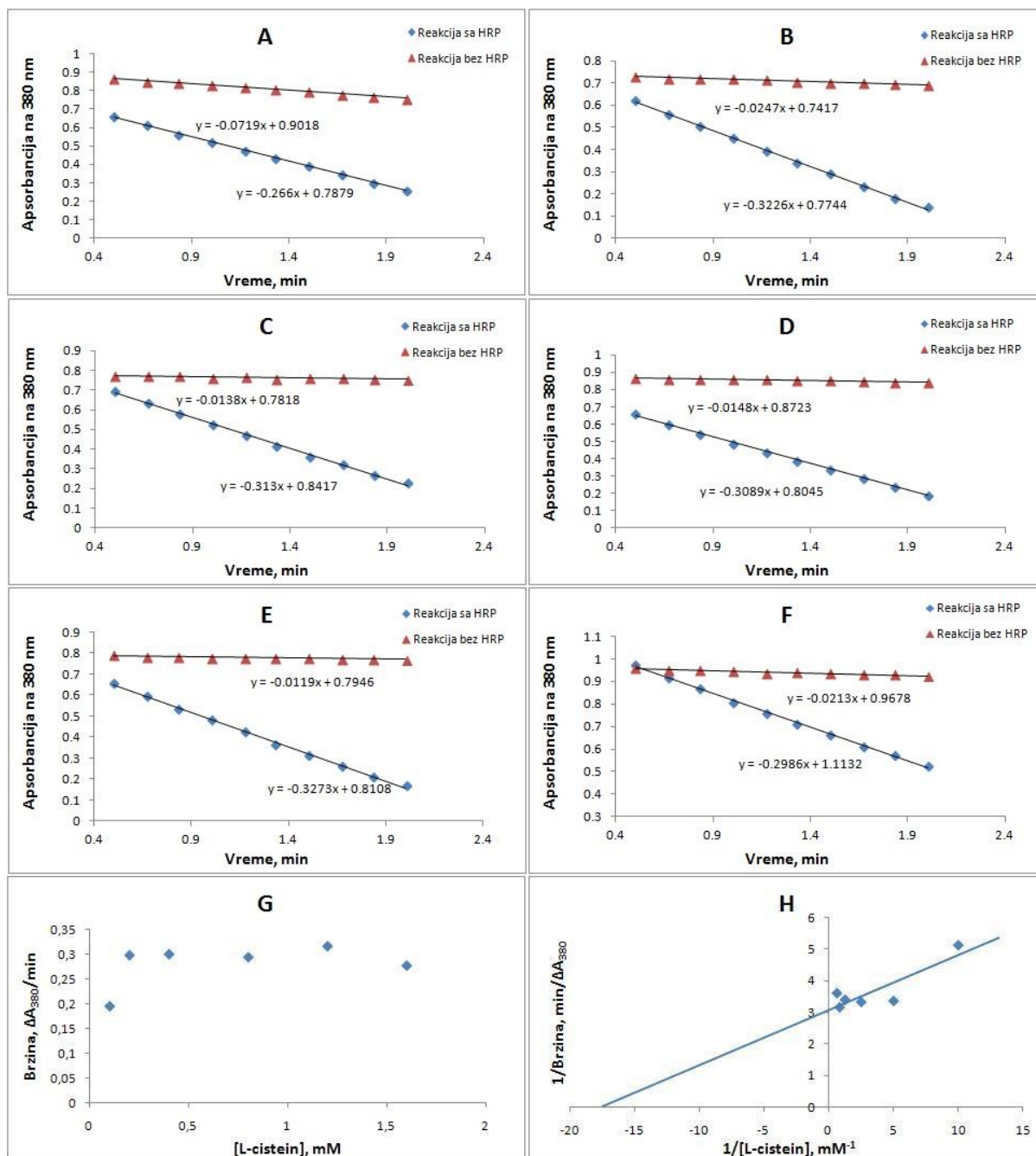
Slika P.6 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,16 mM) i L-cisteina (0,8 mM)..



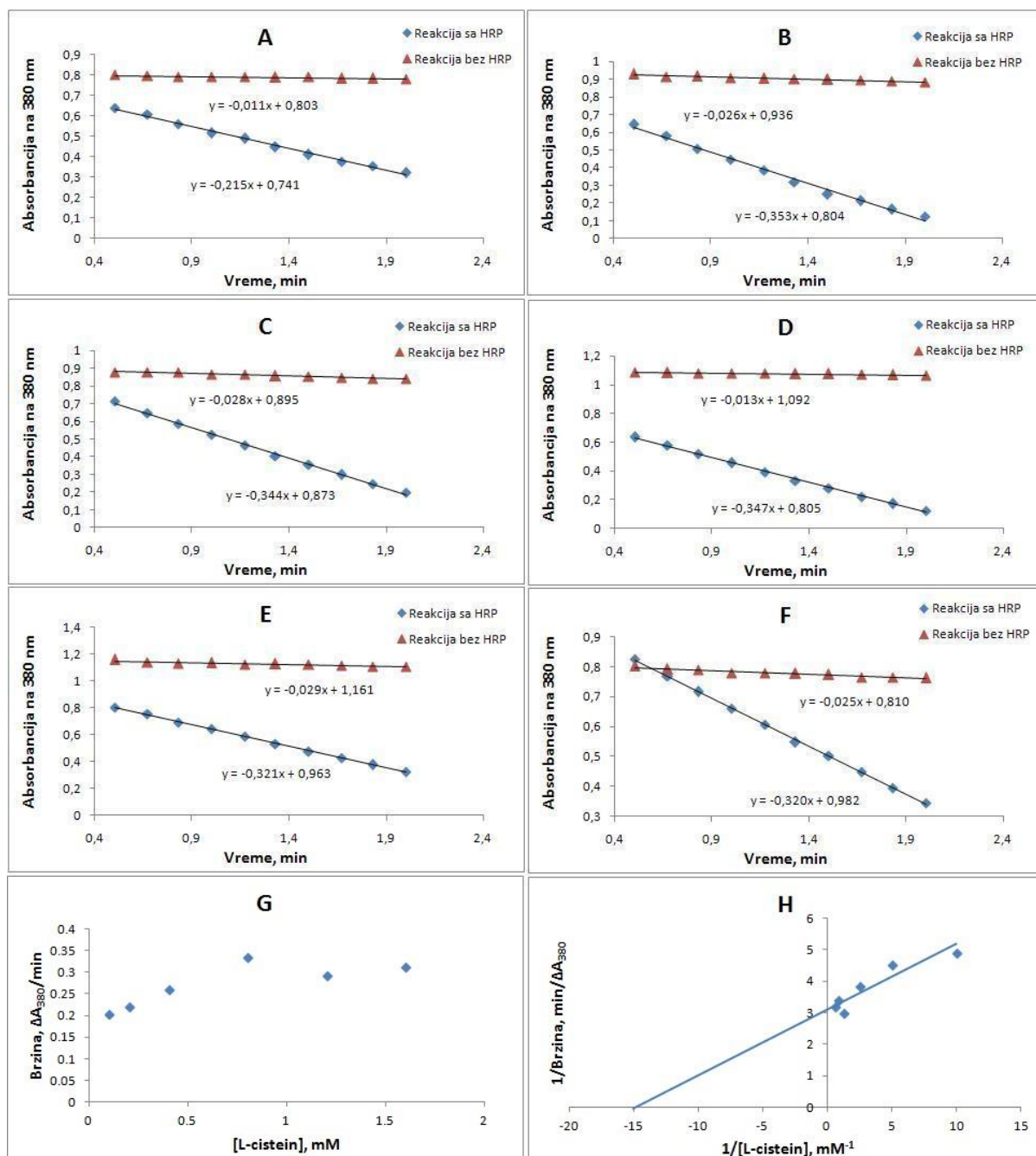
Slika P.7 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije L-cisteina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,03 mM) i kvercetina (0,08 mM).



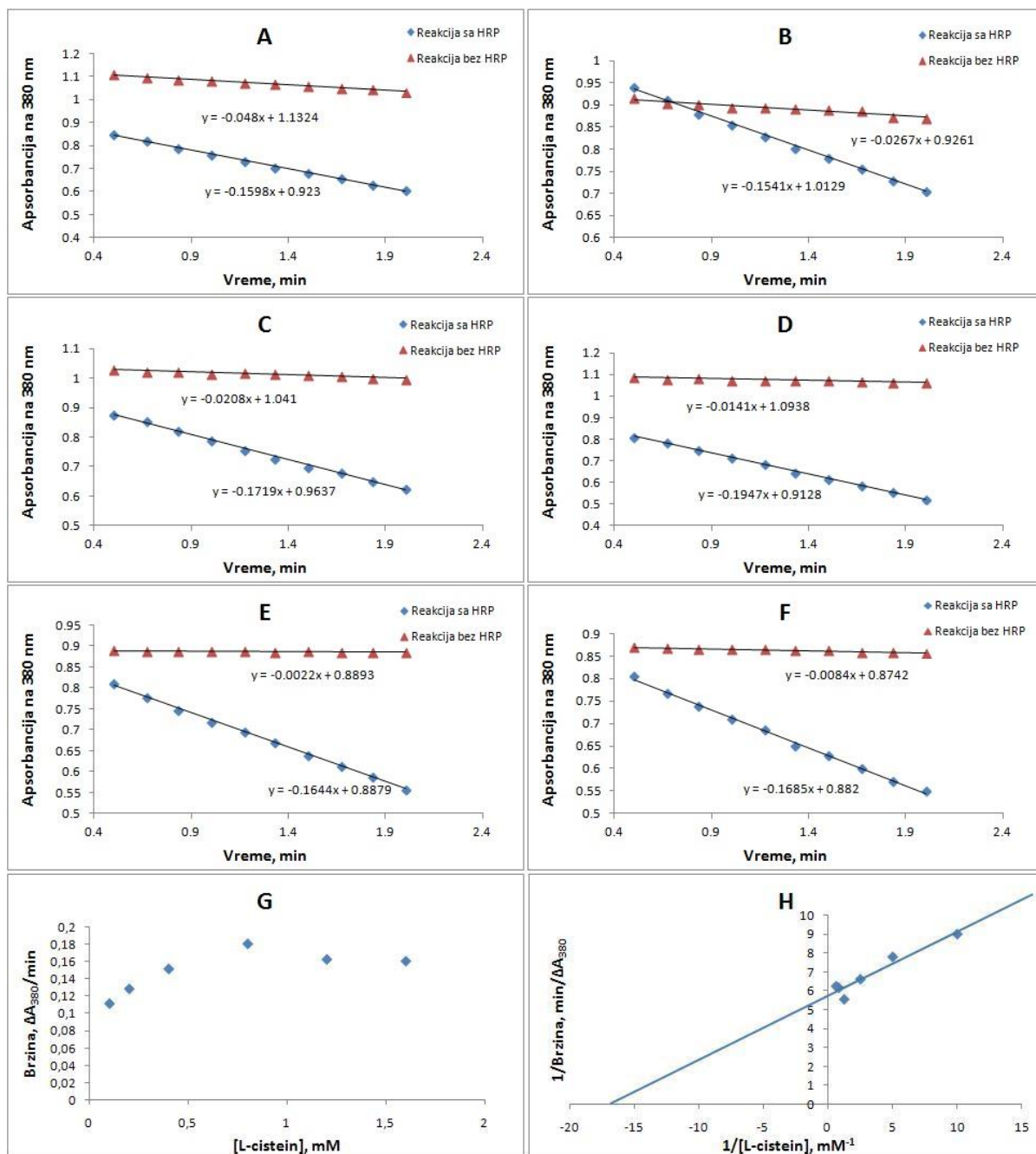
Slika P.8 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije L-cisteina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,04 mM) i kvercetina (0,08 mM).



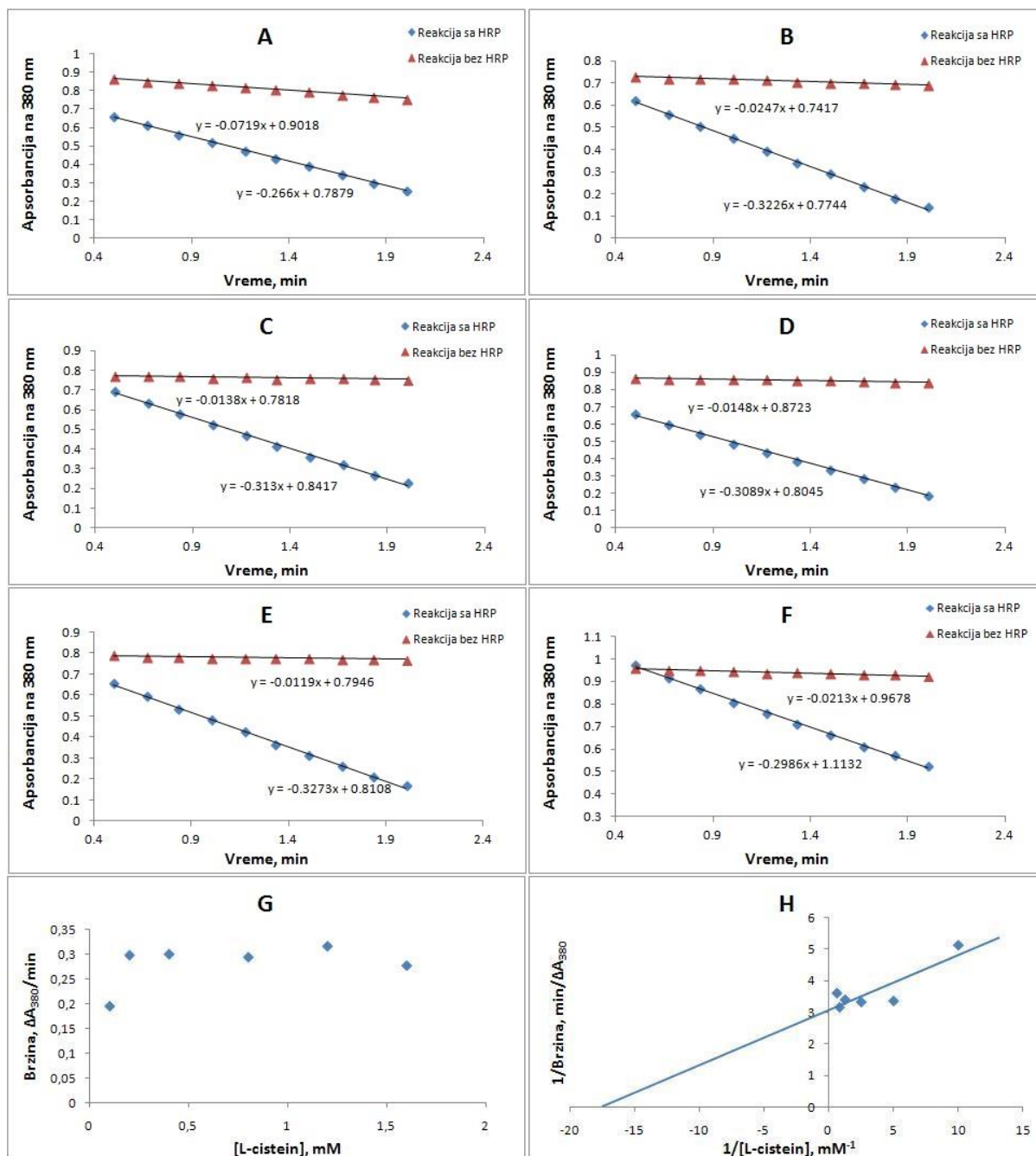
Slika P.9 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije L-cisteina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,05 mM) i kvercetina (0,08 mM).



