

# Ispitivanje mogućnosti korišćenja antrahinonske boje Acid green 25 kao medijatora u degradaciji drugih sintetskih boja slobodnom i imobilizovanom lakazom

---

Lakaza spada u oksidoreduktaze kojima je za degradaciju sintetskih boja najčešće neophodno prisustvo medijatora, zbog čega je ispitano da li antrahinonska boja Acid green 25 može posredovati u ovakvim reakcijama. Degradirane su četiri boje (indigo karmin, brom-fenol plavo, rodamin B i malahitno zeleno) na prethodno određenoj optimalnoj pH, a reakcije praćene bez medijatora i uz ABTS ili boju acid green kao medijator. Enzim je inkapsuliran kalcijum-alginatom radi poređenja reakcija degradacije boje acid green slobodnom i imobilizovanom lakazom na 18 različitih pH vrednosti u opsegu 2–10.5. Ispitano je da li je inkapsulirani enzim manje osetljiv na promene pH vrednosti i može li imobilizat biti korišćen za degradaciju boje nakon završenog prvog ciklusa degradacije. Pokazano je da antrahinonska boja može biti medijator u degradaciji dve boje (indigo karmin i brom-fenol plavo), sa uspešnošću degradacije od 64 i 18 procenata, respektivno. Variranjem uslova inkapsulacije lakaze kalcijum-alginatom određeno je da odnos enzima, natrijum-alginata i kalcijum-hlorida treba da bude 1 : 2 : 12, a koncentracija natrijum alginata 4%, kako bi dobijeni imobilizat zadržao najveći deo aktivnosti enzima. Imobilizat lakaze u alginatu pokazuje isti trend aktivnosti u zavisnosti od pH kao i sam ekstrakt i sa manjom efikasnošću može biti korišćen za ponovnu degradaciju.

---

## Uvod

Sintetske boje, koje su našle široku primenu u brojnim granama industrije, kao što su tekstilna industrija, industrija kože, proizvodnja papira i hrane, predstavljaju glavni industrijski izvor zagađenosti vode. Otpadne vode iz tekstilne industrije karakteriše visoka koncentracija boja, njihovih biološki aktivnih metabolita, veliki sadržaj mineralnih materija, visoka temperatura i različita pH vrednost. Značajna količina boja, posebno pri upotrebi rastvornih boja, gubi se tokom industrijskih procesa i preko otpadnih voda dospeva u prirodne vodotokove i stajaće vode. Prisustvo tek-

---

Milica Perić (1996),  
Valjevo, Naselje  
Oslobodioci Valjeva  
85/14, učenica 4.  
razreda Medicinske  
škole „Dr Miša  
Pantić”

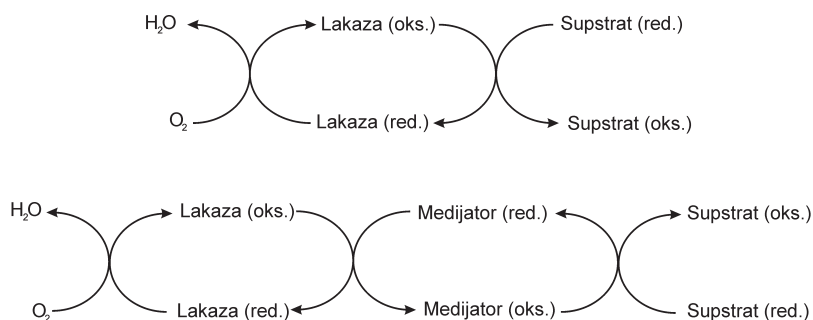
MENTOR: Jelica  
Milošević, student  
doktorskih studija na  
Hemijskom fakultetu  
Univerziteta u  
Beogradu

stilnih boja u prirodnim vodama deluje štetno na vodeni ekosistem zbog apsorpcije i rasejavanja Sunčevih zraka, što bitno otežava proces fotosinteze. Takođe, poznato je da mnoge rastvorene tekstilne boje pod dejstvom Sunčevog zračenja i mikroorganizama podležu degradaciji uz nastajanje toksičnih proizvoda od primarnih molekula. Stoga je neophodno ukloniti sintetske boje iz industrijskih otpadnih voda pre njihovog ispuštanja u prirodne recipijente.

Po svojoj hemijskoj strukturi sintetske boje su veoma raznolike, a neke od najviše korišćenih grupa u industriji su azo, antrahinonske, akridinske, ksantanske, indigoidne, tiazinske, tiazolne i druge boje (Murugesan 2007).