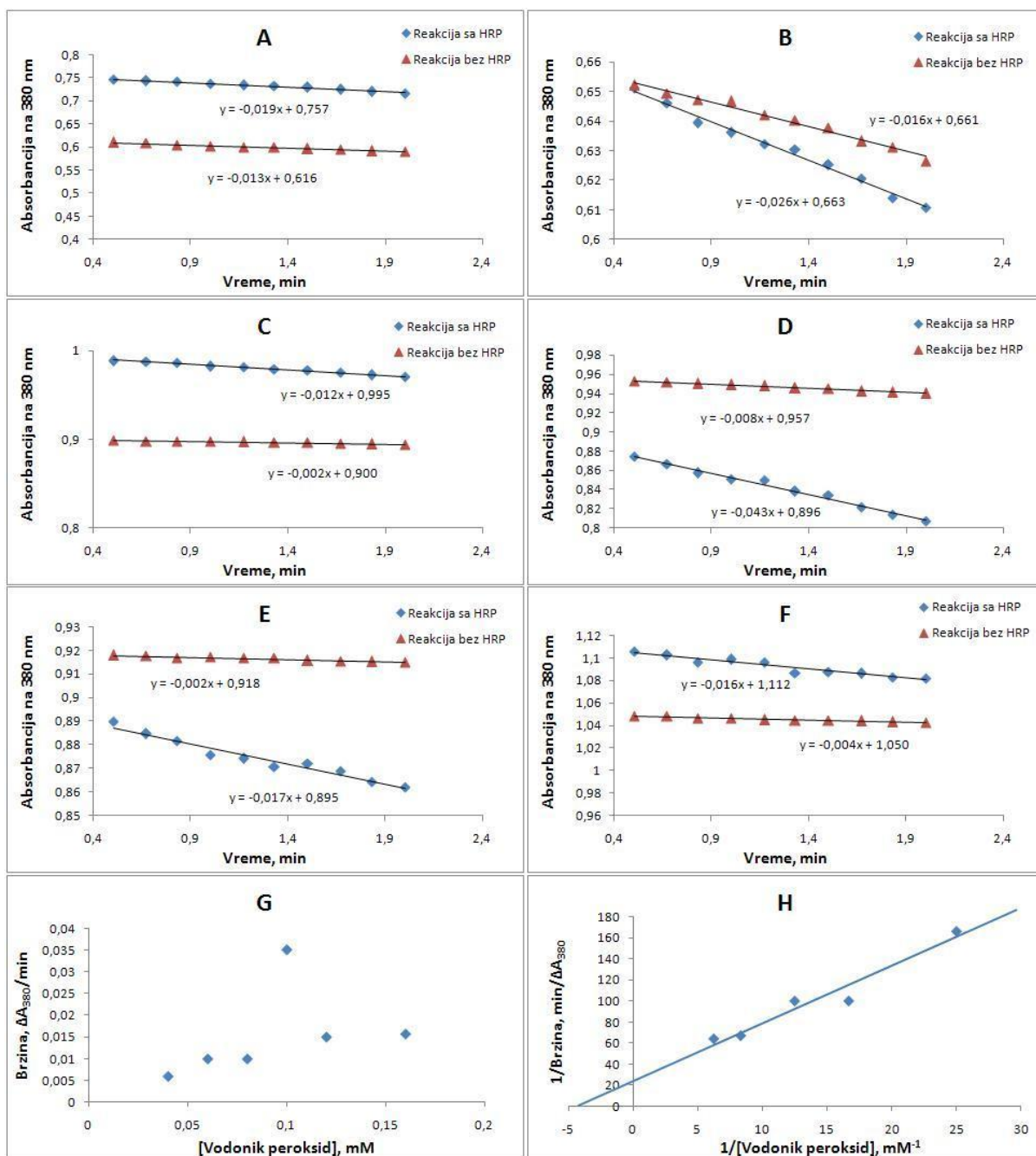
Slika P.10 Promena apsorbancije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije L-cisteina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,06 mM) i kvercetina (0,08 mM).



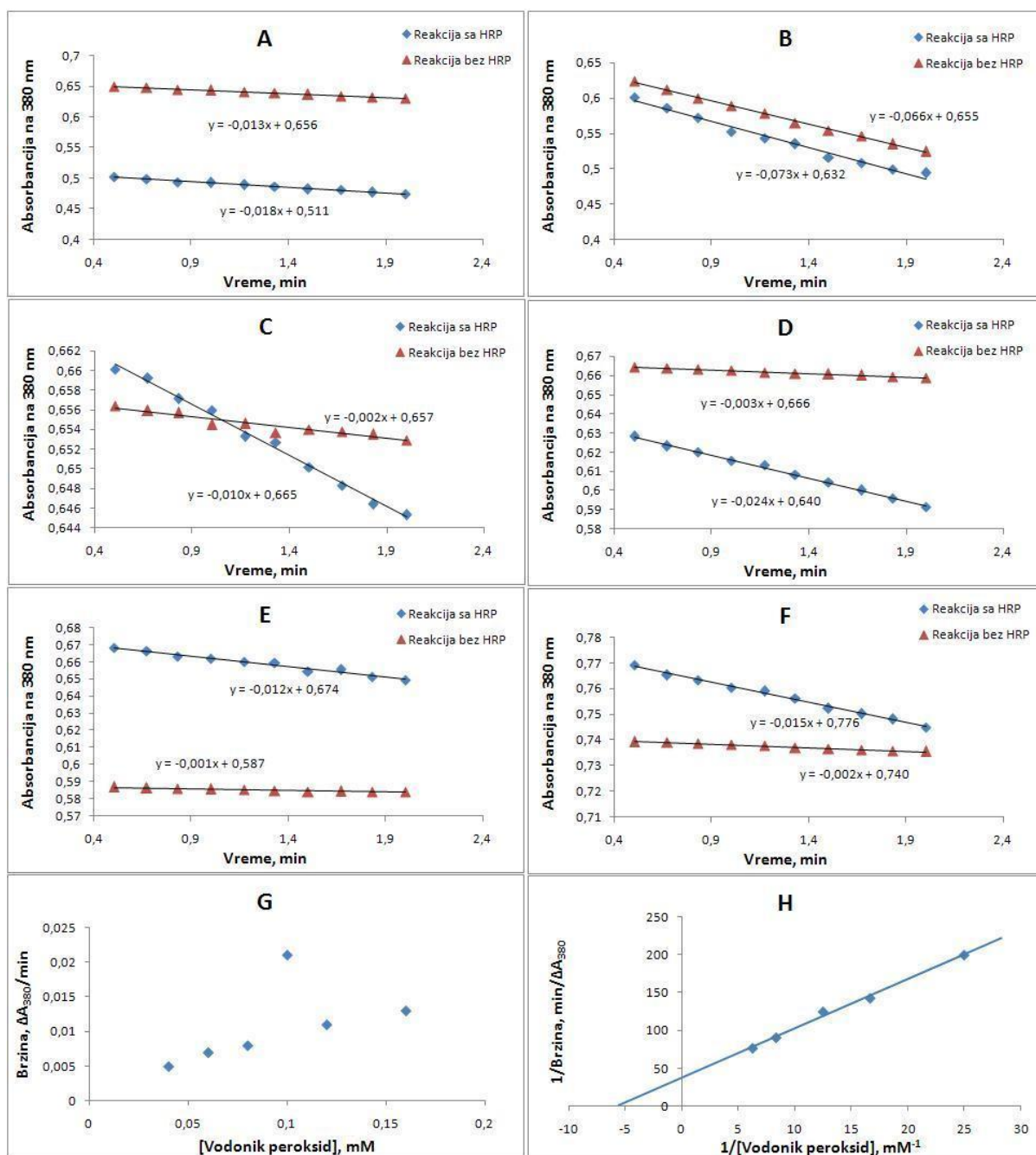
Slika P.11 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije L-cisteina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,08 mM) i kvercetina (0,08 mM).



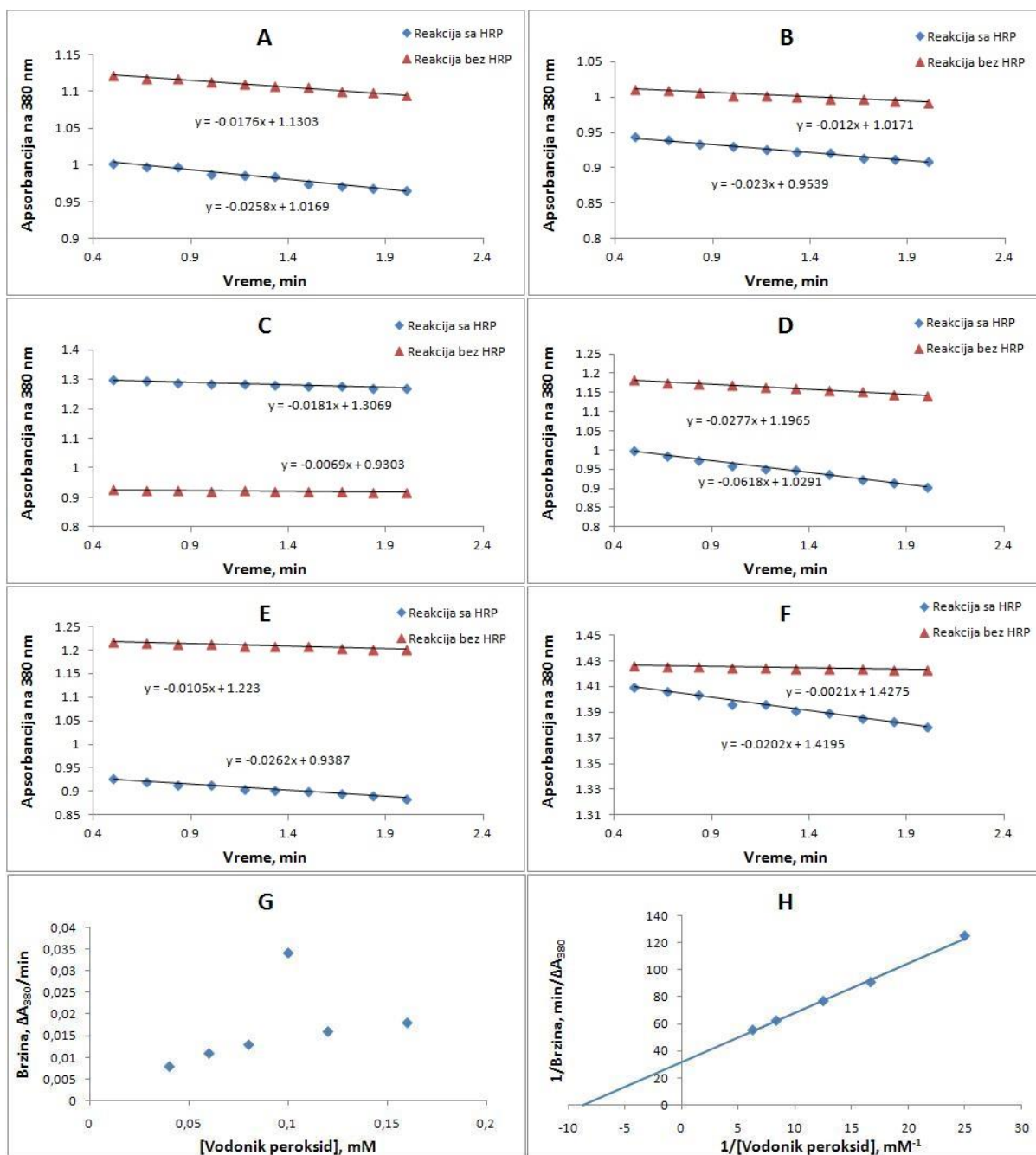
Slika P.12 A-F: Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije L-cisteina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije H_2O_2 (0,1 mM) i kvercetina (0,08 mM).



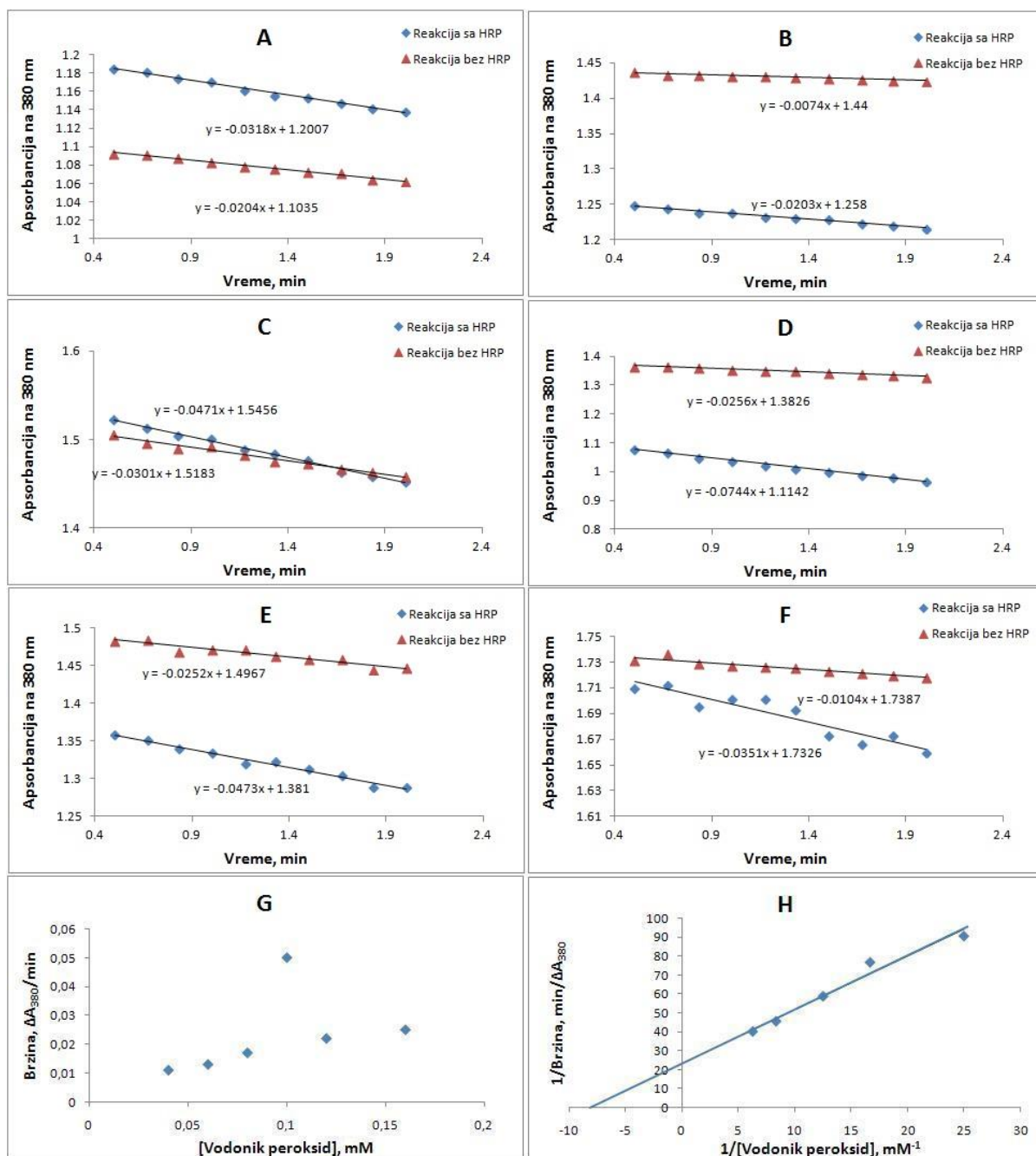
Slika P.13 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnriver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije kvercetina (0,04 mM) i L-cisteina (0,8 mM).