Za uklanjanje sintetskih boja razvijene su razne fizičko-hemijske metode: jonska izmena, reverzna osmoza i druge (Abid 2012). Primenljivost ovih metoda ograničava to što su uglavnom skupe, boja kao otpad se zadržava, a kasnije se mora degradirati i odložiti. Enzimska oksidacija sintetskih boja oksidoreduktazama, kao što su lakaze, sve se više proučava zbog svoje efikasnosti.

Lakaze su bakar-zavisne polifenoloksidaze, kod kojih je bakar(II) vezan u okviru aktivnog centra enzima. Mogu biti izolovane iz raznih izvora: biljaka, gljiva, prokariota, insekata (Claus 2004). Vrlo su dobri biokatalizatori zbog toga što kao kosupstrat koriste kiseonik, kao proizvod reakcija nastaje voda, a imaju i veoma nisku specifičnost prema supstratima, koji mogu biti i sintetske boje (Wong 1999). Mehanizam oksidoredukcione reakcije između lakaze i supstrata prikazan je na slici 1.



Slika 1.  
Šematski prikaz oksidacije supstrata lakazom, bez prisustva i u prisustvu medijatora (prema Riva 2006)

Figure 1.  
Schematic representation of substrate oxidation by laccase, with and without presence of mediator (Riva 2006)

Boje koje su derivati antrahinona su direktni supstrati za lakazu, pa se zato reakcija odvija bez prisustva medijatora. I pored niske specifičnosti ovog enzima prema supstratima, ranija istraživanja su pokazala da nisu sve klase sintetskih boja direktni supstrati za lakazu. Za oksidaciju nekih boja neophodno je prisustvo medijatora koji će posredovati između enzima i supstrata. ABTS, (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina), direktan je supstrat za peroksidaze uz vodonik-peroksid i bakar-zavisne oksidaze, u koje spada lakaza. Kao takav, može se ponašati i kao medijator

u oksidoredukcionim reakcijama sa jedinjenjima koja nisu direktni supstrati za odgovarajuće enzime.

Pored prednosti koje pruža enzimska degradacija sintetskih boja, postoje i problemi koji još uvek nisu u potpunosti prevaziđeni: enzimi su aktivni u relativno uskom opsegu za njih karakterističnih pH vrednosti. Takođe, za obezbojavanje stotina litara otpadnih industrijskih voda, potrebne su i velike količine enzima. Rešenje oba ova problema pruža imobilizacija enzima na pogodan način.

Imobilizacija je skup tehnika kojima se ograničava kretanje i olakšava rukovanje enzimom, pri čemu enzimski aktivnost ostaje očuvana. Imobilizovani enzim se jednostavno može ukloniti iz sistema odvajanjem imobilizata od ostatka smeše i potencijalno ponovo koristiti. Jedna od metoda imobilizacije je inkapsulacija enzima, koja podrazumeva formiranje selektivno propustljive polimerne kapsule oko molekula enzima (Nahakpam *et al.* 2008). Inkapsulacija enzima formiranjem gel kapsula kalcijum-alginata je jedna od najjeftinijih i najjednostavnijih, pa stoga i najviše korišćenih metoda inkapsulacije (Williamson *et al.* 2013).

**Cilj** ovog rada je ispitivanje mogućnosti korišćenja antrahinonske boje Acid green 25 kao medijatora pri oksidaciji sintetskih boja koje nisu direktan supstrat za lakazu, radi potencijalne upotrebe pri degradaciji smese ovih boja. U okviru toga ispitano je i da li je inkapsulirani enzim manje osetljiv na promene pH vrednosti, kao i da li inkapsulirani enzim nakon degradacije boja može biti ponovo korišćen.

## Materijal i metode

Za reakcije degradacije korišćen je sirov ekstrakt lakaze produkovan iz gljive *Trametes versicolor* (ćuranov rep). Ekstrakt je čuvan na temperaturi  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Određivanje koncentracije lakaze.** Koncentracija proteina u ekstraktu određena je Bredfordovom metodom, koja se zasniva na vezivanju boje Coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250) za protein, pri čemu se apsorpcioni maksimum boje pomera sa 465 nm na 595 nm (kompleks protein-boja). Meri se porast apsorbanca na 595 nm. Radi konstruisanja kalibracione prave, napravljen je rastvor goveđeg seruma albumina (BSA) u vodi, koncentracije 1 mg/mL. Slepu probu su činili Bredfordov reagens i voda, dok je u ostale dodavana različita zapremina rastvora BSA čime je napravljeno šest rastvora različitih koncentracija u opsegu od 0.2 do 1.0 mg/mL (Vujčić 2002). Reakcionu smešu činilo je 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta lakaze i 2.5 mL Bredfordovog reagensa. Apsorbancija je snimana nakon pola sata, koliko je vreme potrebno za razvijanje kompleksa protein-boja. Koncentracija enzima očitana je sa kalibracione prave.

**Određivanje aktivnosti lakaze.** Enzimski aktivnost određena je pripremanjem esejja sa ABTS-om (koncentracija 50 mmol/L) na 18 različitih pH vrednosti, od 2 do 10.5 u intervalima od 0.5 pH jedinica. Merena je apsorbanca rastvora na talasnoj dužini od 420 nm, na kojoj je

apsorpcioni maksimum oksidovanog oblika ABTS-a. Apsorbancija je snimana svakih 10 sekundi tokom dva minuta i izračunata enzimska aktivnost izražena je u internacionalnim jedinicama. Jedna jedinica (U) definisana je kao količina enzima koja transformiše 1  $\mu\text{mol}$  supstrata po minuti na 25°C.

Reakciona smeša sadržala je 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta enzima, 400  $\mu\text{L}$  ABTS-a i 1.1 mL pufera (acetatnog za pH od 2 do 5.5 i fosfatnog za pH vrednosti od 6 do 10.5). Koncentracija svih pufera bila je 0.1 M.

**Ispitivanje medijatora.** Reakcije degradacije ispitivane su sa sledećim bojama: Acid green 25 (Sigma Aldrich), indigo karmin, brom-fenol plavo, rodamin B, malahitno zeleno (Kemika). Korišćeni su rastvori koncentracija 10 g/L, koji su potom razblaživani 150 puta acetatnim puferom. Ispitano je da li su navedene boje direktni supstrati za lakazu praćenjem reakcija čije su reakcione smeše sadržale 200  $\mu\text{L}$  ekstrakta enzima i 3.8 mL rastvora razblažene boje u puferu (pH = 4.5). Spektri su snimani nakon jednog sata i nakon 8 sati od dodavanja enzima.

Nakon toga, praćene su reakcije degradacije u prisustvu ABTS-a kao medijatora i antrahinonske boje Acid green 25, kao potencijalnog medijatora, dodavanjem 800  $\mu\text{L}$  ABTS-a koncentracije 50 mmol/L (boje acid green koncentracije 10 g/L) u reakcionu smešu, na račun pufera.

**Inkapsulacija lakaze.** Enzim je inkapsuliran u kalcijum-alginat tako što je u rastvor natrijum-alginata (masenih udela 2.5, 3.0 i 4.0%) dodat ekstrakt lakaze. Nakon pola sata homogenizovanja smeša ekstrakta i alginata ukapavana je u rastvor kalcijum-hlorida ( $c = 0.1 \text{ mol/L}$ ). Odnos masa ekstrakta enzima, natrijum-alginata i kalcijum-hlorida bio je redom 1 : 5 : 10 u prvom i 1 : 2 : 12 u drugom slučaju. Alginatne kuglice u kojima je enzim inkapsuliran su nakon toga isprane prvo vodom pa acetatnim puferom i potopljene u puferski rastvor pH vrednosti 4.5 i čuvane na 4°C.