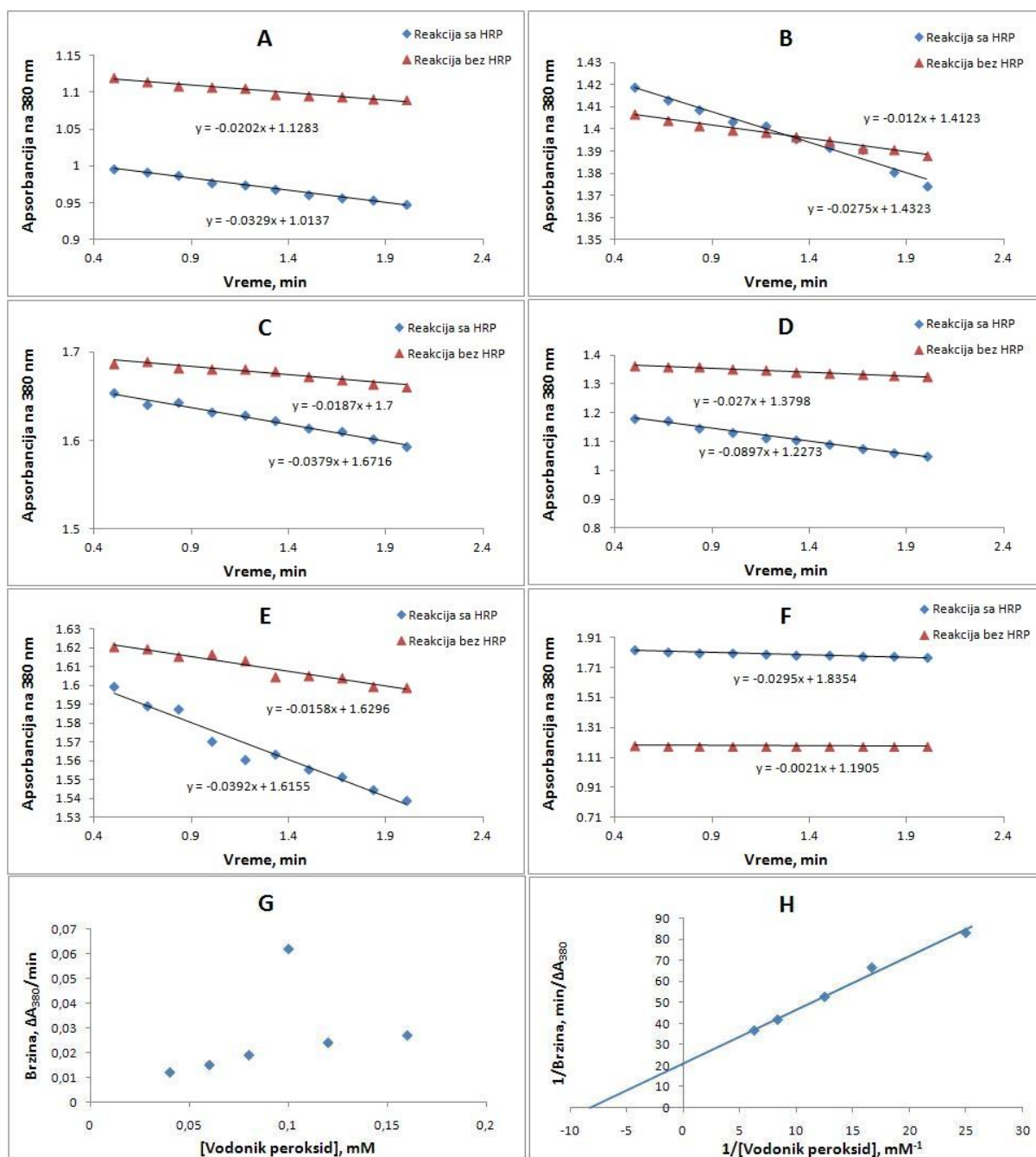
Slika P.14 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije kvercetina (0,06 mM) i L-cisteina (0,8 mM)..



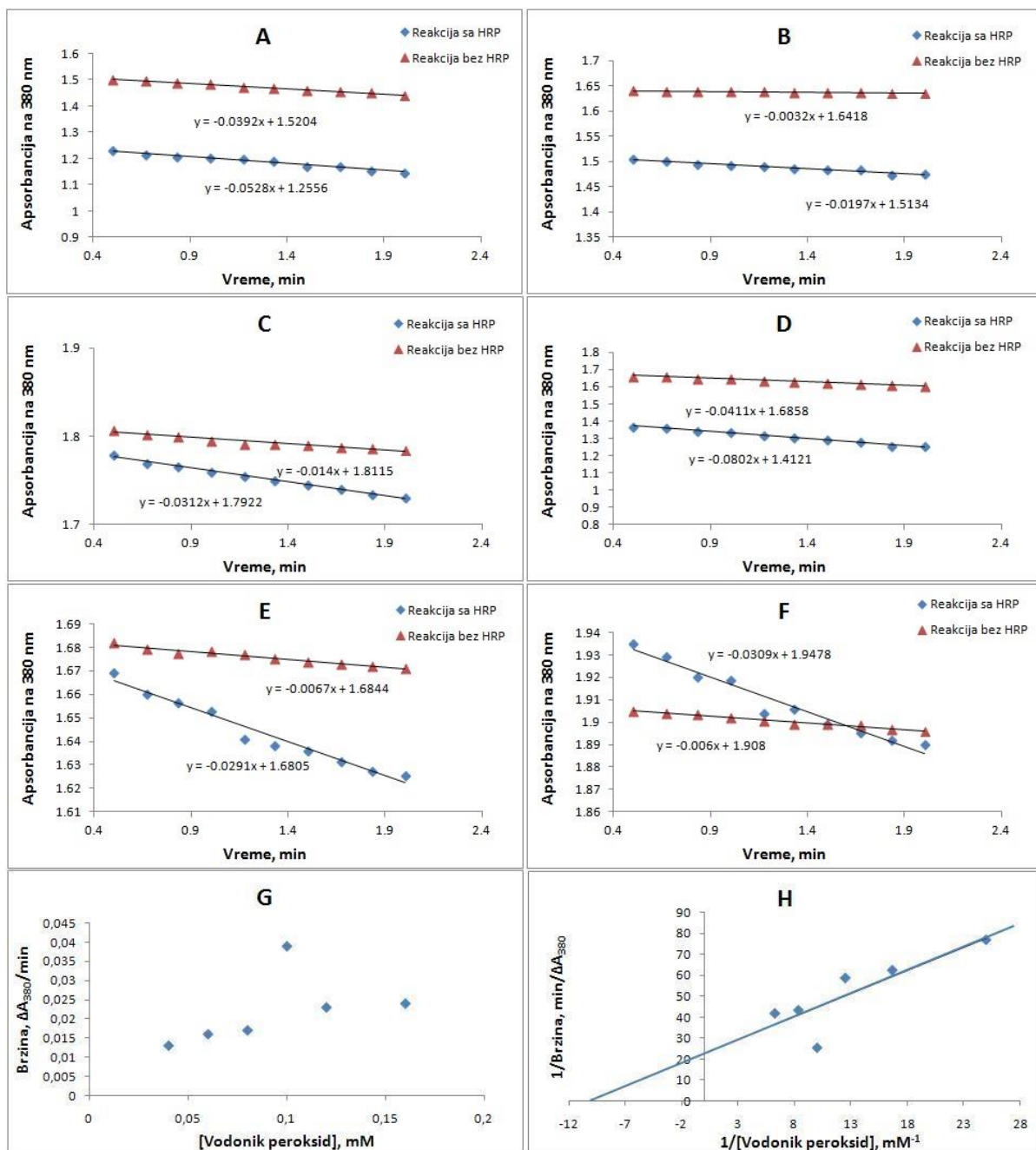
Slika P.15 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnriver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije kvercetina (0,08 mM) i L-cisteina (0,8 mM)..



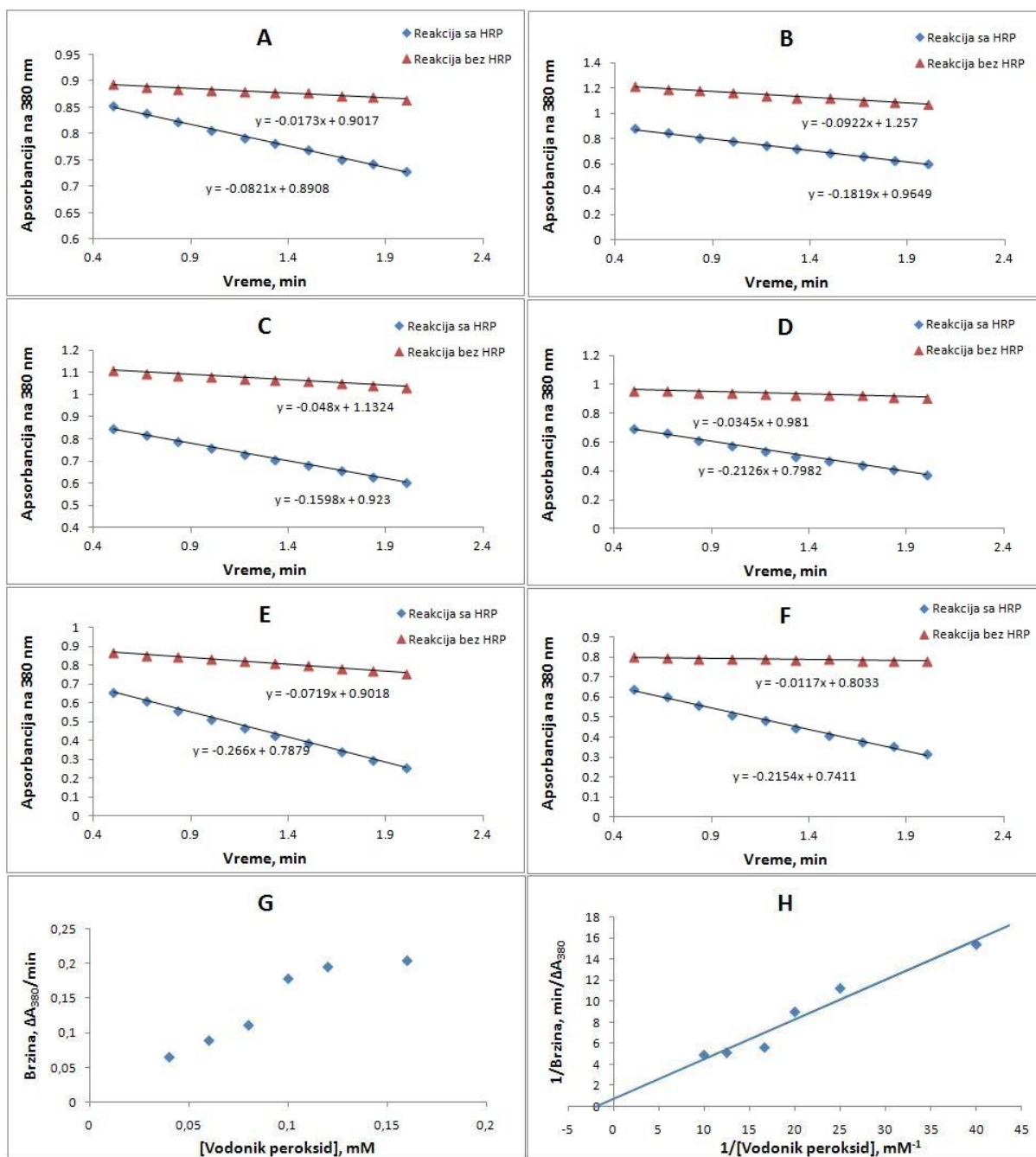
Slika P.16 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnriver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije kvercetina (0,1 mM) i L-cisteina (0,8 mM)..