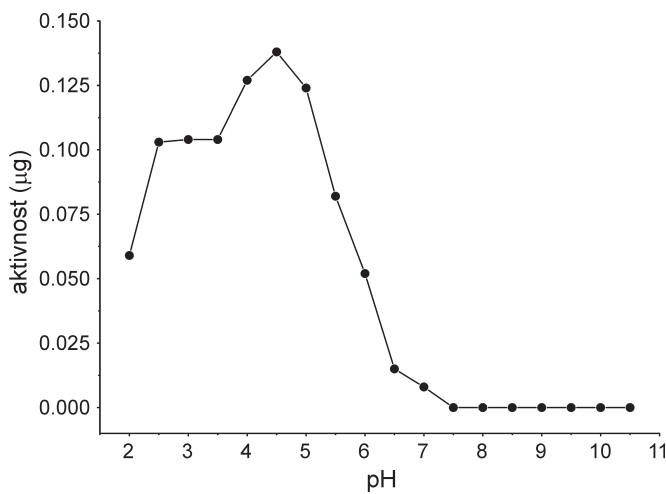
Radi ispitivanja uspešnosti inkapsulacije, merena je aktivnost rastvora  $\text{CaCl}_2$  u kome su kuglice formirane (vrednost 1). Pošto je poznat i broj jedinica aktivnosti u zapremini korišćenog ekstrakta (vrednost 2), izračunat je procenat inkapsuliranog enzima, oduzimanjem vrednosti 1 od vrednosti 2. Time je utvrđeno koja koncentracija alginata i u kojim odnosima sa enzimom i kalcijum-hloridom doprinosi formiranju najaktivnijih kuglica. Rađene su reakcije degradacije boje Acid green 25 sa tako pripremljenim najaktivnijim kuglicama na svih 18 pH vrednosti i sa ekstraktom lakaze na istim pH vrednostima. Reakcione smeše su sadržale po 20 alginatnih kuglica ( $m = 0.26 \text{ g}$ ), odnosno 200  $\mu\text{L}$  ekstrakta enzima i po 3 mL rastvora boje u puferima. Dakle, u cilju poređenja efikasnosti, za svaku pH vrednost praćena je degradacija i sa 20 kuglica i sa 200  $\mu\text{L}$  enzima.

Da bi se ustanovilo da li imobilizat nakon prvog ciklusa obezbojavanja može biti korišćen za ponovnu degradaciju, nakon 24 h reakcije boje acid green sa imobilizatom, degradirana boja je uklonjena iz reakcionih smeša i kuglicama je dodata nova količina puferisanih rastvora boja.

## Rezultati i diskusija

Izmerena koncentracija lakaze u ekstraktu iznosi 1.31 mg/mL.

Zavisnost aktivnosti lakaze od pH vrednosti prikazana je na slici 2. Vidi se da je lakaza najaktivnija na pH = 4.5 (aktivnost 0.1388 U/mL), ali je veoma aktivna i na pH vrednostima 4 i 5 dok na pH 7 ne pokazuje aktivnost. Na pH = 4.5 praćene su reakcije degradacije.



Slika 2. Zavisnost aktivnosti lakaze od pH vrednosti

Figure 2. Laccase activity – pH dependence

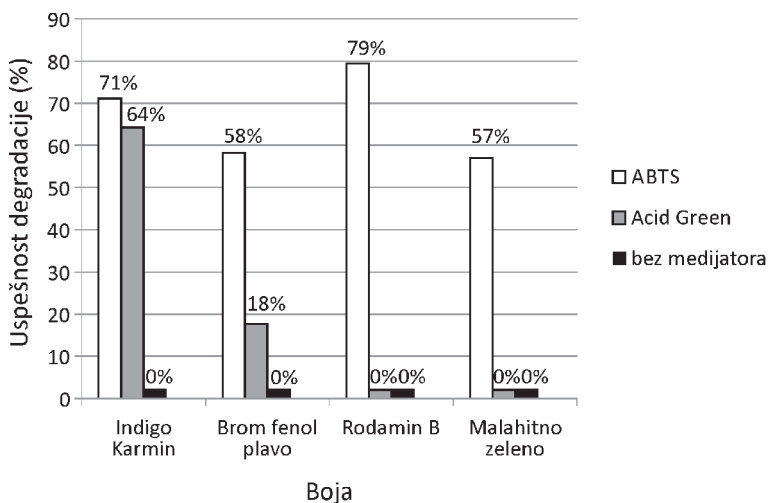
Radi utvrđivanja koja od boja je direktan supstrat za lakazu, poređene su početne apsorbancije i apsorbancije nakon 8 sati od početka degradacije. Procenat degradacije boje enzimom računat je prema jednačini:

$$D = 100 (A_i - A_t) / A_i$$

pri čemu  $A_i$  predstavlja apsorbanciju određene boje pre početka degradacije, a  $A_t$  završnu apsorbanciju, izmerenu nakon 8 časova.

Na ovaj način izračunato je da je nakon 8 časova degradirano 94% boje Acid green 25 i to bez prisutva ABTS-a kao medijatora, što ukazuje da ova boja jeste direktan supstrat za lakazu. Degradacija ostalih boja bez prisutva medijatora bila je manje uspešna, najviše je degradirano boje brom-fenol plavo, i to 4.8%.

Na slici 3 su prikazani rezultati degradacije svake od boja, bez prisustva i u prisustvu oba medijatora. Može se zaključiti da je ABTS uspešniji medijator od boje acid green. ABTS je bio najmanje uspešan pri degradaciji malahitno zelenog (57%). Takođe, vidi se i da se acid green može koristiti kao medijator pri degradaciji boje indigo karmin, sa uspešnošću od čak 64%, što je nezatno manje u odnosu na procenat obezbojenja sa ABTS-om kao medijatorom. Acid green boja pokazala se kao medijator i pri degradaciji brom-fenol plavog, doduše sa znatno manjim prinosom degradacije (18%). Rodamin B i malahitno zeleno ne mogu biti degradirane uz acid green kao medijator, dok se njihova degradacija u prisistvu ABTS-a pokazala kao uspešna (79, odnosno 57 procenata).

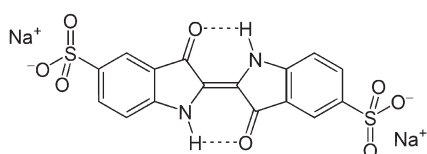


Slika 3.  
Uspešnost medijatora pri degradaciji

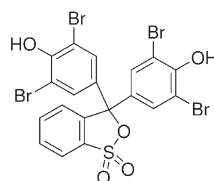
Figure 3.  
Performance of mediators in degradation reactions (black is no mediator)

S obzirom na to da mehanizmi degradacije ovih boja lakazom još nisu poznati, može se pretpostaviti da su ovakvi rezultati povezani sa strukturnom sličnošću između dve boje koje mogu biti degradirane uz acid green. I indigo karmin i brom-fenol plavo u svojoj strukturi imaju najmanje po jednu sulfonsku grupu, dok one kod rodamina B i malahitno zelenog nisu prisutne (slika 4). Međutim, treba biti svestan da je uzorak od četiri boje korišćene u ovom istraživanju (indigo karmin, brom-fenol plavo, rodamin B i malahitno zeleno), premali za ovakvu generalizaciju.

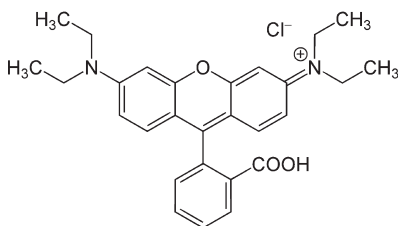
Optimalan odnos enzima, natrijum-alginata i kalcijum-hlorida je 1 : 2 : 12, a maseni udeo natrijum-alginata 4%. Koncentrovaniji rastvor alginata ima veći broj funkcionalnih grupa, pa će enzim biti jače, odnosno za više mesta vezan unutar polimerne kapsule. Kuglice napravljene na ovaj način inkapsulirale su 67% jedinica aktivnosti enzima u odnosu na prvo-



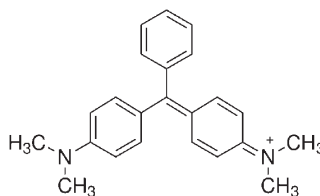
1. Indigo karmin



2. Bromfenol plavo



3. Rodamin B



4. Malahitno zeleno

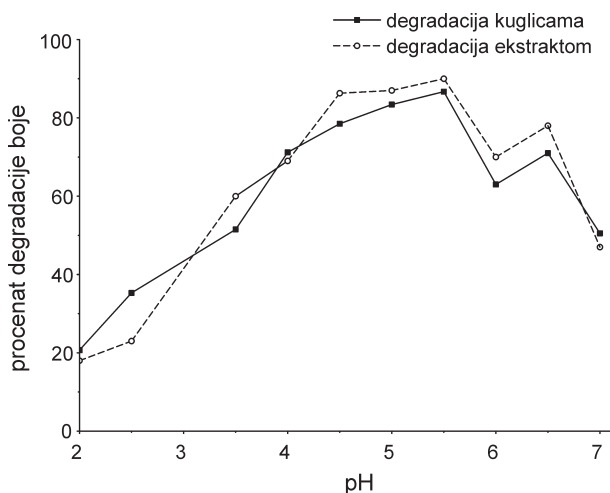
Slika 4.  
Strukturne formule degradiranih boja

Figure 4.  
Structures of degraded dyes

- 1 – Indigo carmine
- 2 – Bromphenol blue
- 3 – Rhodamine B
- 4 – Malachite green

bitan ekstrakt lakaze korišćen za inkapsulaciju. Takve kuglice su korišćene u daljim reakcijama degradacije.