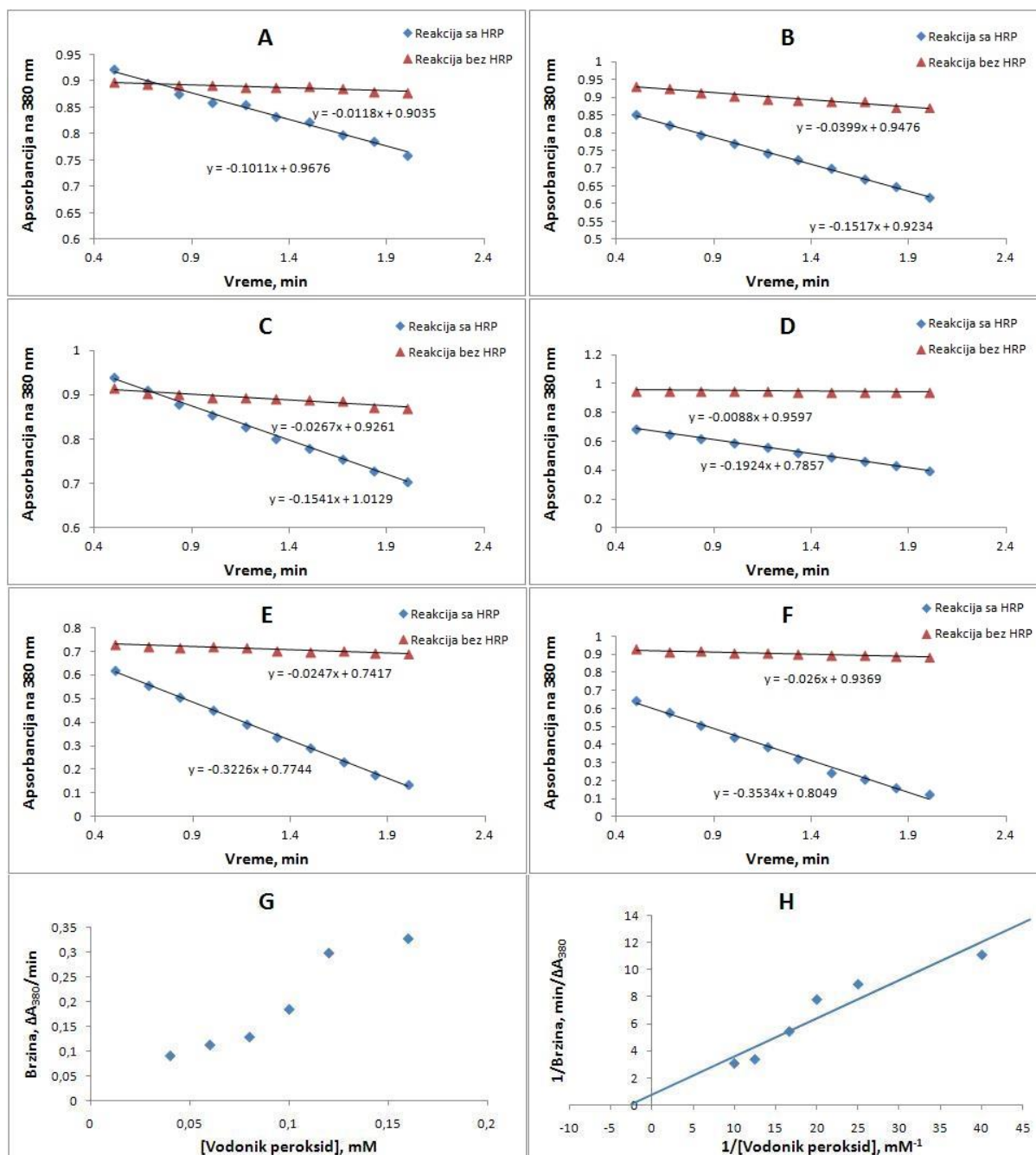
Slika P.17 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije kvercetina (0,11 mM) i L-cisteina (0,8 mM)..



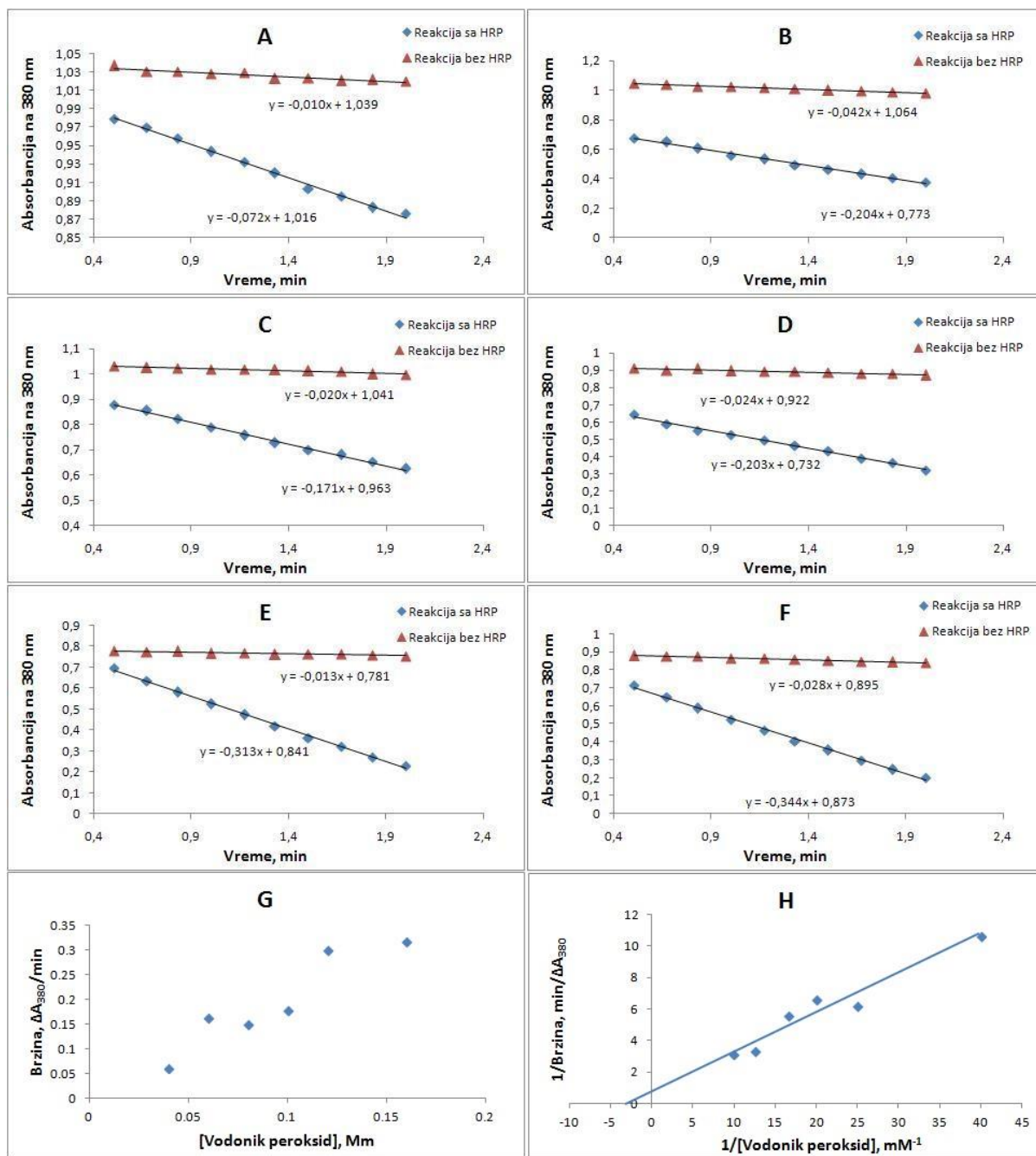
Slika P.18 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije kvercetina (0,12 mM) i L-cisteina (0,8 mM)..



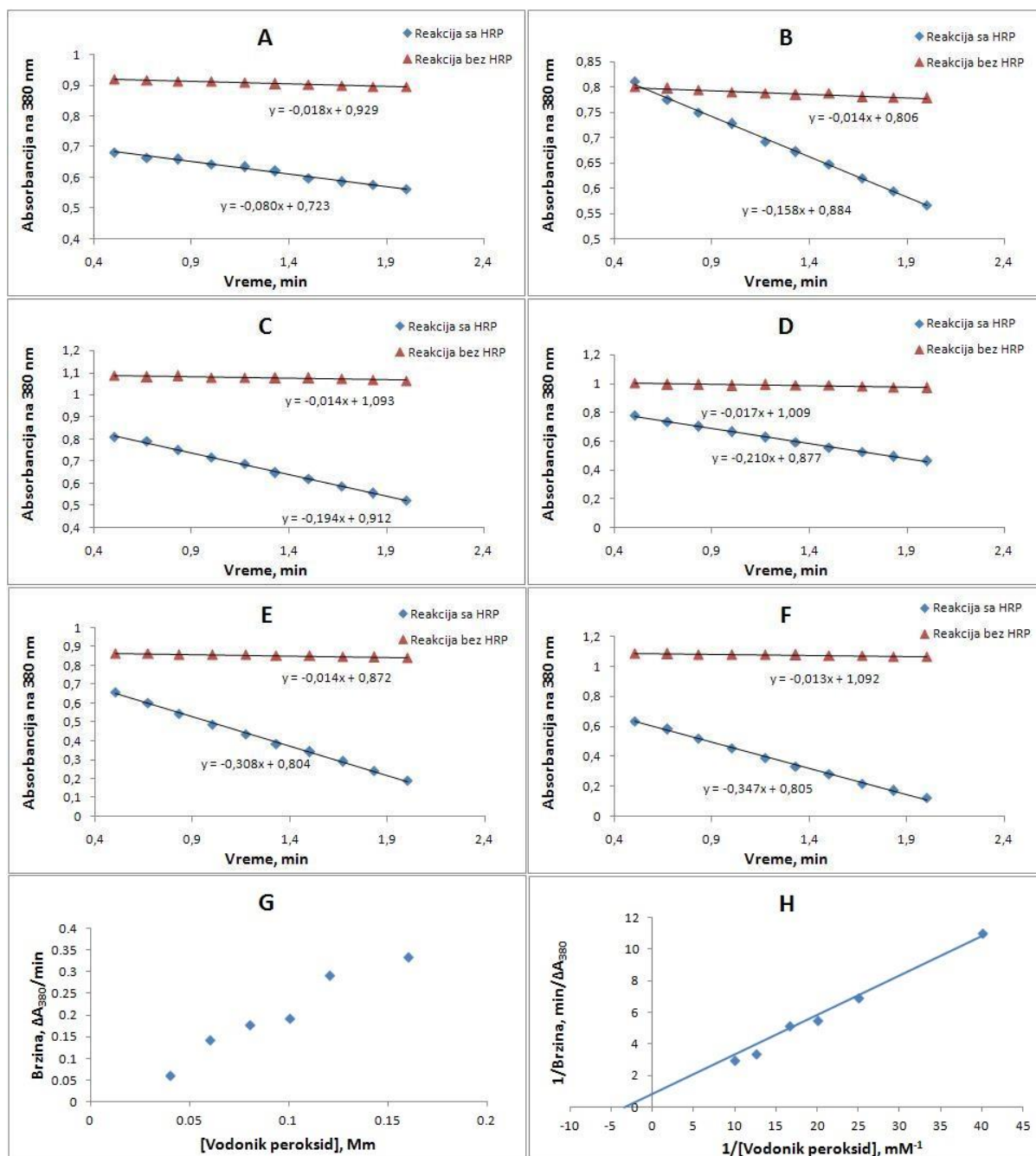
Slika P.19 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije L-cisteina (0,1 mM) i kvercetina (0,08 mM).



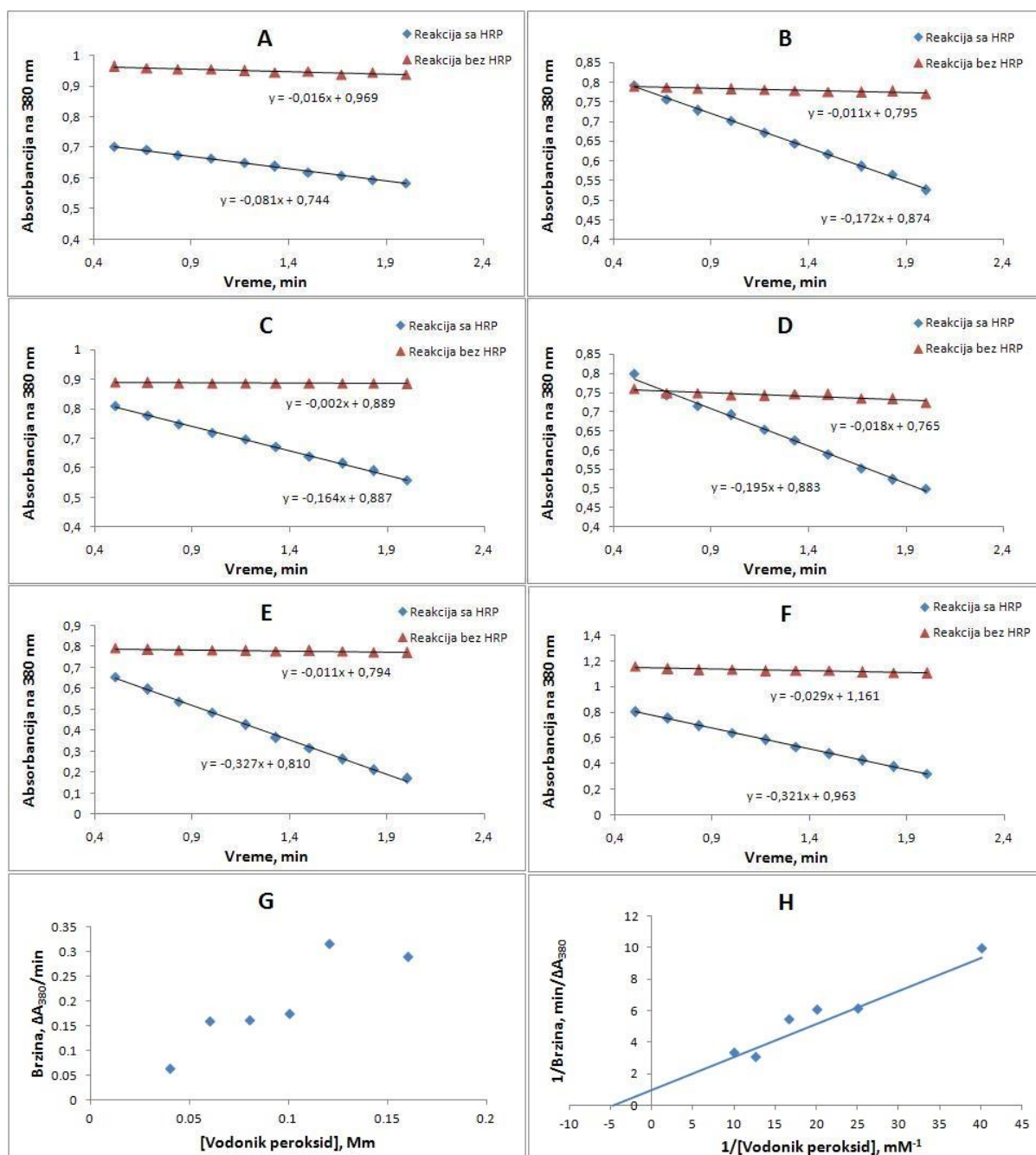
Slika P.20 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnriver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije L-cisteina (0,2 mM) i kvercetina (0,08 mM).