Uspešnost degradacije boje acid green alginatnim kuglicama na različitim pH nakon 24 h upoređena je sa degradacijom boje ekstraktom enzima, što je prikazano na slici 5.



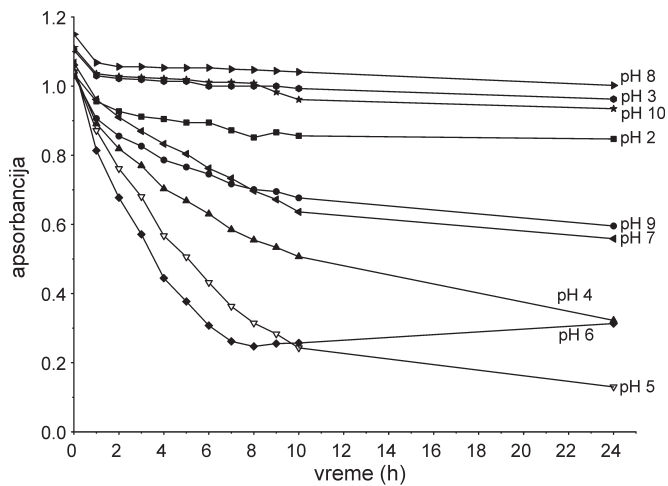
Slika 5. Poređenje reakcije degradacije boje ekstraktom i imobilizatom nakon 24 h

Figure 5. Dye degradation by extract (dotted line) and immobilizer, comparison after 24 h

Ekstrakt i imobilizat sa približno jednakom efikasnošću degradiraju boju na različitim pH vrednostima, iz čega se može zaključiti da imobilizat lakaze u alginatu pokazuje istu aktivnost u zavisnosti od pH vrednosti kao i sam ekstrakt. Pošto mehanizam degradacije sintetskih boja lakazom nije poznat, ne može se dati pouzdano objašnjenje zašto i ekstrakt i imobilizat pokazuju istu zavisnost od pH. Međutim, može se pretpostaviti da zato što su na različitim pH vrednostima kiselinski i bazni centri boja u manjoj ili većoj meri protonovani, odnosno deprotonovani, enzim sa različitom uspešnošću može da ostvari interakcije sa supstratom i oksiduje ga.

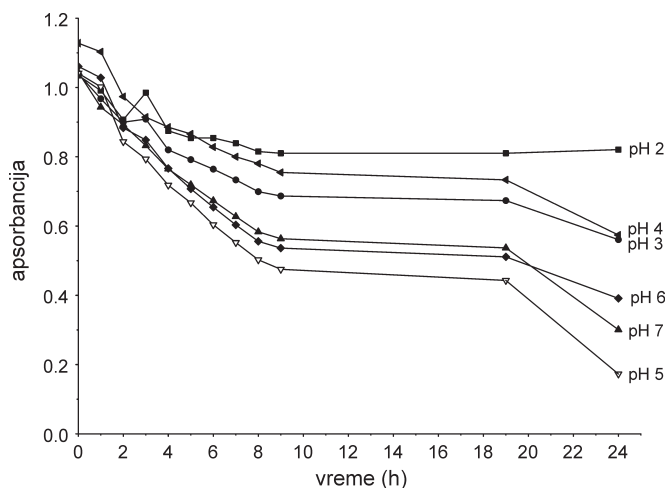
Na slikama 6 i 7 prikazane su reakcije degradacije boje ekstraktom i kuglicama tokom vremena, u zavisnosti od pH vrednosti. Poređenjem završnih tačaka svake od reakcija može se zaključiti da je nakon 24 h reakcije i sa ekstraktom i sa imobilizatom najviše boje degradirano na vrednosti pH = 5 i na onim njoj najbližim (pH = 4 i pH = 6), na kojima je apsorbancija po završetku reakcije približno istih vrednosti. Što se tiče reakcija sa ekstraktom, najmanja količina boje degradirana je na pH vrednostima 8, 9 i 10 a zatim na pH = 2. U reakciji boje sa imobilizatom, najmanje boje degradirano je na pH = 2 (pri čemu degradacije u baznim sredinama nisu mogle biti praćene zbog mehaničke nestabilnosti imobilizata).

Na slici 8 su prikazane reakcije degradacije ekstraktom (puna linija) sa reakcijama sa imobilizatom (isprekidana linija) na nekoliko najupečatljivijih pH vrednosti. Razlika između završnih apsorbancija reakcija sa ekstraktom i imobilizatom je u okviru greške instrumenta, tako da se mogu smatrati gotovo istim.



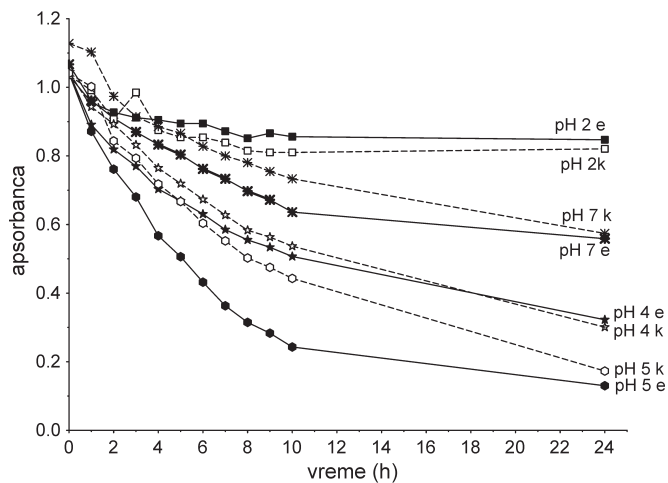
Slika 6. Reakcije degradacije ekstraktom na različitim pH vrednostima, tokom vremena

Figure 6. Extract degradation at different pH values – time dependence



Slika 7. Reakcije degradacije imobilizatom na različitim pH vrednostima, tokom vremena

Figure 7. Immobilizer degradation at different pH values – time dependence



Slika 8. Reakcije degradacije ekstraktom i imobilizatom na različitim pH vrednostima, kroz vreme

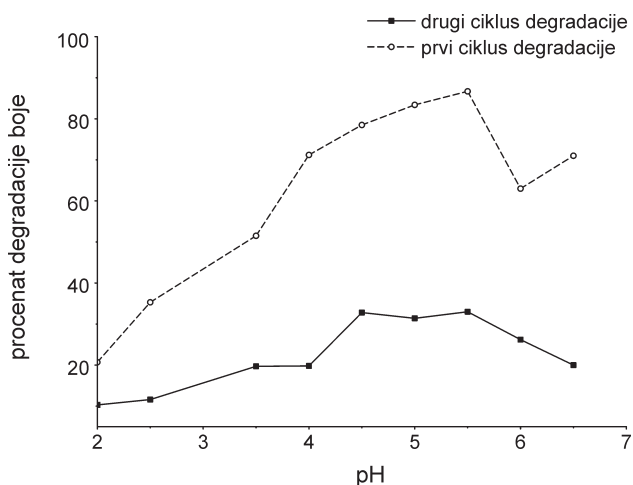
e – ekstrakt  
k – imobilizat

Figure 8. Extract and immobilizer degradation at different pH values – time dependence

e – extract  
k – immobilizer



Uspešnost degradacije imobilizatom nakon prvog i drugog ciklusa degradacije na pH vrednostima od 2 do 6.5, nakon 24 h, data je na slici 9. Uočava se da je ponovno korišćenje alginatnih kuglica za degradaciju boje moguće, samo sa приметно manjom brzinom i efikasnošću (približno tri puta), što se može objasniti time što je boja degradirana tokom prvog ciklusa ušla u pore alginatne kapsule i na taj način delimično onemogućila interakciju između enzima i boje degradirane u drugom ciklusu. Još jedno moguće objašnjenje je i to da je imobilizat koji je degradirao boju u drugom ciklusu duže bio izložen pH vrednostima koje se razlikuju od one na kojoj enzim pokazuje optimalnu stabilnost.



Slika 9. Efikasnost imobilizata u ponovnom ciklusu obezbojavanja

Figure 9. Efficiency of immobilizer in first (dotted line) and second degradation cycle

Praćenje degradacije imobilizatom na višim pH vrednostima nije bilo moguće zbog mehaničke nestabilnosti imobilizata u baznim sredinama. Objasnjenje ove pojave je sledeće: kako je korišćen pufer sadržao jone natrijuma, došlo do izmene jona kalcijuma iz kalcijum-alginata jonima natrijuma, čime je polimer povratio svoju hidrosolubilnu strukturu natrijum-alginata, što je dovelo do raspadanja kuglica.

## Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da od ispitivanih boja (Acid green 25, indigo karmin, brom-fenol plavo, rodamin B i malahitno zeleno) jedino Acid green 25 može biti direktan supstrat za lakazu, kao i da brom-fenol plavo može biti degradirana bez prisustva medijatora, ali u zanemarljivim količinama. Potvrđeno je da je ABTS univerzalni medijator, s tim što je pri korišćenim uslovima najmanja bila degradacija boje malahitno zeleno (57%), a najveća rodamina B (79%). Takođe, pokazano je i da se acid green može koristiti kao medijator za lakazu u degradaciji sintetskih boja, ali samo pri degradaciji boja indigo karmin i brom-fenol plavo, koje su sulfonske boje, i to sa uspešnošću degradacije od 64% kod indigo karmina i 18% kod boje bromfenol plavo. Rodamin B i malahitno zeleno ne mogu biti degradirane bez prisutva ABTS-a.

Utvrdeno je da je lakaza najaktivnija u opsegu pH vrednosti od 4 do 5, da aktivnost gubi sa sniženjem pH vrednosti i to za oko 60% na pH = 2, a da je u baznim sredinama potpuno neaktivna.

Inkapsulacijom kalcijum-alginatnim kuglicama aktivnost lakaze se ne može očuvati, ali kuglice degradiraju boju sa približno istom uspešnošću kao i sam ekstrakt. Inkapsulacija je sa druge strane omogućila ponovnu upotrebu enzima, čime se mogu uštedeti količine enzima potrebnog za degradaciju, jer inkapsuliran enzim može biti odvojen iz sistema nakon degradacije i biti ponovno korišćen.

U daljim istraživanjima mogla bi biti varirana količina korišćenih boja, ABTS-a i enzima, radi određivanja optimalnog odnosa koji bi rezultirao maksimalnom količinom degradirane boje. Trebalo bi i na većem broju boja proveriti da li prisustvo sulfonskih grupa u strukturi sintetskih boja utiče na to da li one mogu biti degradirane uz acid green kao medijator.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se dr Aleksandri Margetić, naučnom saradniku na IHTM-u, koja je obezbedila enzim ispitivan u ovom projektu, kao i Jelici Milošević, studentu doktorskih studija na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na pomoći oko izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja i organizovanju rezultata merenja.

---

## Literatura

- Abid M. F., Zablouk M. A., Abid-Alameer A. M. 2012. Experimental study of dye removal from industrial wastewater by membrane technologies of reverse osmosis and nanofiltration. *Iranian journal of environmental health science and engineering*, **9**: 17.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, **35**: 93.
- Murugesan K., Nam I-H., Kim Y-M., Chang Y-S. 2004. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**: 1662.
- Nahakpam S., Singh P., Shah K. 2008. Effect of calcium on immobilization of rice (*Oryza sativa* L.) Peroxidase for bioassays in sodium alginate and agarose gel. *Biotechnology and bioprocess engineering*, **13**: 632.
- Riva S. 2006. Laccases: blue enzyme for green chemistry. *Trends in biochemistry*, **24**: 5.
- Vujčić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija: Praktikum*. Beograd: Rantek
- Wong Y., Yu J. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water research*, **33**: 3512.

Williamson C., Gonzalez J., Ascencio A., Osma J. 2013. Laccase Alginate Encapsulation: Comparison between Assisted and Non-assisted Extrusion for Large-scale Production. *Revista de Integria*, **39**: 24.

---

*Milica Perić*

## Potential Use of Antraquinone Dye Acid Green 25 as a Mediator in the Degradation of Synthetic Dyes by Free and Immobilized Laccase

Laccases are a group of oxidative enzymes that are able to degrade synthetic dyes in the presence of a mediator. Therefore, in this research it was examined whether the dye Acid green 25 could mediate the interaction between the enzyme and the other dyes. Degradations of four dyes (Indigo carmine, Bromphenol blue, Rhodamin B and Malachite green), non-mediated and mediated by ABTS and Acid green, were examined at an optimal pH value which had been previously determined. In order to determine if the immobilized laccase could retain the activity in a wide range of pH values (2–10.5) and after the first cycle of degradation, the immobilization of laccase was performed by calcium-alginate encapsulation. The efficiencies of degradation by free and immobilized laccase were compared. Acid green was able to mediate degradation of two dyes (Indigo carmine and Bromphenol blue) with an efficiency of 64.2 and 17.7%. Laccase was encapsulated under different conditions and it was determined that the optimal ratio of enzyme, sodium alginate and calcium chloride was 1 : 2 : 12, with a 4% concentration of sodium alginate. Immobilized laccase showed the same trend of activity as free laccase and it can be reused in the second cycle of degradation, nevertheless with longer degradation time needed.