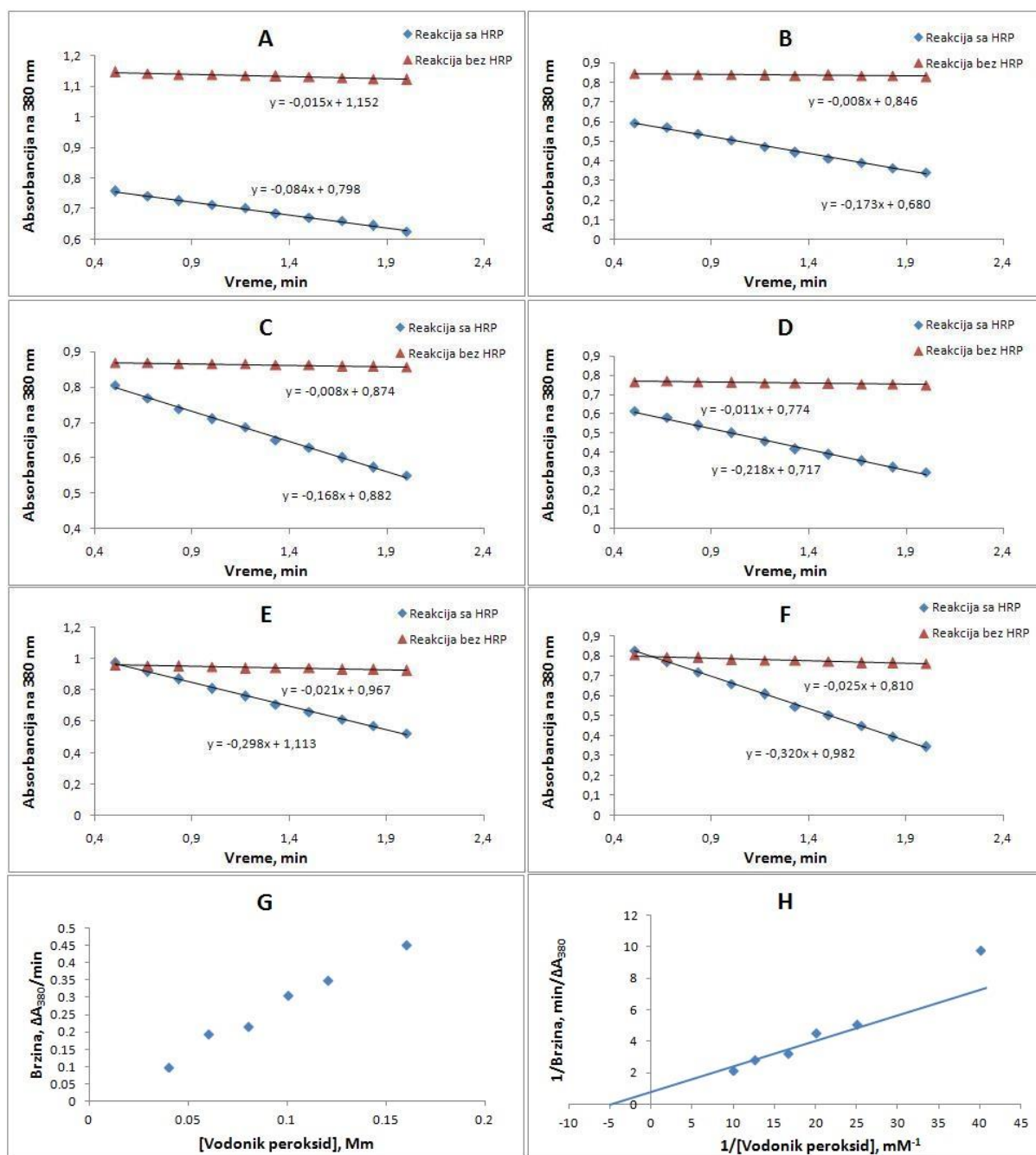
Slika P.21 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnriver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije L-cisteina (0,4 mM) i kvercetina (0,08 mM).



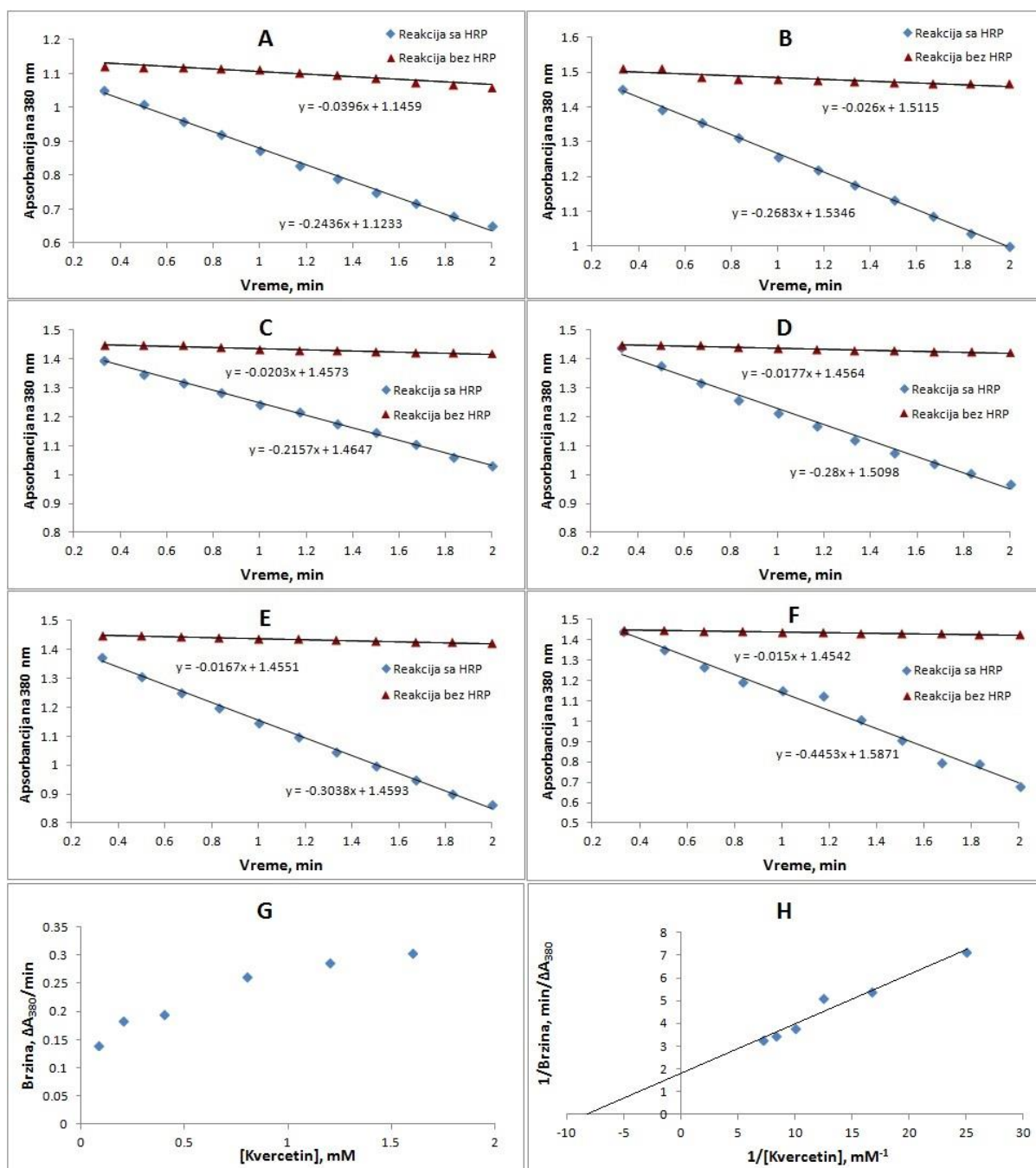
Slika P.22 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnriver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije L-cisteina (0,8 mM) i kvercetina (0,08 mM).



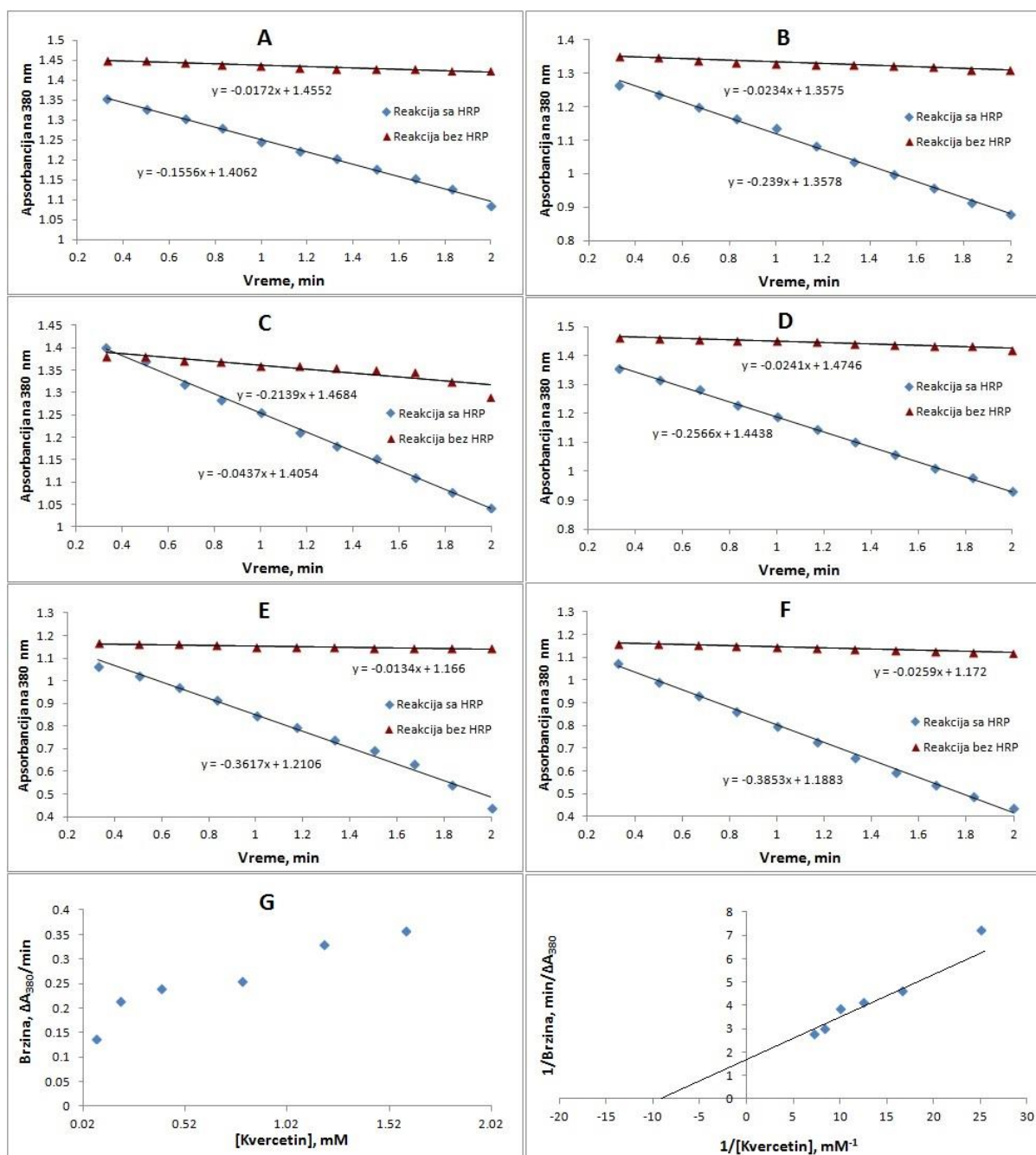
Slika P.23 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije L-cisteina (1,2 mM) i kvercetina (0,08 mM)..



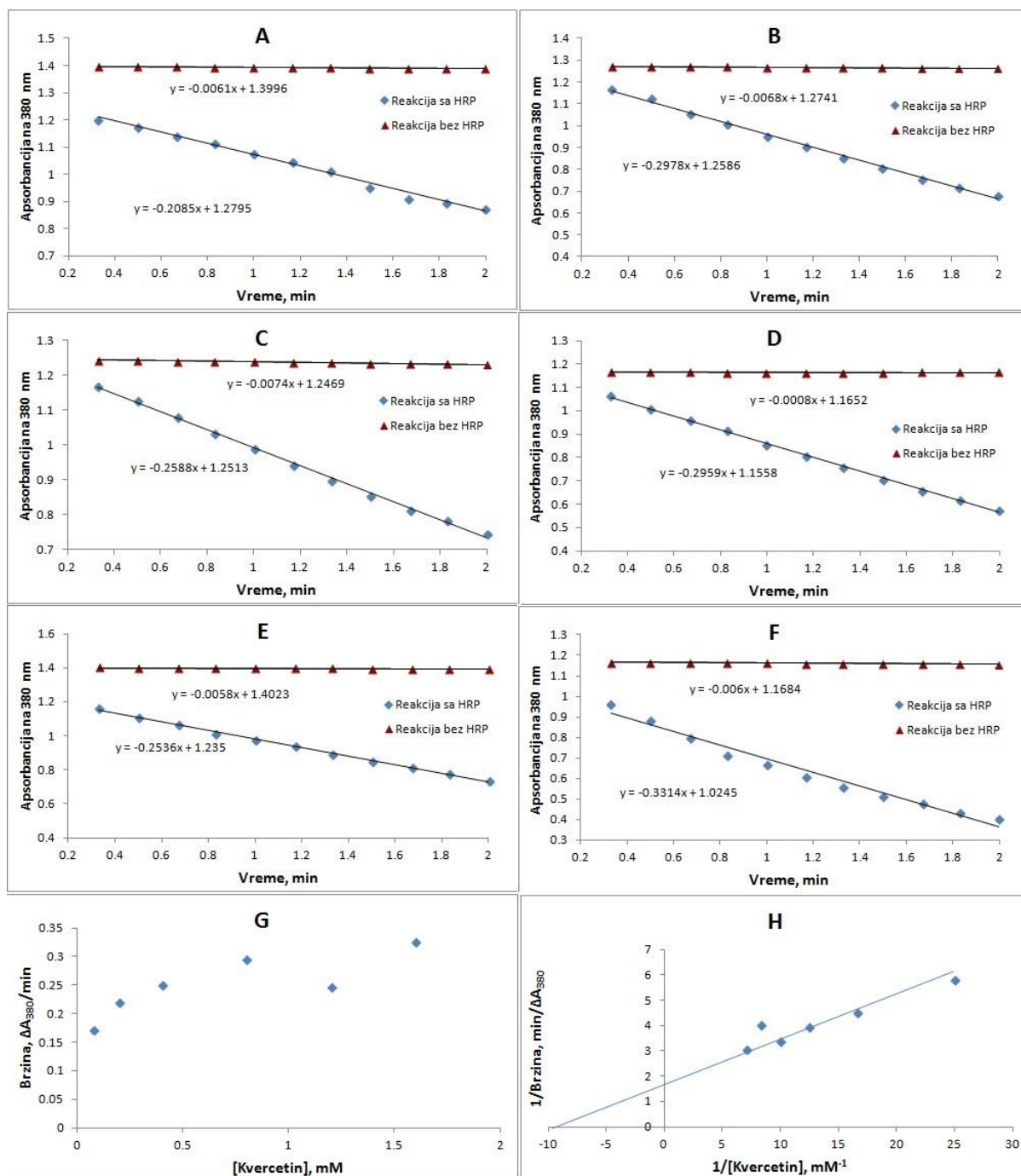
Slika P.24 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik peroksida (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije L-cisteina (1,6 mM) i kvercetina (0,08 mM).



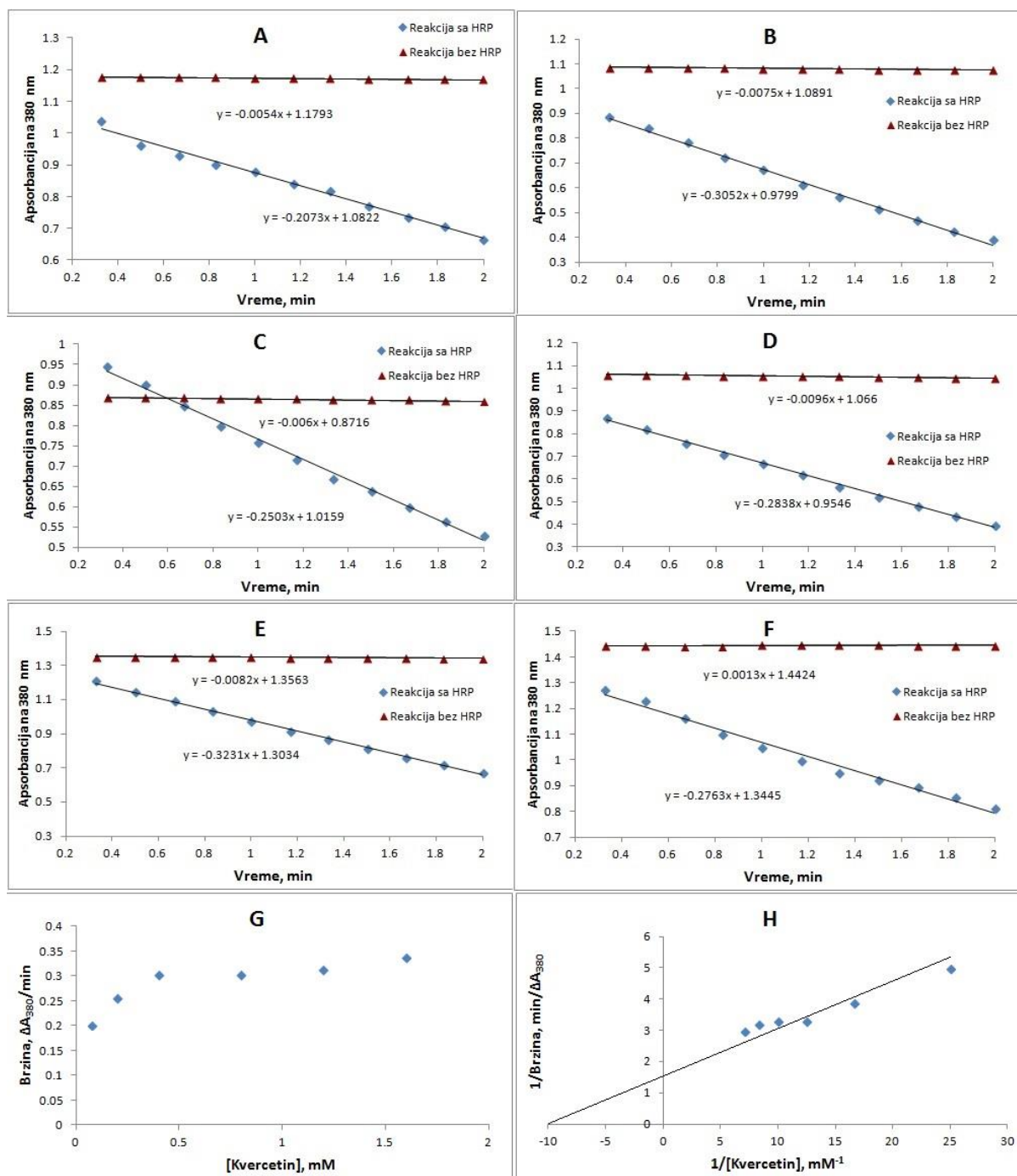
Slika P.25 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i L-cisteina (0,08 mM).



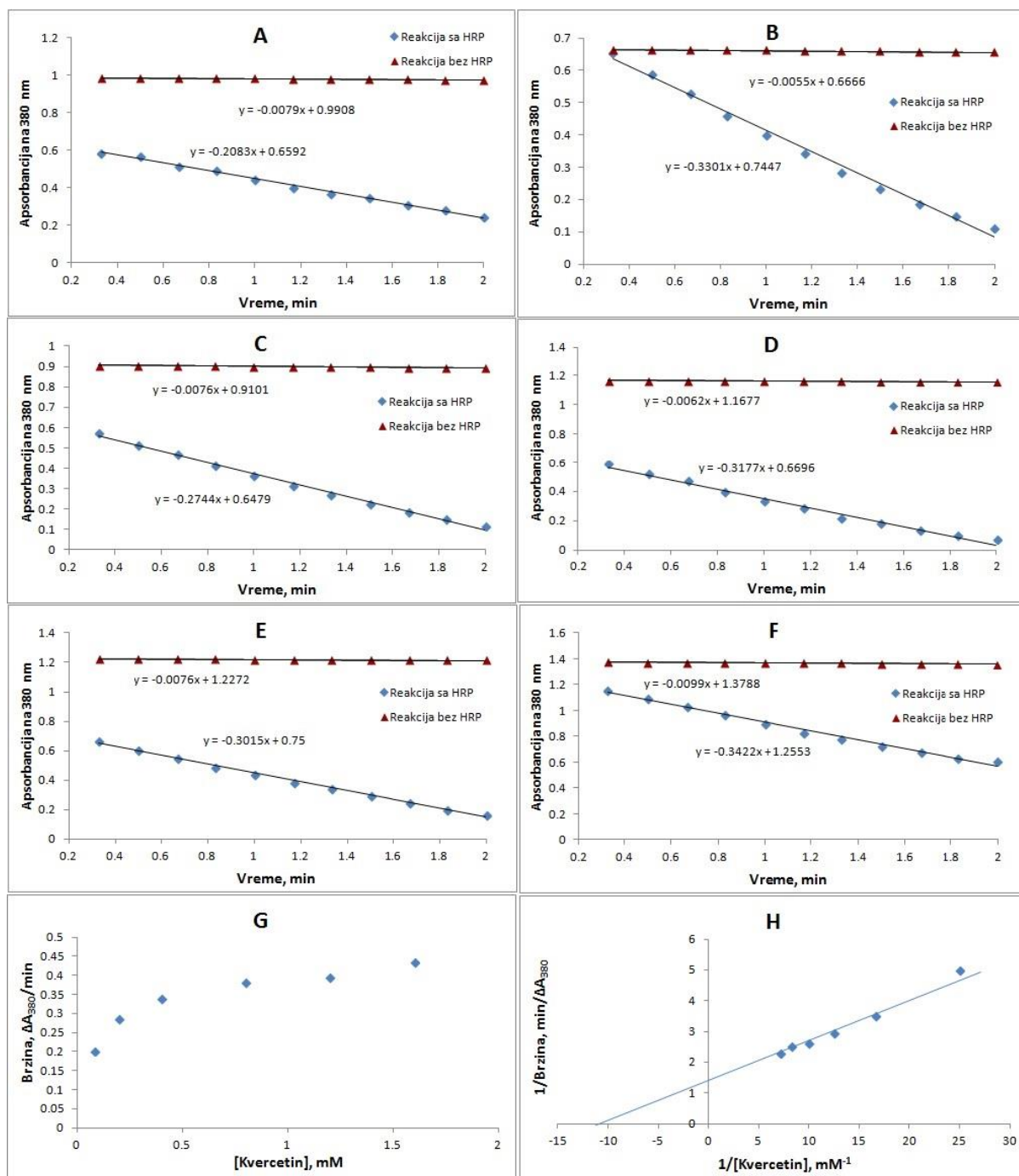
Slika P.26 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i L-cisteina (0,2 mM).



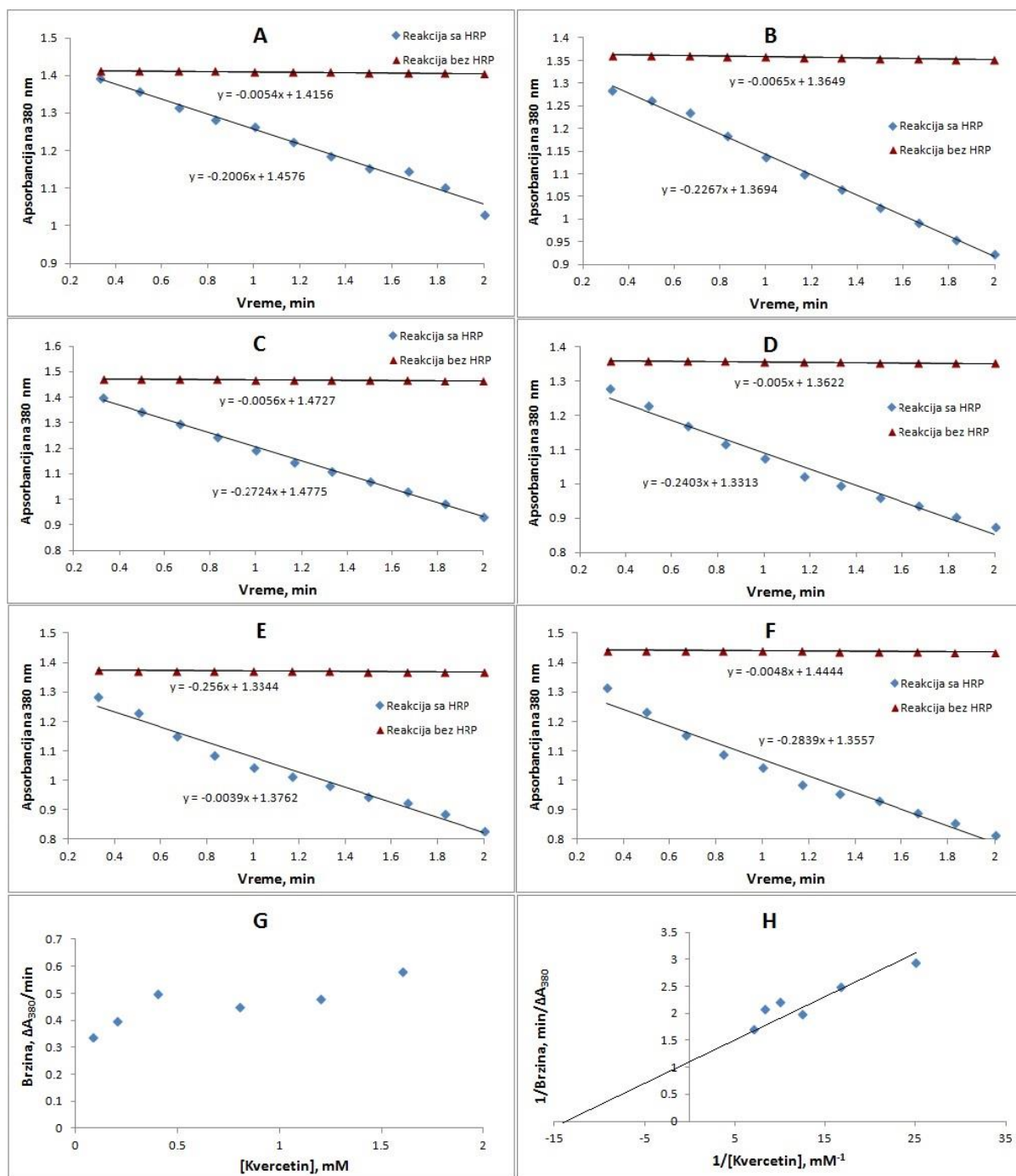
Slika P.27 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i L-cisteina (0,4 mM).



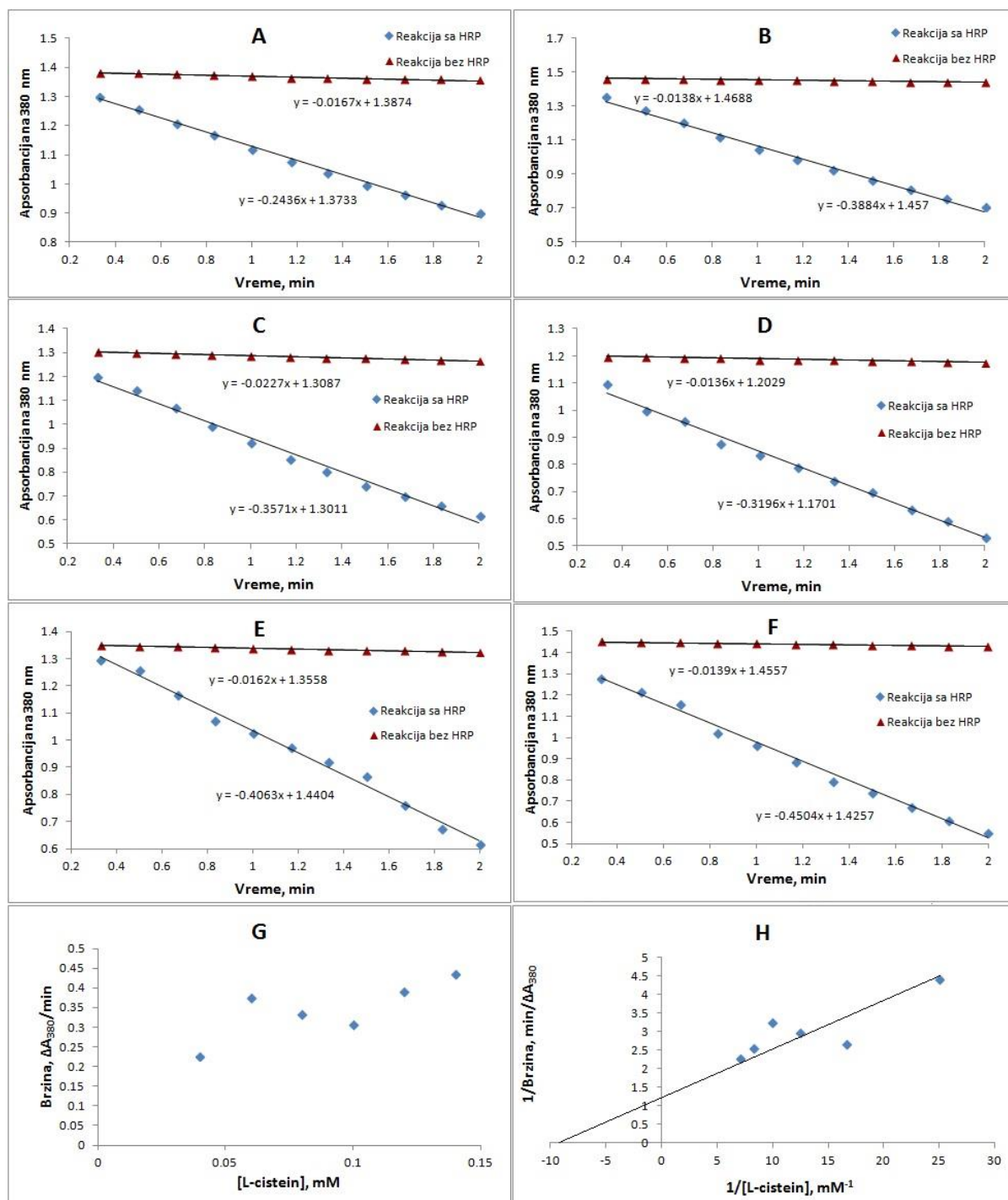
Slika P.28 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i L-cisteina (0,8 mM).



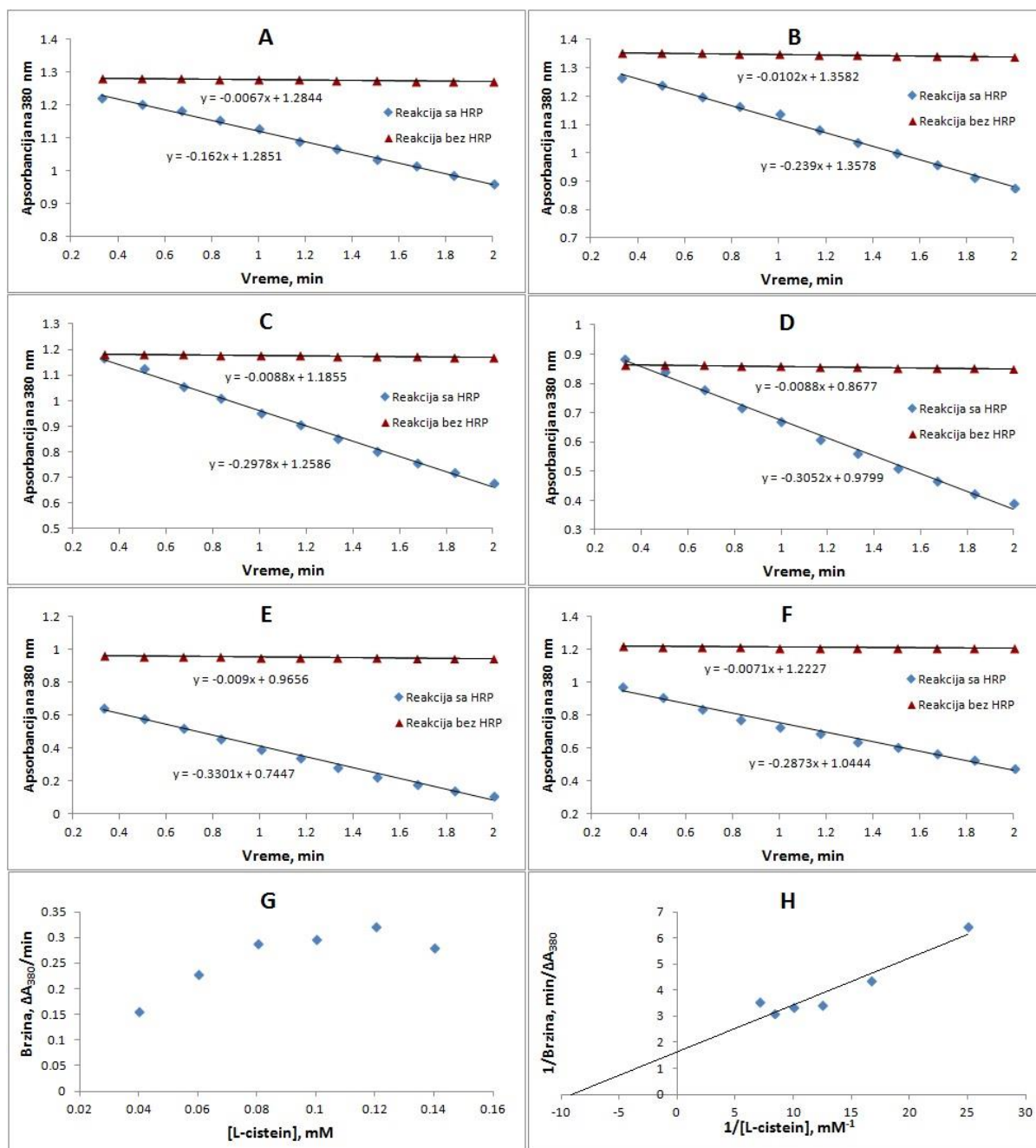
Slika P.29 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i L-cisteina (1,2 mM).



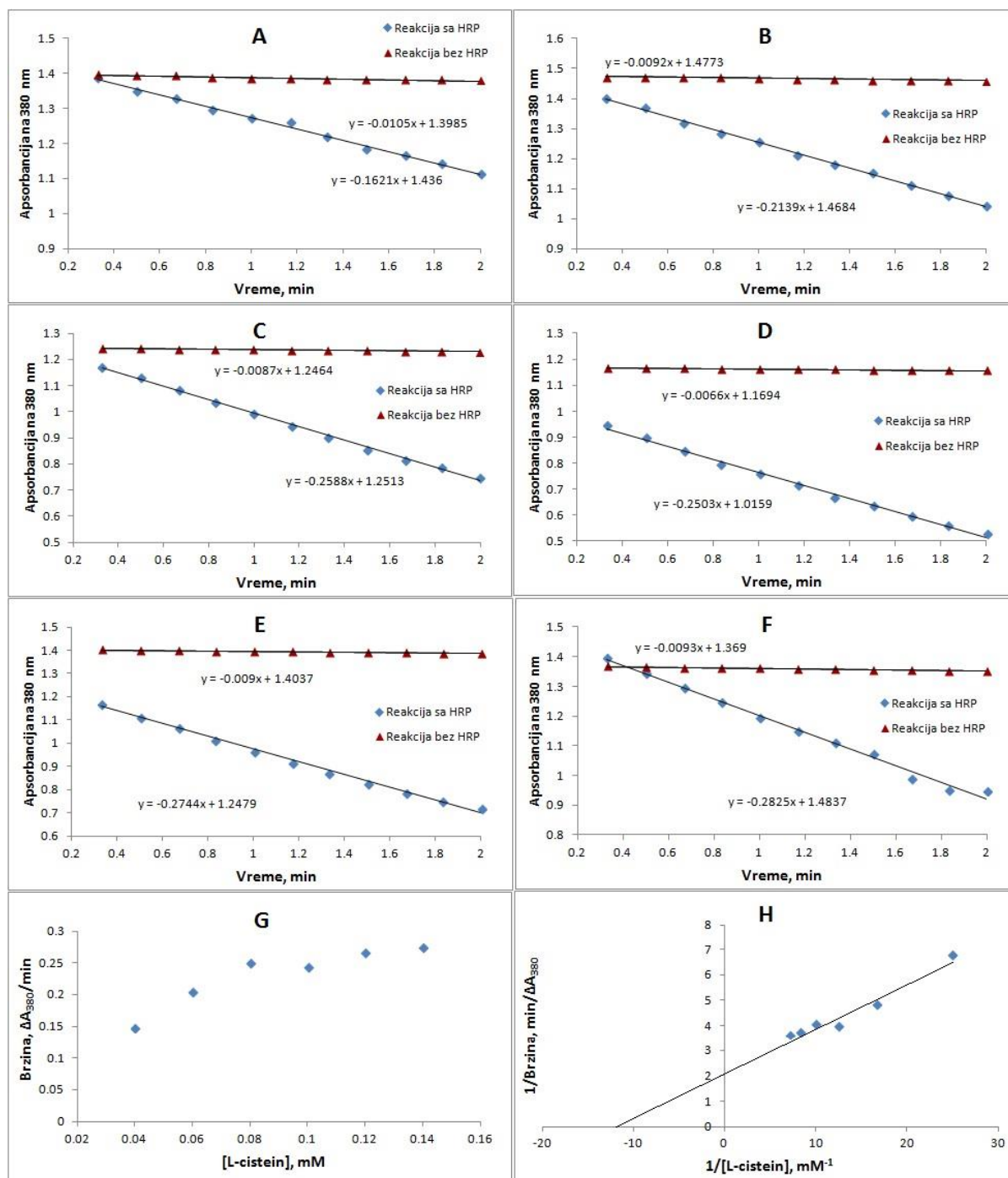
Slika P.30 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od koncentracije kvercetina (G) i Lajnviver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i L-cisteina (1,6 mM).



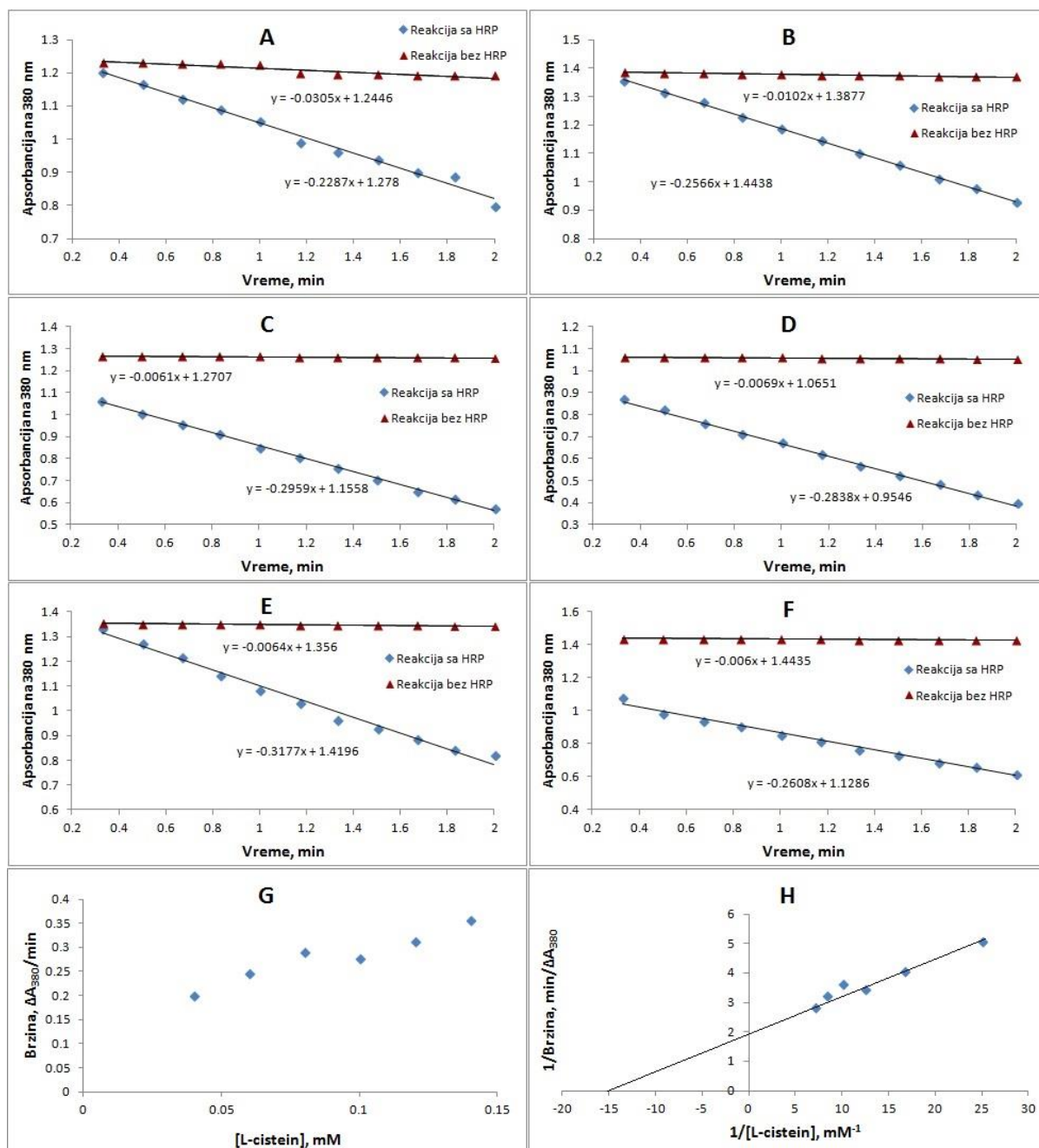
Slika P.31 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od L-cisteina (G) i Lajnriver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i kvercetina (0,04 mM).



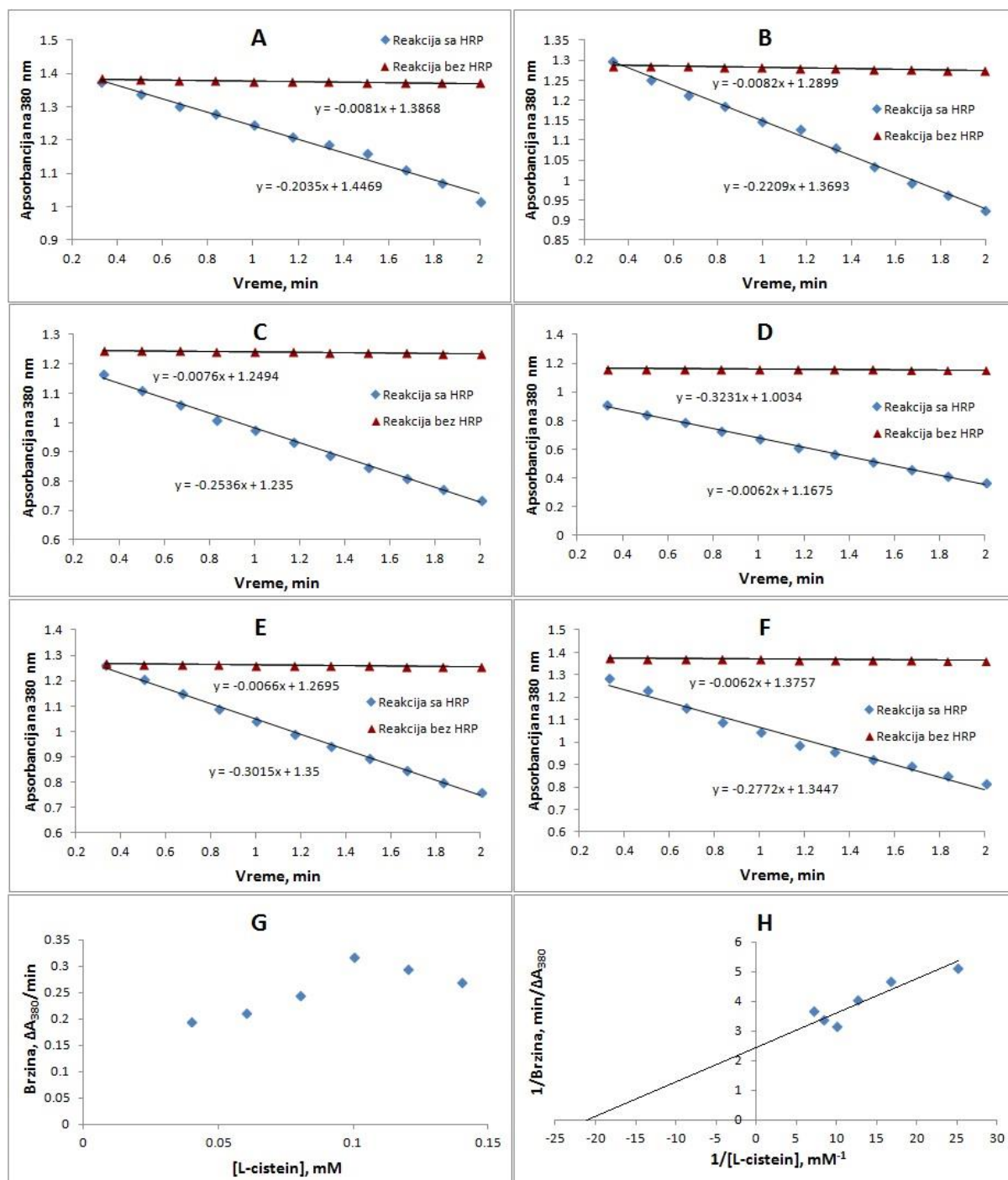
Slika P.32 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od L-cisteina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i kvercetina (0,06 mM).



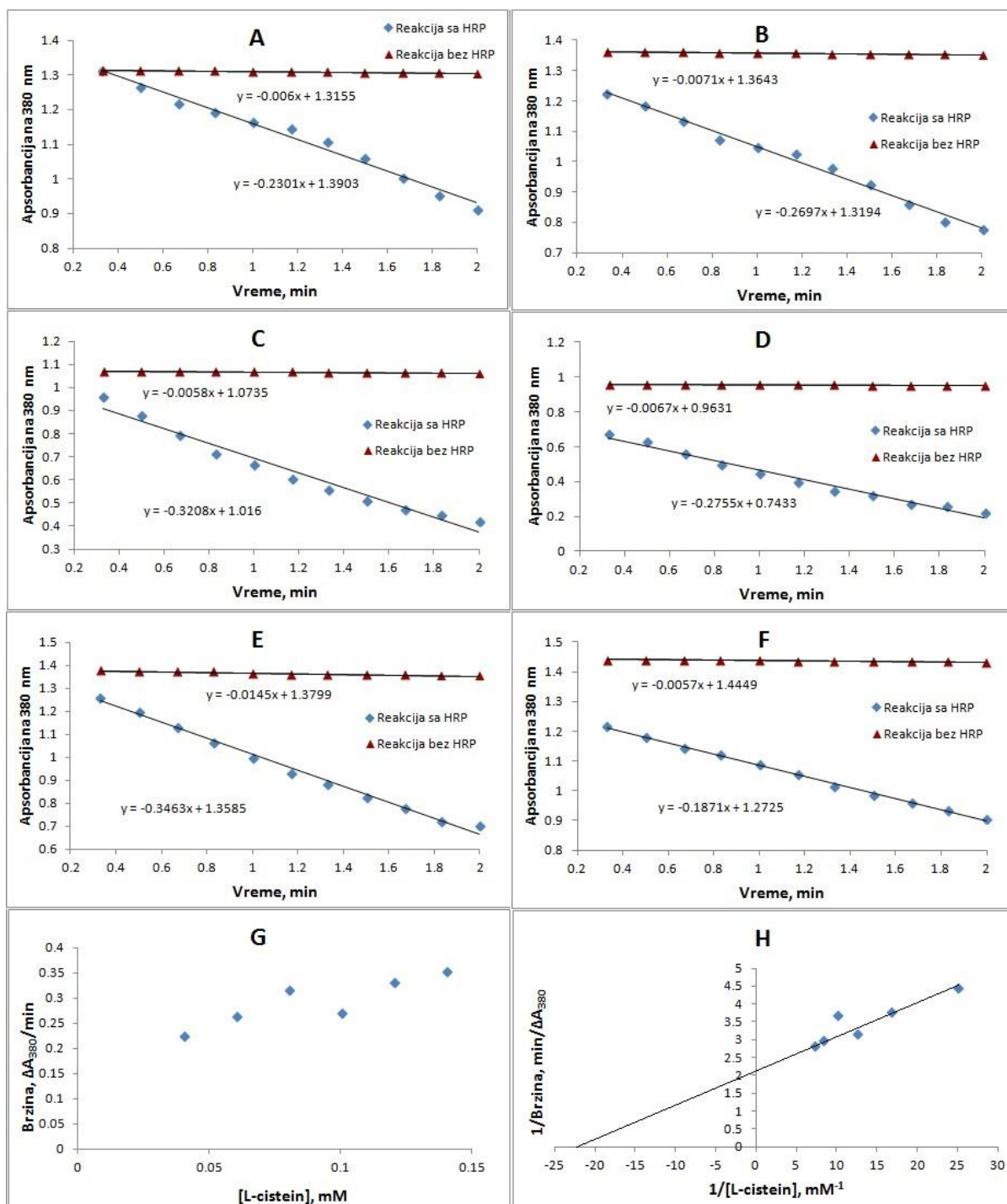
Slika P.33 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od L-cisteina (G) i Lajnriver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i kvercetina (0,08 mM).



Slika P.34 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od L-cisteina (G) i Lajnriver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i kvercetina (0,1 mM).



Slika P.35 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od L-cisteina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i kvercetina (0,12 mM).



Slika P.36 Promena apsorpcije tokom reakcije modifikacije kvercetina (A-F), zavisnost brzine reakcije od L-cisteina (G) i Lajniver-Berk-ov grafik (H), pri konstantnim vrednostima koncentracije vodonik peroksida (0,1 mM) i kvercetina (0,14 mM).

BIOGRAFIJA

Saša Savić, dipl. ing. tehnologije rođen je 9. septembra 1987. godine u Leskovcu. Srednju Medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar, završio je 2006. godine. Školske 2006/2007. godine upisao je Tehnološki fakultet u Leskovcu, na kome je diplomirao 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,8 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

U periodu studiranja nagrađivan je od strane Tehnološkog fakulteta u Leskovcu kao najbolji student godine u drugoj i četvrtoj godini studija. Školske 2009/2010. godine bio je dobitnik stipendije Fonda za mlade talente Republike Srbije. Kao najbolji student fakulteta 2011. godine bio je dobitnik godišnje nagrade koju grad Niš dodeljuje najboljim studentima Univerziteta u Nišu. Iste godine bio je dobitnik Povelje Univerziteta u Nišu kao najbolji diplomirani student Tehnološkog fakulteta u Leskovcu u školskoj 2009/2010. godini. Dobitnik je specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za postignut izuzetan uspeh tokom studiranja. Član je Srpskog hemijskog društva i Alumni centra Univerziteta u Nišu.

Doktorske akademske studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, na studijskom programu Tehnološko inženjerstvo, upisao je školske 2010/2011. godine i položio sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10. U novembru 2013. godine prijavio je temu doktorske disertacije pod naslovom „Enzimaska modifikacija kvercetina sa cisteinom pomoću peroksidaze iz rena“, koju je odobrilo Naučno-stručno veće za tehničko-tehnološke nauke Univerziteta u Nišu.

Od 2011. godine je na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu angažovan na izvođenju praktičnog dela nastave iz sledećih predmeta: Toksikološki aspekti prehrambene industrije, Primena enzima u prehrambenoj industriji, Enzimsko inženjerstvo, Mikrobne aktivne supstance, Molekularna genetika, Tehnologija biopolimera, Hemija polimera, Sušenje, hlađenje i zamrzavanje u procesnoj industriji i Termodinamika, a u periodu od 2011. do 2012. godine bio je angažovan u izvođenju praktične nastave i iz predmeta: Metode ispitivanja polimera, Polimerno inženjerstvo i Savremeni polimerni materijali. Kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, angažovan je na projektu iz oblasti tehnološkog razvoja pod nazivom „Biljni i sintetički bioaktivni proizvodi novije generacije“ (ev. br. TR 34012). Aktivno je učestvovao u izradi završnih/diplomskih radova studenata završnih godina studija, kao i u realizaciji studentskih naučno-istraživačkih radova.

Do sada je objavio tri rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), pet radova u međunarodnim časopisima (M23), tri saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33), dva saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34), tri rada u časopisima nacionalnog značaja (M52), šest saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64), dva nova tehnološka postupka (M83) i četiri nove metode (M85).

STRUČNO USAVRŠAVANJE

Saša Savić je do sada pohađao i uspešno završio sledeće:

- 7th Mass Spectrometry School – *The Mass Spectrometry in Environmental Pollutants Detection*, Niš, 30.05.–01.06.2012, organizovan od strane Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu i Université Pierre et Marie Curie, Pariz (Francuska),
- obuka za operatera na tečno-masenom sistemu u laboratoriji Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, održana od strane *Thermo Scientific*, oktobar 2012.,

- obuka za operatera na gasno-masenom sistemu, u laboratoriji Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, održana od strane *Agilent*, 14–24.05.2014.,
- osnovni kurs iz ICP Optičko-emisione Spektrofotometrije, održan od strane *Hemolab doo*, oktobar 2014.,
- praktična obuka za rad na ICP - OES instrumentu *SPECTRO ARCOS* u laboratoriji na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, održan od strane *Hemolab doo*, oktobar 2014.,
- stručna obuka za rad sa acetilenom, argonom, azotom, vodonikom, azotsuboksidom, helijumom, sintetičkim vazduhom, opremom, instalacijom za snabdevanje i posudama za skladištenje na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, održana od strane *Messer Tehnogas AD*, 09-10.06.2014.,
- obuka za rad na diferencijalno skenirajućem kalorimetru (*DSC*) u laboratoriji na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, održana od strane *TA Instruments*, april 2014., i
- *Advanced School of Mass Spectrometry – On Mass Frontier*, organizovano od strane Hemijskog fakulteta u Beogradu, *m/zCloud* i *Thermo Scientific*, Beograd, 10–11.12. 2014.

BIBLIOGRAFIJA RADOVA

СПИСАК РАДОВА КАНДИДАТА У КОЈИМА ЈЕ ОБЈАВЉЕН ДЕО РЕЗУЛТАТА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Rad u međunarodnom časopisu (M23=3)

1. **S. Savić**, Ž. Petronijević, Kinetics of enzymatic modification of quercetin with L-cysteine by horseradish peroxidase, Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 50 (2013) 221–226.
2. **S. Savić**, J. Stanojević, D. Marković, Ž. Petronijević, Quercetin oxidation by horseradish peroxidase: The effect of UV-B irradiation, Hemijska industrija, 67(3) (2013) 411–418.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64=0,2)

3. Ž. Petronijević, **S. Savić**, The kinetics of the enzymatic modification of quercetin with L-cysteine by using horseradish peroxidase, IX Simpozijum, „Savremene tehnologije i privredni razvoj sa međunarodnim učešćem“, Zbornik izvoda radova, str. 47, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac, 21 i 22 oktobar (2011).
4. **S. Savić**, Ž. Petronijević, Kinetics mechanism of enzymatic modification of quercetin with cysteine by horseradish peroxidase, 22nd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstract, str. 100, Ohrid, Makedonija, 05-09 septembar (2012).

Nova metoda (M85=2)

5. **S. Savić**, Ž. Petronijević, LC-MS metoda za identifikaciju proizvoda u reakciji kvercetina sa peroksidazom iz rena, Ev. br. 06-2363/1, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, 20.12.2013.
6. **S. Savić**, Ž. Petronijević, Metoda za imobilizaciju peroksidaze iz rena na benzoil celuloznim nosačima, Ev. br. 06-2364/1, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, 20.12.2013.

СПИСАК РАДОВА КАНДИДАТА КОЈИ СУ У ВЕЗИ СА ДИСЕРТАЦИЈОМ

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21=8)

7. **S. Savić**, K. Vojinović, S. Milenković, A. Smelcerović, M. Lamshoeft, Ž. Petronijević, Enzymatic oxidation of rutin by horseradish peroxidase: Kinetic mechanism and identification of a dimeric product by LC-Orbitrap mass spectrometry, Food Chemistry, 141 (2013) 4194–4199.

Rad u međunarodnom časopisu (M23=3)

8. S. Petrović, **S. Savić**, D. Marković, Ž. Petronijević, *In vitro* studies of temperature and pH influence on chlorophyll degradation by horseradish peroxidase: Spectroscopic and HPLC studies, Hemijska industrija, 68(2) (2014) 207–212.

9. **S. Savić**, S. Stojmenović, M. Petronijević, Ž. Petronijević, Phenol removal from aqueous solution by peroxidase extracted from horseradish, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50(2) (2014) 214–218.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34=0,5)

10. **S. Savić**, K. Vojinovic, A. Smelcerovic, Z. Petronijevic, Kinetics mechanism of enzymatic oxidation of rutin by horseradish peroxidase, 15th European congress on biotechnology „Bio-crossroads“, New Biotechnology, 1.5.48, str. 96, Vol. 29, Istanbul, Turkey, 23-26 September (2012).

Rad u časopisu nacionalnog značaja (M52=1,5)

11. **S. Savić**, M. Nikolić, Ž. Petronijević, Kinetic mechanism of enzymatic modification of rutin with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone by horseradish peroxidase, *Advanced technologies*, 2(1) (2012) 35–40.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64=0,2)

12. S. Petrović, **S. Savić**, D. Marković, Ž. Petronijević, Degradacija hlorofila a pomoću peroksidaze iz rena: Identifikacija proizvoda i uticaj temperature, X Simpozijum, „Savremene tehnologije i privredni razvoj sa međunarodnim učešćem“, Zbornik izvoda radova, str. 99, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac, 22 i 23 oktobar (2013).
13. **S. Savić**, K. Vojinović, A. Šmelcerović, Ž. Petronijević, Kinetika oksidacije rutina pomoću peroksidaze iz rena, X Simpozijum, „Savremene tehnologije i privredni razvoj sa međunarodnim učešćem“, Zbornik izvoda radova, str. 57, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac, 22 i 23 oktobar (2013).
14. **S. Savić**, S. Stojmenović, M. Petronijević, Ž. Petronijević, Uklanjanje fenola pomoću peroksidaze iz rena, X Simpozijum, „Savremene tehnologije i privredni razvoj sa međunarodnim učešćem“, Zbornik izvoda radova, str. 58, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac, 22 i 23 oktobar (2013).

Novi tehnološki postupak (M83=4)

15. **S. Savić**, S. Stojmenović, Ž. Petronijević, Laboratorijski tehnološki postupak za uklanjanje fenola iz vodenog rastvora pomoću peroksidaze dobijene ekstrakcijom iz rena, Ev. br. 06-2180/1, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, 27.12.2012.



Универзитет у Нишу

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
ЕНЗИМСКА МОДИФИКАЦИЈА КВЕРЦЕТИНА СА ЦИСТЕИНОМ
ПОМОЋУ ПЕРОКСИДАЗЕ ИЗ РЕНА

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Лесковцу, 16.07.2015

Аутор дисертације: Саша Савић

Потпис аутора дисертације:



Универзитет у Нишу

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Саша Савић

Наслов дисертације: ЕНЗИМСКА МОДИФИКАЦИЈА КВЕРЦЕТИНА СА
ЦИСТЕИНОМ ПОМОЋУ ПЕРОКСИДАЗЕ ИЗ РЕНА

Ментор: Проф. др Живомир Петронијевић

Изјављујем да је штампани облик моје докторске дисертације истоветан електронском облику, који сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

У Лесковцу, 16.07.2015

Потпис аутора дисертације:



Универзитет у Нишу

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ЕНЗИМСКА МОДИФИКАЦИЈА КВЕРЦЕТИНА СА ЦИСТЕИНОМ

ПОМОЋУ ПЕРОКСИДАЗЕ ИЗ РЕНА

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у Упутству).

У Лесковцу, 16.07.2015

Аутор дисертације: Саша Савић

Потпис аутора дисертације:
