

# Pročišćavanje enzima MenD za primjenu u biokatalizi

---

**Todorović, Nolla**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:655843>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nolla Todorović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nolla Todorović

PROČIŠĆAVANJE ENZIMA MEND ZA PRIMJENU U BIODIPLOMATIZACIJI

ZAVRŠNI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Martina Sudar

Članovi ispitnog povjerenstva:

dr. sc. Anita Šalić

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Zagreb, rujan 2021.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Martini Sudar, na mogućnosti izrade završnog rada i na svom strpljenju kojeg je imala tijekom ovog procesa.*

*Također se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili podrška tijekom studiranja.*

## SAŽETAK

Razvojem biotehnologije dolazi do novih otkrića u području biokatalize čija je najveća prednost nastajanje manje štetnih nusprodukata u odnosu na kemijsku katalizu. U biokatalizi se koriste različiti oblici biokatalizatora: pročišćeni i nepročišćeni enzimi kao i cijele stanice mikroorganizma.

U ovom radu proveden je postupak pročišćavanja enzima MenD (sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline) s manjom (50 mg) i većom masom uzorka (200 mg). U svrhu pročišćavanja enzima korištena je metoda afinitetne kromatografije. Nakon pročišćavanja uzoraka afinitetnom kromatografijom korištena je SDS-PAGE elektroforeza za provjeru prisutnosti proteina u sakupljenim frakcijama te Bradfordova metoda za određivanje koncentracija proteina u frakcijama.

**Ključne riječi:** biokataliza, pročišćavanje enzima, MenD, afinitetna kromatografija, elektroforeza

## ABSTRACT

With the development of biotechnology, new discoveries are being made in the field of biocatalysis, the biggest advantage of which is the formation of less harmful by-products compared to chemical catalysis. Different forms of biocatalysts can be used: purified and crude enzyme as well as whole cells of the microorganisms.

In this work, purification of the enzyme MenD (2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylic acid synthase) with a lower mass (50 mg) and a higher mass sample (200 mg) was performed. Affinity chromatography was used to purify the sample. After purification of the samples by affinity chromatography, SDS-PAGE electrophoresis was used to prove the presence of proteins in the collected fractions and the Bradford method to determine protein concentration in the samples.

**Keywords:** enzyme purification, MenD, biocatalysis, enzymes, chromatography, electrophoresis

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. OPĆI DIO</b>	2
2.1. Kataliza i biokataliza	2
2.2. Enzimi	3
2.2.1. Struktura enzima	4
2.2.2. Specifičnost enzima	5
2.2.3. Podjela enzima	6
2.3. Proizvodnja enzima	8
2.3.1. Dobivanje enzima	9
2.3.2. Separacija krutine od kapljevine	10
2.3.2.1. Ekstracelularni enzimi	11
2.3.2.2. Intracelularni enzimi	11
2.3.2.3. Imobilizirani enzimi	12
2.3.3. Pročišćavanje enzima	12
2.3.3.1. Homogenizacija i frakcioniranje	12
2.3.3.2. Taloženje	13
2.3.3.3. Kromatografija	13
2.3.3.4. Elektroforeza	15
2.3.4. Oblikovanje enzimskog produkta	16
2.4. Upotreba enzima	17
	0

<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	19
3.1. Popis korištene aparature i kemikalija	19
3.1.1. Aparatura	19
3.1.1.1. Kromatograf	19
3.1.1.2. Centrifuga	19
3.1.1.3. Orbitalna tresilica	20
3.1.2. Kemikalije	21
3.2. Afinitetna kromatografija	21
3.2.1. Priprema pufera za afinitetnu kromatografiju	21
3.2.2. Priprema uzorka za afinitetnu kromatografiju	21
3.2.3. Provedba afinitetne kromatografije	22
3.3. Elektroforeza	23
3.3.1. Priprema otopina za elektroforezu	23
3.3.2. Priprema gelova za elektroforezu	23
3.3.3. Izlijevanje gela za elektroforezu	24
3.3.4. Priprema pufera i uzoraka za elektroforezu	24
3.3.5. Provedba elektroforeze	25
3.3.6. Bojanje gelova	26
3.4. Određivanje koncentracije proteina- metoda po Bradfordu	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	28
4.1. Afinitetna kromatografija	28
4.2. Elektroforeza	30
4.3. Određivanja koncentracije proteina Bradford metodom	32



<b>5. ZAKLJUČAK</b>	33
<b>6. LITERATURA</b>	34
<b>7. POPIS SIMBOLA I OZNAKA</b>	36
Životopis	38

## 1. UVOD

U metaboličkim reakcijama svake stanice sudjeluju enzimi čiji je potencijal široko prepoznat u današnjem svijetu. Proučavanjem enzima otkrivena je i njihova moguća upotreba u industriji. U zadnjih 20 godina prepoznate su mnoge prednosti korištenja enzima kao zamjena za kemijske katalizatore, ali i dalje postoje kritičari koji iznose problematiku ograničene uporabe enzima.<sup>1</sup> U današnje vrijeme takvi se problemi rješavaju pomoću istraživanja i razvoja u različitim područjima.<sup>2</sup>

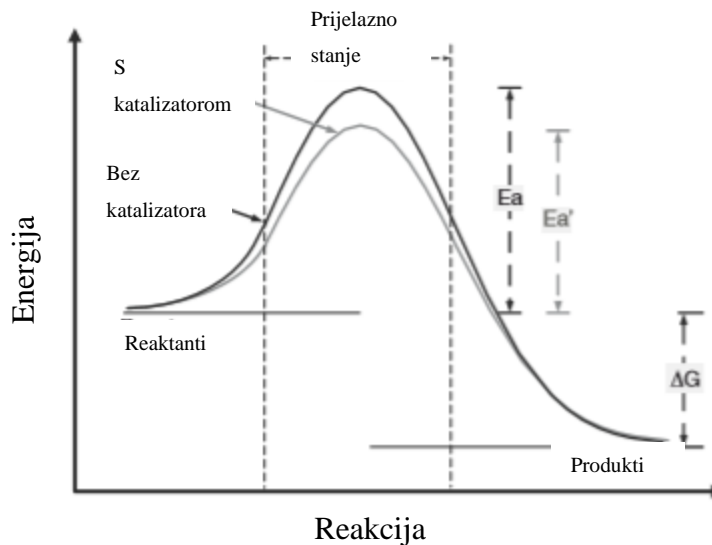
Jedan od enzima čija se primjena ispituje je i MenD ili sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline. MenD je enzim koji se izolira iz bakterije *Escherichia coli*. To je jedini poznati enzim koji katalizira adiciju ThDP-a na  $\beta$ -ugljik drugog supstrata. Za katalitičku funkciju ovog enzima, koji sudjeluje u sintezi vitamina K<sub>2</sub>, potreban je kofaktor (magnezijev kation).<sup>3</sup>

Cilj ovog rada je bio ispitati mogućnost pročišćavanja enzima MenD primjenom afinitetne kromatografije, analizirati prikupljene frakcije upotrebom SDS-PAGE elektroforeze i ispitati koncentraciju proteina u prikupljenim frakcijama primjenom Bradfordove metode.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Kataliza i biokataliza

Većina kemijskih reakcija se odvija spontano dok je za neke reakcije potreban katalizator kako bi se one odvijale prihvatljivom brzinom. Takav proces ubrzavanja kemijske reakcije naziva se kataliza, a za provedbu katalize su potrebni katalizatori – molekule koje smanjuju energiju aktivacije kako bi se reaktanti lakše preveli u produkte.<sup>2</sup>



*Slika 1.* Grafički prikaz egzotermne reakcije sa i bez katalizatora<sup>2</sup>

Na Slici 1. se vidi grafički prikaz odvijanja egzotermne reakcije sa i bez katalizatora. Reaktanti moraju postići određenu razinu energije kako bi mogli biti prevedeni u produkte. Ta razina energije se naziva energija aktivacije. Dodavanjem katalizatora dolazi do smanjenja energije aktivacije te reaktant lakše prelazi u produkt što čini cijeli proces efikasnijim.<sup>4</sup>

U novije vrijeme dolazi do korištenja modernijeg oblika katalize, a to je biokataliza. Sve do drugog desetljeća dvadesetog stoljeća pojam biotransformacija je bio klasificiran pod nazive “zymotechnology” ili “technical biology“. Naziv biotehnologija je prvi put uveden 1917. godine i već tada se pojavila ideja za korištenje biokatalizatora kako bi se procesi učinili učinkovitijima, selektivnijima i ekološki prihvatljivijima. Time su se izbjegli razni problemi koji su se pojavljivali

kod kemijske transformacije. Jedna od najvećih motivacija za brzo razvijanje područja biotehnologije je upravo ušteda i očuvanje ograničenih resursa.<sup>5</sup>

Biokataliza ili biotransformacija je naziv koji se koristi za katalizu biokemijskih reakcija tj. reakcije koje sačinjavaju metabolizam svih živih stanica. Katalizatori koji sudjeluju u takvim reakcijama se nazivaju biokatalizatori (enzimi).<sup>2</sup> Reaktante, koji sudjeluju u reakciji koja je katalizirana enzimom, nazivamo supstrati. Svaka biokemijska reakcija je katalizirana jednim određenim enzimom kako bi se supstrat preveo u određeni proizvod.<sup>6</sup> Enzimi kao i katalizatori smanjuju energiju aktivacije, te se ne mijenjaju tijekom reakcije.

Postoje bitne razlike između katalizatora i enzima. Enzimi su bolja opcija od kemijskih katalizatora kada govorimo o reakcijama gdje je specifičnost reakcije glavni problem i kod reakcija koje se trebaju odvijati u blagim uvjetima (zbog nestabilnosti supstrata ili kako bi izbjegli nastajanje nusprodukta). Glavni problem upotrebe enzima je to što ih se ne može koristiti u uvjetima visokih temperatura i izvan optimalnih vrijednosti pH. Zato je i potraga za stabilnijim enzimima veliki dio biotehnologije. Ekstremofili, organizmi koji mogu preživjeti u ekstremnim životnim uvjetima, su obećavajući izvor vrlo stabilnih enzima i zbog toga je njihovo istraživanje vrlo aktivno danas.<sup>2</sup>

## 2.2. Enzimi

Sve do 19. stoljeća smatralo se da se procesi kao što su ukiseljavanje mlijeka i fermentacija šećera mogu odvijati jedino unutar nekog organizma. 1833. godine agens za razlaganje mliječnih proteina je ekstrahiran iz želučanih sokova i dan mu je naziv pepsin. Pepsinu i njemu sličnim supstancama je dodijeljen naziv fermenti. Justus von Liebig je smatrao da fermenti mogu biti ne-živića supstanca koja je dobivena iz žive stanice. Louis Pasteur i mnogi drugi su i dalje vjerovali da fermenti moraju biti živi organizmi. 1878. godine Wilhelm Kfthne je fermentima nadjenao drugačiji naziv; nazvao ih je enzimi što znači iz kvasaca. Napokon se 1897. godine razriješila diskusija o prirodi enzima te je dokazano da se fermentacija šećera može odviti bez prisustva živih stanica.<sup>6</sup>

Svi enzimi su proteini, ali neki enzimi zahtijevaju prisustvo malih organskih molekula ili metalnih iona kako bi mogli obavljati svoju katalitičku funkciju. Takve se molekule nazivaju koenzimi ili

kofaktori. Termin koenzim se koristi za male organske molekule koje nisu dio enzimske strukture dok se termin kofaktor generalno koristi za metalne ione koji su vezani za enzim. Kofaktori su često čvrsto vezani za enzimsku strukturu kako ne bi bili odvojeni za vrijeme reakcije.<sup>2,6</sup>

Enzimi se mogu svrstati u tri skupine prema tome zahtijevaju li dodatne molekule kako bi došlo do biokatalize. U prvu skupinu pripadaju enzimi koji ne zahtijevaju dodatne molekule, a u ostale dvije enzimi koji zahtijevaju koenzime ili kofaktore.<sup>6</sup>

### 2.2.1. Struktura enzima

Većina karakteristika enzima kao katalizatora proizlazi iz njegove molekularne strukture. Naime, enzimi su proteini koji su sastavljeni od velikog broja aminokiselina (od sto pa do nekoliko stotina).<sup>2</sup> U prirodi postoje 20 vrsta aminokiselina i sve su građene od 5 osnovnih elemenata: O, C, H, N i S.<sup>7</sup>

Postoje 4 strukturna nivoa proteina: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura. Svaki protein je definiran lancem aminokiselina koji nazivamo primarna struktura. Te su aminokiseline kovalentno povezane peptidnim vezama koje se formiraju između  $\alpha$ -karboksilne skupine jedne aminokiseline i  $\alpha$ -amino skupine druge aminokiseline. Osim amino i karboksilne skupine na  $\alpha$  ugljikov atom aminokiseline mogu biti vezani i bočni lanci koji se nazivaju R skupinama. Ovisno o prirodi R skupine aminokiseline mogu biti nepolarne (hidrofobne) i polarne (nabijene i nenabijene).<sup>2,6</sup> Dva povezana lanca čine dipeptid, više takvih lanaca se naziva oligopeptid, a puno lanaca povezanih peptidnom vezom se naziva polipeptid.<sup>6</sup> Mijenjanjem poretka aminokiselina u lancu mijenja se i struktura i funkcija biokatalizatora. Kada se peptidni lanci međusobno povežu vodikovim vezama nastaje sekundarna struktura. Ona može biti planarna ili nabrana ako se peptidni lanci povežu u nabranom ravni, a ako se peptidni lanac rasporedi u ravni oko zamišljenog valjka nastaje struktura uzvojnice.<sup>7</sup> Tercijarna trodimenzionalna struktura je posljedica stvaranja kovalentnih veza između dva peptidna lanca. One tvore kompaktnu i uvijenu konfiguraciju tzv. fibrilnu struktura. Tercijarna struktura je esencijalna za funkcionalnost proteina. Proteini ovakve strukture mogu biti aktivni biokatalizatori.<sup>6,7</sup> Neki proteini imaju kvaternu strukturu koja je česta kod regulacijskih proteina i rezultat je interakcija između polipeptidnih lanaca koji se nazivaju

podjedinice. Takvi proteini se nazivaju globularni proteini, stabilizirani su disulfidnim mostovima i čine najbolje biokatalizatore.<sup>2,7</sup>

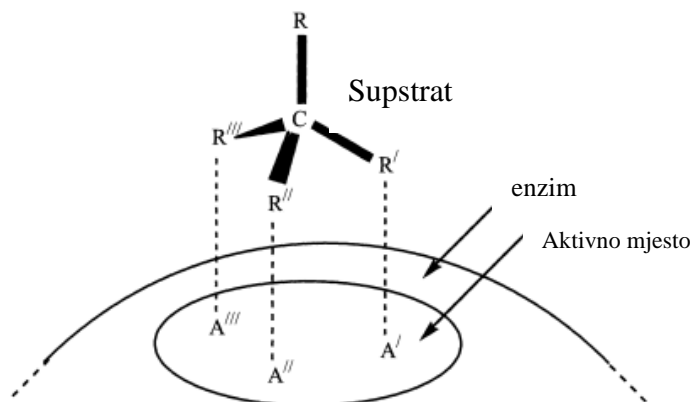
Glavne interakcije odgovorne za trodimenzionalnu strukturu proteina su:

- Vodikove veze
- Nepolarne veze
- Disulfidni mostovi
- Ionske veze
- Slabe privlačne sile koja što su Van der Waalsove privlačne sile.<sup>2</sup>

### 2.2.2. Specifičnost enzima

Enzimska specifičnost je bitno svojstvo enzima koje je usko vezano s njegovom strukturom. Enzimi su u većini slučajeva vrlo specifični za određeni supstrat i to upravo zato što je supstrat obogaćen vezama koje mogu biti "napadnute" od strane funkcionalnih skupina aktivnog mjesta enzima koje koordiniraju položaj supstrata kako bi moglo doći do reakcije. Određeni uvjeti mogu narušiti enzimsku specifičnost.

Biokataliza se odvija na malom dijelu enzima koje se naziva aktivno mjesto te je u pravilu sačinjeno od malog broja aminokiselina. Supstrat se veže na aktivno mjesto (Slika 2.) enzima nakon čega dolazi do nastajanja produkta. Produkt zatim napušta aktivno mjesto koje poprima prvobitnu strukturu, spremno za idući katalitički ciklus.<sup>2,8</sup>



**Slika 2.** Vezivanje supstrata na aktivno mjesto enzima<sup>6</sup>

Jedna od teorija koje opisuju svojstvo specifičnosti je Fischerova teorija brave i ključa. Prema ranoj teoriji ključa i brave iznesene 1894. godine aktivno mjesto ima specifičan geometrijski oblik koji je komplementaran geometrijskom obliku molekule supstrata na isti način kao što je ključ komplementaran bravi.<sup>2,6</sup>

Druga teorija koja opisuje svojstva je Koshlandova hipoteza induciranog prilagođavanja po kojoj supstrat ima čvrstu nepromjenjivu strukturu. Prilikom interakcije enzima sa supstratom, enzim mijenja svoju strukturu kako bi se prilagodio supstratu (dolazi do biokatalize). Često se koristi analogija rukavica i ruka kako bi se pojasnila hipoteza induciranog prilagođavanja.<sup>6</sup> Za razliku od modela ključa i brave, model induciranog prilagođavanja prikazuje enzim kao fleksibilnu strukturu čije aktivno mjesto kontinuirano mijenja svoj oblik prilikom interakcije sa supstratom.<sup>9</sup>

### 2.2.3. Podjela enzima

Enzimi su podijeljeni u 6 grupa na temelju kemijskih reakcija koje kataliziraju pa tako postoje oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze.

Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju oksidacijsko-redukcijske reakcije koje uključuju prijelaz elektrona, vodikovih i kisikovih atoma s jedne molekule na drugu. Postoje dvadeset i dvije podgrupe ovih enzima među kojima postoje enzimi s velikih tehnološkim značajem kao što su dehidrogenaze. Dehidrogenaze oksidiraju supstrat tako da prenose vodikove enzime na koenzim

(NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD<sup>+</sup>, FMN) koji ima ulogu akceptora. Oksidoreduktaze su dio metaboličkog procesa stanice, zahtijevaju koenzime i intracelularni su enzimi.<sup>2</sup>

Transferaze su enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalne skupine s donora na prigodan akceptor. Postoji devet podgrupa koje se sistematiziraju na temelju kemijske prirode funkcionalne skupine koja se prenosi. Ovi enzimi imaju važnu ulogu u metabolizmu stanica, zahtijevaju koenzim za svoju katalitičku aktivnost i intracelularni su. Najpoznatiji primjer je Taq DNK polimeraza, termostabilni enzim koji je ključan u polimeraznoj lančanoj reakciji.<sup>2</sup>

Hidrolaze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu, postoje 12 podgrupa. Oni su bitni za katabolizam jer opskrbljuju stanicu s hranjivim tvarima. Imaju veliki tehnološki značaj, većina je ekstracelularna i ne zahtijevaju koenzime. Pod određenim uvjetima hidrolaze mogu katalizirati povratne reakcije formiranja veza uz eliminaciju vode. Neki od primjera ovih enzima su esteraze, proteaze i glukozidaze.<sup>2</sup>

Liaze su enzimi koji kataliziraju kidanje kovalentnih veza reakcijama eliminacije funkcionalnih skupina.<sup>10</sup> Podijeljeni su u sedam podgrupa ovisno o vrsti kovalentne veze: C-C, C-O, C-N, C-S, P-O i ostale veze. Enzimi koji pripadaju ovoj grupi sudjeluju u staničnom katabolizmu i biosintezi (povratna reakcija). Značajni enzimi u ovoj grupi su aldolaze, karboksilaze i dekarboksilaze, hidrataze i dehidrataze. Većina su intracelularni, a neki od njih ne zahtijevaju koenzime. To svojstvo ih čini dobrim kandidatima za tehnološku primjenu. Primjer je nitrilna hidrataza koja se koristi u proizvodnji akrilamida iz akrilonitrila (uz proizvodnju kukuruznog sirupa) što je vjerojatno jedna od najvažnijih industrijskih primjena enzima u organskoj sintezi.<sup>2</sup>

Izomeraze su enzimi koji kataliziraju reakcije pretvorbe supstrata u njihove izomere. Izomeri su spojevi iste kemijske formule, ali različitog rasporeda atoma u prostoru. Postoje šest potkategorija izomeraza koje su sistematizirane na temelju vrste izomera koji nastaje nakon transformacije: racemataze i epimeraze, cis-trans izomeraze, intramolekularne oksidoreduktaze, intramolekularne transferaze, intramolekularne liaze i ostale izomeraze. Većina izomeraza su intracelularni enzimi, a neki od njih zahtijevaju kofaktore. Samo nekoliko izomeraza se koristi u industriji, poput glukoza izomeraze koji je jedan od najčešće upotrebljivanih enzima dana, a služi za proizvodnju fruktoznog sirupa.<sup>2</sup>

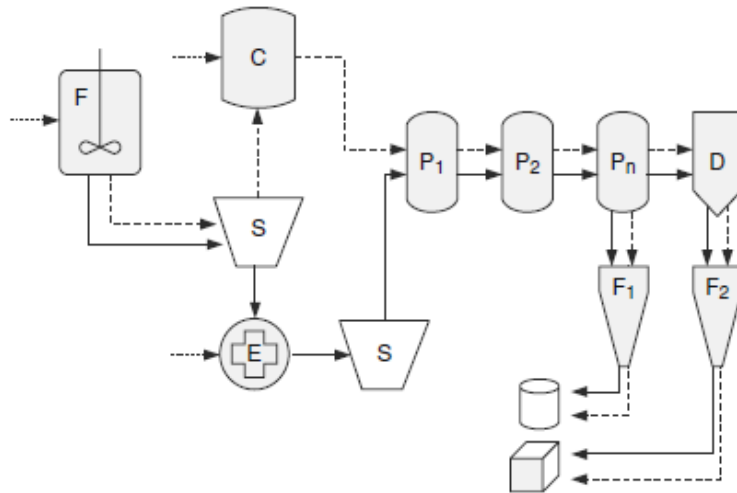


Ligaze su enzimi koji kataliziraju stvaranje kovalentnih veza između dviju molekula. Ovi enzimi su odgovorni za anabolizam stanice i imaju ključnu ulogu u reakcijama sinteze unutar stanice. Postoji šest podgrupa koje se dijele na temelju vrsta veza koje se formiraju: C-O, C-S, C-N, C-C. Ligaze su intracelularni enzimi koji zahtijevaju koenzime i koji imaju veliku molekulsku masu. Nisu od velike važnosti u tehnološkom smislu zbog svoje kompleksnosti i nestabilnosti, ali se često koriste u istraživanjima.<sup>2</sup> Primjer za to je T4 DNK ligaza koja se koristi za spajanje dva fragmenta nukleinskih kiselina u cilju kloniranja DNK.<sup>11</sup>

Od 6 osnovnih grupa enzima najveći značaj u biotehnologiji (prehrambena i farmaceutska industrija) imaju hidrolaze. To su jednostavni proteini koji ne zahtijevaju koenzime te je većina ekstracelularna. Njihova proizvodnja je vrlo jednostavna, a cijena niska.<sup>2</sup>

### 2.3. Proizvodnja enzima

Količina i svrha korištenja enzima definiraju njihov način proizvodnje. Isto tako, postoje različite potrebe čistoće enzima. U medicini su potrebne manje količine enzima s većim stupnjem čistoće (tzv. enzimi za posebne svrhe) dok u proizvodnje hrane, tkanine i goriva njihova čistoća i nije toliko bitna koliko je bitna velika količina (visokotonažni industrijski proteini). Proizvodnja enzima će također ovisiti o njihovom izvoru; enzimi biljnog i životinjskog porijekla, koji se mogu izdvojiti iz odgovarajućih životinjskih žlijezdi ili biljnih sokova, će se ekstrahirati drugačijim metodama za razliku od mikrobnih enzima. Takvi enzimi su najčešće nusprodukti nastali proizvodnjom nekog određenog željenog proizvoda. Mikrobnii enzimi se dobivaju fermentacijom i ekstrahiraju iz fermentacijskog medija (ekstracelularni enzimi) ili iz stanica.<sup>2</sup>



*Slika 3.* Shema proizvodnje mikrobnih enzima<sup>2</sup>

Cjelokupni proces proizvodnje mikrobnih enzima se može podijeliti u 4 faze (Slika 3.):

- Dobivanje enzima: faza proizvodnje stanica (faza propagacije) - F
- Kruto-kapljevita separacija, ekstrakcija stanica i/ili koncentriranje - S,E,C
- Pročišćavanje enzima: operacije uklanjanja neželjenih komponenata u svrhu dobivanja enzima određene čistoće (uglavnom se odvajaju neželjeni proteini) - P,D
- Oblikovanje enzimskog produkta: cilj je dobivanje reprezentativnog enzima određene stabilnosti i željenog standarda - F<sup>2</sup>

### 2.3.1. Dobivanje enzima

Mikroorganizmi su odličan izvor enzima. Enzimi dobiveni pomoću mikroorganizama nazivaju se mikrobnim enzimima. Većina enzima se danas može dobiti iz mikroorganizama postupkom fermentacije.

Najtradicionalniji oblik dobivanja enzima je proizvodnja u kotlastom reaktoru. Reaktor je ispunjen medijem, naciepljen kulturom i inkubiran pod određenim uvjetima. Proces traje toliko dugo dok

nije postignuta maksimalna koncentracija enzima te se nakon toga stanice odvajaju za daljnje postupke separacije.

Za proizvodnju enzima se može koristiti i kotlasti reaktor s dotokom. Proces je sličan kao i kod kotlastog reaktora samo što se u ovom slučaju nakon određenog vremena reaktor ispunjava s hranjivim tvarima (dotok). Ovaj način proizvodnje je pogodan upravo zbog toga što omogućava kontrolu metabolizma stanica te je sam proces vrlo jednostavan.

Proizvodnja u protočno kotlastom reaktoru se odvija tako da se medij kontinuirano uvodi u reaktor dok se produkt odvodi istom brzinom. Ovim načinom se dobiva veća produktivnost i kontrola nad uvjetima, no postoji veliki nedostatak, a to su kontaminacija i mutacija soja zbog čega dolazi do smanjenja broja mikroorganizama koji proizvode željeni produkt.

Jedan od parametara koji imaju značajan utjecaj na proizvodnju enzima fermentacijom je specifična aktivnost odnosno enzimski aktivnost po masi mikroorganizama. Na povećanje specifične aktivnosti enzima se može utjecati raznim alatima, poput Mutacija i selekcija, genetičko inženjerstvo i usmjerena evolucija su. Visoka specifična aktivnost enzima se može postići inženjerstvom medija i optimizacijom parametara kao što su temperatura, pH i aeracija. Prednosti visoke specifične aktivnosti su smanjenje troškova fermentacije.

Specifična brzina rasta mikroorganizama je također jedan značajan parametar za proizvodnju enzima fermentacijom. Povećana specifična brzina rasta stanica je povezana s povećanjem specifične brzine sinteze enzima. Uvjeti (pH, temperatura i koncentracija kisika) koji povećavaju specifičnu brzinu rasta mikroorganizama također povećavaju specifičnu brzinu sintezu enzima.

Veliki utjecaj na proizvodnju enzima fermentacijom imaju genetička stabilnost i sigurnost proizvodnje mikrobnog enzima te morfološka svojstva mikroorganizama i reološka svojstva fermentacijske smjese.<sup>2</sup>

### 2.3.2 Separacija krutine od kapljevine

Separacija krutine od kapljevine je metoda koja se provodi u cilju odvajanja stanica od fermentacijskog medija. Takva separacija se može izvesti metodom centrifugiranja ili filtracije.

Filtracija je pogodnija za višestanične organizme kao što su plijesni dok je centrifugiranje učinkovitije kada je riječ o jednostaničnim organizmima kao što su bakterije i kvasci. Unatoč velikoj učestalosti ovih operacija one imaju i svoje nedostatke: mikroorganizmi su maleni, kompresibilni i njihova gustoća je slična gustoći medija u kojem se nalaze što znatno može otežati sam proces.

Ako je enzim ekstrahiran iz stanice prilikom njezina rasta tada ćemo enzim dobiti iz tekuće faze, a kada se nalazi u stanici dobivamo ga iz krute faze.<sup>2</sup>

#### 2.3.2.1. Ekstracelularni enzimi

Ekstracelularni ili izvanstanični enzimi su enzimi koji se nalaze u mediju koji okružuje stanicu. U medij dopijevaju prolaskom kroz staničnu membranu.<sup>2</sup> Njihova funkcija je razlaganje kompleksnih polimera u jednostavne šećere koji služe kao izvor hrane i energije.<sup>11</sup> Takvi enzimi su poželjniji od intracelularnih odnosno unutarstaničnih enzima zbog jednostavnijeg postupka pročišćavanja.<sup>2</sup>

Iako ovakvi enzimi imaju veliku prednost oni imaju i nedostatak. Niska koncentracija ekstracelularnih enzima znatno utječe na krajnji proizvod, te je takve enzime potrebno koncentrirati. Neke od metoda za postizanje većih koncentracija ekstracelularnih enzima su vakuumska evaporacija, koncentriranje zamrzavanjem vode, ultrafiltracija, itd.<sup>2</sup>

#### 2.3.2.2. Intracelularni enzimi

Intracelularni ili unutarstanični enzimi su enzimi koji za razliku od ekstracelularnih enzima ne prelaze u medij kroz staničnu membranu već ostaju u stanici. Njihova ekstrakcija ovisi o vrsti stanice i o lokaciji enzima u staničnoj strukturi. Enzime životinjskog porijekla koji se nalaze u stanicama i tkivima je jednostavnije ekstrahirati jer su stanice odvojene staničnom membranom. Enzime biljnog porijekla je potrebno podvrgnuti težim uvjetima kako bi se enzimi mogli ekstrahirati kroz debelu staničnu stijenku. Enzime iz mikrobnih stanica, pogotovo bakterija, je najteže ekstrahirati zbog postojanja stanične membrane, stijenke i kapsule.<sup>2</sup>

### 2.3.2.3. Imobilizirani enzimi

Proučavanje intracelularnih enzima je otežano time da se oni u stanici nalaze imobilizirani na nekoj podlozi i često jedan od drugog odvojeni polupropusnom membranom. Nakon ekstrakcije oni se nalaze u razrijeđenoj otopini i izmiješani su te su u takvom stanju nestabilni. Kako bi se takve molekule mogle proučavati njih se imobilizira na neku čvrstu podlogu.<sup>13</sup> Imobilizirani enzimi su spojevi koji su umjetno vezani za netopivi nosač. Oni djeluju kao heterogeni katalizatori i lako se odvajaju od reakcijskog medija. Za razliku od slobodnih enzima, imobilizirani enzimi imaju visoki stupanj stabilnosti.<sup>14</sup>

### 2.3.3. Pročišćavanje enzima

Pročišćavanje enzima je kompleksan proces i upravo zbog toga se koristi veliki broj metoda kako bi se postigao što veći stupanj čistoće. Najčešći pristup je izbor jednostavnijih i jeftinih metoda u prvim koracima pročišćavanja, a skupljih metode tek u kasnijim koracima.<sup>15,16</sup> S obzirom na to da enzimi u nekoj smjesi mogu imati veoma slična svojstva, pročišćavanje može biti zahtjevno.<sup>17</sup> Izbor metoda za pročišćavanje ovisi i o tome pročišćavaju li se intracelularni ili ekstracelularni enzim. Kod intracelularnih enzima, traženi enzim se nalazi u smjesi ostalih proteina, aminokiselina i staničnih organela, dok je smjesa ekstracelularnih enzima nešto jednostavnija jer dolazi do pročišćavanja kroz staničnu membranu.<sup>2,16</sup> U sljedećim poglavljima će biti spomenuto nekoliko metoda pročišćavanja enzima: homogenizacija, frakcioniranje, taloženje, kromatografija i elektroforeza.

#### 2.3.3.1. Homogenizacija i frakcioniranje

Metoda homogenizacije i frakcioniranje se provodi u svrhu otvaranja stanica, da pritom ne dođe do oštećenja staničnih organela. Najprije se životinjsko tkivo razrezuje ručno, a zatim rotirajućim noževima (mikseri). Na kraju se tkivo homogenizira u homogenizatoru. Cijeli se postupak provodi na ledu uz prisustvo pufera. Ponekad se dodaje i supstrat na koji djeluje enzim, u slučaju da imamo veoma osjetljive enzime kako bi pospješili njihovu stabilizaciju.<sup>18</sup>

Kada su provedeni gornji postupci, slijedi frakcioniranje koje se provodi centrifugiranjem. Najprije se odvajaju tkiva, neraspadnute stanice i vezivna tkiva, a nakon toga jezgra, plazma, mitohondriji, plastidi i mikrosomi. Na kraju ostaje citosol.<sup>18</sup>

#### 2.3.3.2. Taloženje

Taloženje je jednostavna, brza i jeftina metoda kojom se uklanjaju neželjene sastavnice koje bi mogle stvarati interferencije pri daljnjim metodama pročišćavanja. Može se provoditi pomoću soli, organskih otapala ili topline.<sup>19</sup>

S obzirom na to da su proteini u jakim interakcijama s vodom, dodavanjem soli ili organskih otapala (metanol, etanol ili aceton) smanjuje se količina dostupne vode. Proteini se talože iz takvih otopina te se odvajaju iz taloga centrifugiranjem. Ovakav postupak se ponavlja nekoliko puta kako bi se što više proteina istaložilo iz otopine. Cijelu metodu je potrebno provoditi pri nižim temperaturama jer povećanjem temperature dolazi do povećanja denaturacije proteina.<sup>19</sup>

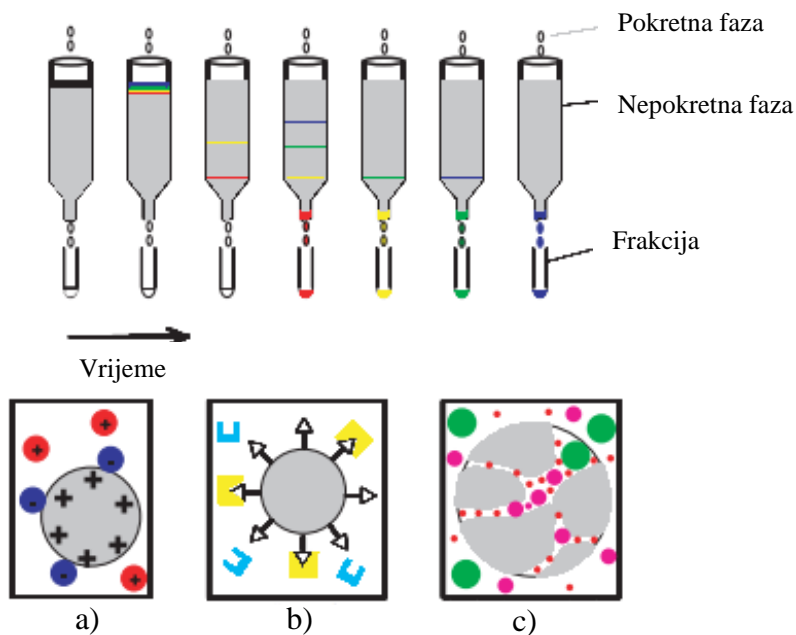
Za metodu taloženja se najčešće koristi amonijev sulfat jer je jeftin, ima velika topljivost u vodi što znači da se mogu postići visoke koncentracije i nije otrovan.<sup>10</sup> Proteini mogu biti kristalizirani dodavanjem amonijevog sulfata. Tako kristalizirani proteini su veoma stabilni ako ih se drži u hladnjacima te se mnogi enzimi prodaju u takvom obliku. Sol se odvaja dijalizom ili gel filtracijom.<sup>18</sup>

Većina proteina se nepovratno oštećuje na povećanim temperaturama, ali postoje proteini koji su otporniji od drugih. Zagrijavanjem uzorka, koji se sastoji od više proteina, do određene temperature na određeno vrijeme može doći do odvajanja željenog proteina (otpornijeg na povišenje temperature) iz uzorka bez njegovog oštećenja. Precipitat se tada odvaja centrifugiranjem.<sup>18</sup>

#### 2.3.3.3. Kromatografija

Kromatografija je metoda kojom se sastojci smjese odjeljuju na temelju različite raspodjele između pokretne i nepokretne faze. Nepokretna odnosno stacionarna faza može biti krutina, kapljevinna ili

krutina premazana kapljevinom dok pokretna odnosno nestacionarna faza mora biti fluid (kapljevinu ili plin). Najčešće se nepokretna faza nalazi upakirana u koloni, dok pokretna struji kroz kolonu.<sup>19</sup>



**Slika 4.** Princip kromatografije: a) ionska b) afinitetna c) gel

Slika 4. prikazuje princip kromatografije. Uzorak se pomiče pomoću pokretne faze kroz nepokretnu fazu. Različite molekule imaju različitu brzinu putovanja kroz stacionarnu fazu te nastaju tzv. bandovi.<sup>18</sup>

Najčešće se u pročišćavanju proteina, o kojima nemamo dovoljno informacija, koristi ionska kromatografija koja se temelji na svojstvu protuiona. Ioni su vezani za nepokretnu fazu, a protuioni (ioni istog predznaka) se nalaze u otopini koja predstavlja pokretnu fazu. Prolaskom otopine kroz kolonu protuioni izmjenjuju mjesta s ionima te bivaju vezani za nepokretnu fazu. Prolaskom uzorka kroz kolonu dolazi do zadržavanja komponenti uzorka (različitim brzinama) na aktivnim mjestima nepokretne faze, ako sastavnice uzorka imaju afinitet prema nepokretnoj fazi.<sup>19,20</sup> Ionska

kromatografija se smatra najboljom metodom pročišćavanja enzima zbog velikog kapaciteta (mjerilo sposobnosti izmjene iona).<sup>19</sup>

Gel kromatografija se temelji na različitim veličinama i oblicima molekula proteina. Nepokretna faza sadrži pore u kojima zaostaju manje molekule dok veće molekule prolaze kroz kolonu. Prednost ove metode je ta što ne dolazi do vezanja komponenti uzorka na nepokretnu fazu, dok je nedostatak taj što se mogu koristiti samo manji volumeni koncentriranih uzoraka.<sup>18</sup>

Afinitetna kromatografija se temelji na interakciji proteina i liganda. Ligand je smješten na nepokretnoj fazi, a prolaskom uzorka kroz kolonu dolazi do interakcije imobiliziranog liganda i proteina. Željeni protein zaostaje dok ostali prolaze kroz kolonu. Ovaj postupak se temelji na specifičnosti nepokretne faze. Promjenom pH ili ionske jakosti pufera nakon interakcije uzorka i nepokretne faze lako se ispiru vezani protein. Još jedan oblik afinitetne kromatografije je afinitetna kromatografija na nosaču s imobiliziranim metalom. Najčešće su imobilizirani ioni nikla ili kobalta za koje se vežu His-grupe proteina. Ispiranje uzorka takvih kolona se odvija povećanjem koncentracije imidazola ili stripiranjem s EDTA.<sup>18</sup>

#### 2.3.3.4. Elektroforeza

Elektroforeza je naziv za migraciju električki nabijenih čestica kroz otopinu zbog djelovanja električnog polja.<sup>21</sup> Proteini imaju mogućnost kretanja u električnom polju i zbog toga se na njih može primijeniti metoda elektroforeze. Pri gel elektroforezi enzima najčešće se koristi poliakrilamidni gel. Metoda se može koristiti na gelu u obliku valjka iako se danas više koriste gelovi u obliku ploča za vertikalnu ili horizontalnu aparaturu. Proteini se ovom metodom razdvajaju na temelju različitih masa. U jažice na gelu se nanose mali volumeni uzorka (svega nekoliko  $\mu\text{L}$ ). Proteini manje mase brže se kreću kroz gel nalaze se pri dnu dok se proteini velikih masa nalaze blizu mjesta nanošenja uzorka.<sup>22</sup>



#### 2.3.4. Oblikovanje enzimskog produkta

Nakon pročišćavanja enzima slijedi posljednji korak, a to je njegovo oblikovanje. Ovaj korak je vrlo značajan za industrijske enzime.

Iako su enzimi neotrovne supstance i dalje ih se smatra alergenima te je potrebno poštivati mnoge regulative kako bi se osigurala njihova sigurnost. Još jedan od čestih problema su enzimi dobiveni genetičkim inženjstvom. U nekim državama su takvi enzimi zabranjeni ili strogo regulirani.<sup>5</sup>

Postupak pakiranja enzima se sastoji od poliranja enzimskog produkta, njegove stabilizacije i standardizacije. Poliranje se odnosi na uklanjanje nečistoća koje prethodnim postupcima nisu bile uklonjene. Kod enzima za posebne svrhe ovaj korak podrazumijeva uklanjanje pirogena, endotoksina, nukleinskih kiselina i virusa, dok kod industrijskih enzima obuhvaća uklanjanje soli, podešavanje pH (za enzime u tekućem obliku) i sušenje (za enzime u krutom obliku). Prednosti enzima u krutom obliku su njihovo jednostavno korištenje i transport te duži rok trajanja, a nedostatak je taj što dolazi do stvaranja prašine koja može uzrokovati alergijsku reakciju kod ljudi. Prednosti enzima u tekućem stanju su jednostavno doziranje i činjenica da se kod njih preskače postupak sušenja.<sup>2</sup>

Stabilizacija je veliki problem u proizvodnji enzima s obzirom na to da enzimi moraju izdržati skladištenje i transport bez značajnog gubitka aktivnosti. Upravo ih je zbog tog razloga potrebno držati u hladnjacima. Stabilizaciju je potrebno postići kako ne bi došlo do agregacije ili raspada i oštećenja trodimenzionalne strukture enzima. Proteini su stabilniji u koncentriranim otopinama i iz toga razloga im se dodaju neutralne soli koje stabiliziraju protein.<sup>2</sup>

Zadnji korak u proizvodnji enzima je standardizacija enzimskog produkta. S obzirom na to da su enzimi proizvedeni iz živih organizama postojat će razlike od šarže do šarže. Enzimski produkt bi trebao imati certifikat i dokument o najvažnijim informacijama o proizvodu, te bi trebao ispunjavati sve zahtjeve kvalitete prije nego što dođe do krajnjeg potrošača.<sup>2</sup>

## 2.4. Upotreba enzima

Početak korištenja enzima u industrijskoj proizvodnji započinje krajem Drugog svjetskog rata kao posljedica razvoja industrijske mikrobiologije i biokemijskog inženjerstva. Prvi potpuni enzimski proces je pretvorba škroba u glukozni sirup korištenjem bakterijske  $\alpha$ -amilaze i glukoamilaze.<sup>2</sup>

Korištenje enzima u industriji predstavlja više od 80% globalnog tržišta enzima. Razlikujemo dvije uporabe enzima, prva se odnosi na uporabu enzima u svrhu proizvodnje produkta iz sirovine, a druga na uporabu enzima u svrhu modifikacije određenih svojstava produkta.<sup>2</sup>

Primjena enzima u današnje vrijeme je rasprostranjena u mnogim područjima kao što su medicina, prehrambena industrija, tekstilna industrija, u proizvodnji proizvoda široke uporabe, u proizvodnji papira, itd.<sup>2</sup> Enzimi iz mikroorganizama zamijenili su mnoge biljne i animalne enzime i pronađena je njihova uloga u brojnim industrijama: prehrambena, proizvodnja detergenata, kože, tekstila i papira.<sup>23</sup>

Enzimi koji se koriste u proizvodnji proizvoda široke uporabe točnije u proizvodnji detergenata su:

- Proteaze, lipaze i amilaze za uklanjanje nečistoća
- Celulaze koje se koriste za očuvanje odjevnih predmeta
- Enzimi koji pospješuju izbjeljivanje (glukoza-oksidaza i lipoksigenaza)<sup>1</sup>

Enzimi imaju veliku ulogu u bioremedijaciji i zbrinjavanju otpada. Biološka obrada otpada obuhvaća aerobne i anaerobne procese u kojima mikroorganizmi pospješuju razgradnju organskih tvari. U ovom slučaju enzimi se koriste za uklanjanja određenih kemijskih spojeva. Njihova uporaba u bioremedijaciji ima veće prednosti od kemijske ili mikrobne remedijacije upravo zbog nastajanja biorazgradivih i manje štetnih nusprodukata.<sup>2, 15</sup>

Enzimi se mogu koristiti i u analitičkim metodama upravo zbog njihove specifičnosti i osjetljivosti. koriste se u slučajevima kada moramo izmjeriti količinu tvari niske koncentracije s minimalnim interferencijama.<sup>2</sup>

Enzimi se također mogu koristiti u terapijske svrhe. Najčešće se u tu svrhu koriste hidrolaze biljnog i životinjskog porijekla koje pomažu pri probavi, prevenciji karijesa i djeluju protuupalno.

Također biokataliza postaje sve učestaliji izbor u proizvodnji kiralnih molekula u kemijskoj i farmaceutskoj industriji.<sup>24</sup>

U medicini se enzimi koriste u svrhu liječenja i to iz dva razloga. Prvi razlog kada je dođe do nedovoljne prisutnosti određenog enzima u tijelu, a drugi kada je potrebno razgraditi određeni dio tkiva, izlučevine itd. Amilaze, proteaze, lipaze se tako koriste za razgradnju sastojaka hrane, proteolitički enzimi za selektivno razgrađivanje nekrotičnog tkiva, a penicilaze se koriste za razgradnju penicilina koji je u tijelu pacijenta uzrokovao akutnu alergijsku reakciju.<sup>13, 25</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Popis korištene aparature i kemikalija

##### 3.1.1. Aparatura

##### 3.1.1.1. Kromatograf

Na Slici 5. se nalazi kromatograf AKTAprime plus koji je korišten za pročišćavanje enzima afinitetnom kromatografijom.



*Slika 5.* Kromatograf AKTAprime plus

##### 3.1.1.2. Centrifuga

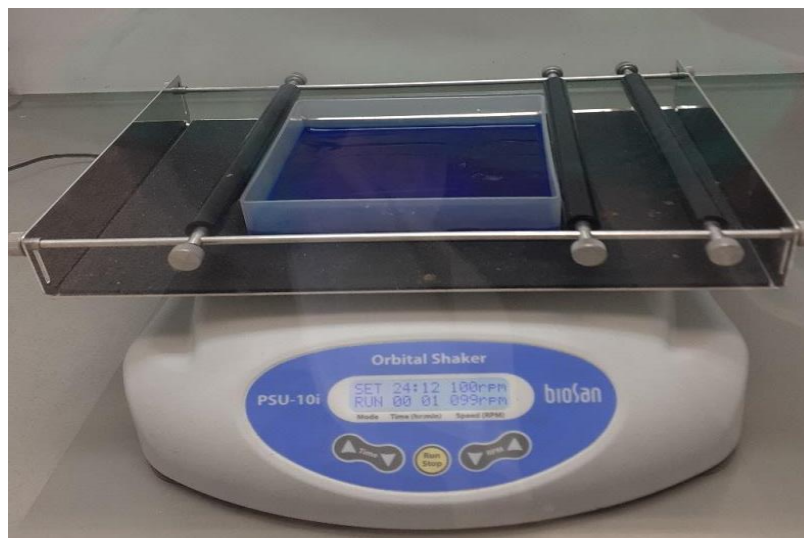
Za pripremu uzoraka za elektroforezu korištena je centrifuga vidljiva na Slici 6.



*Slika 6.* Centrifuga

### 3.1.1.3. Orbitalna tresilica

Na Slici 7. se nalazi orbitalna tresilica je korištena za bojanje i odbojavanje gela nakon elektroforeze.



*Slika 7.* Orbital shaker tresilica

### 3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom radu su: natrij-hidrogenfosfat bezvodni, natrij-dihidrogenfosfat-dihidrat, imidazol, natrijev klorid, MenD (007), amonijev persulfat, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin, akrilamid, natrijev dodecil sulfat, amonijev peroksididulfat, Tris pufer pH 6,8 (0.5 M) i 8,8 (1.5 M), glicin, glicerol, bromfenolplavo, proteinski marker,  $\beta$ -merkaptotanol, metanol, etanol, Coomassie Brilliant Blue G 250, fosforna kiselina i albumin.

## 3.2. Afinitetna kromatografija

### 3.2.1. Priprema pufera za afinitetnu kromatografiju

Za pripremu pufera za afinitetnu kromatografiju prvo je pripremljena 20 mM otopina natrijevog hidrogenfosfata pH vrijednosti 8,8 i 20 mM otopina natrijevog dihidrogenfosfata dihidrata pH vrijednosti 4. Temeljni pufer je dobiven miješanjem dviju prethodno navedenih otopina na magnetnoj miješalici do postizanja pH vrijednosti 7,4. S obzirom da su proteini osjetljivi na promjenu pH vrijednosti koristi se temeljni pufer kako bi se spriječila promjena pH vrijednosti. Pufer za ekvibraciju (A) i pufer za ispiranje (B) pripremljeni su tako da je u pufer A dodano 14,58 g, a u pufer B 7,30 g natrijevog klorida.

### 3.2.2. Priprema uzorka za afinitetnu kromatografiju

Uzorak je pripremljen tako da je enzim otopljen u temeljnom puferu. Za prvo pročišćavanje otopljeno je 0,0506 g enzima MenD u 1,2 mL temeljnog pufera ( $\nu=0.0422$  mg/L), a za drugo pročišćavanje je otopljeno 0,2005 g enzima u 2,5 mL temeljnog pufera ( $\nu=0.0802$  mg/L). Nakon otapanja, uzorci su profiltrirani kroz filter CHROMAFIL<sup>®</sup> Xtra, RC-45/25 0.45  $\mu$ m vidljiv na Slici 8 uz pomoć šprice.



**Slika 8.** Filter CHROMAFIL® Xtra, RC-45/25 0.45 µm

### 3.2.3. Provedba afinitetne kromatografije

Afinitetna kromatografija je provedena na kromatografskoj kolonom HisTrap™ excel (Slika 9.) na AKTAprime plus uređaju (Slika 5.). Kolona je prvo isprana s 5 volumena kolone destiliranom vodom kako bi se s nje uklonio etanol koji je korišten za skladištenje kolone. Korišten je preporučeni protok mobilne faze od 1 mL/min. Kolona je zatim isprana s 10 volumena kolone s puferom A. Pufer A se koristi za ekvilibraciju odnosno kondicioniranje kolone. Nakon ekvilibracije kolone, nanesen je uzorak pomoću šprice te je zatim ponovno propušten pufer A kroz kolonu, 20 volumena kolone. Tijekom ovog propuštanja pufera kroz kolonu, željeni protein se veže za punilo kolone dok se ostali proteini ispiru s kolone bez vezanja. Nakon toga je kolona isprana s puferom B, 5 volumena kolone, koji služi za ispiranje željenog proteina s kolone, u ovom slučaju enzima MenD. Tijekom provedbe ovog procesa u kivete su skupljene frakcije volumena 1 mL.

U svrhu stabilizacije uzoraka dodan je amonijev sulfat u sakupljene frakcije te su uzorci spremljeni u hladnjak na +4°C do daljnjeg korištenja.



*Slika 9.* Kromatografska kolona HisTrap<sup>TM</sup> excel

### 3.3. Elektroforeza

#### 3.3.1. Priprema otopina za elektroforezu

Za elektroforezu je bilo potrebno pripremiti pufer (Tris pH 8,8 i 6,8), 30%-tni akrilamid, 10%-tni natrijev dodecil sulfat (SDS) i 10%-tni amonijev peroksidisulfat (APS). Za pripremu 30%-tnog akrilamida je odvagano 8,7 g akrilamida i 0,3 g N,N'-metilenbisakrilamida. Otopina je zatim profiltrirana pomoću šprice i filtera RC-45.

#### 3.3.2. Priprema gelova za elektroforezu

Za elektroforezu je bilo potrebno pripremiti gel za razdvajanje i gel za koncentriranje.

Gel za razdvajanje je pripremljen miješanjem 33,5% vode, 25% 1,5 M Tris pufera pH vrijednosti 8,8, 40% akrilamida, 1% SDS-a, 0,5% APS-a i 0,05% tetrametiletildiamina (TEMED). Gel za koncentriranje je pripremljen miješanjem 60% vode, 24,7% 0,5 M Tris pufera pH vrijednosti 6,8, 13% akrilamida, 0,99% SDS-a, 0,99% APS-a i 0,1% TEMED-a.



### 3.3.3. Izlijevanje gela za elektroforezu

Nakon sastavljanja aparature za elektroforezu koja se nalazi na Slici 10., između stakalca je nanešen gel za razdvajanje. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje, gel za koncentriranje je nanešen i ostavljen da polimerizira.



*Slika 10.* Aparatura za elektroforezu

### 3.3.4. Priprema pufera i uzoraka za elektroforezu

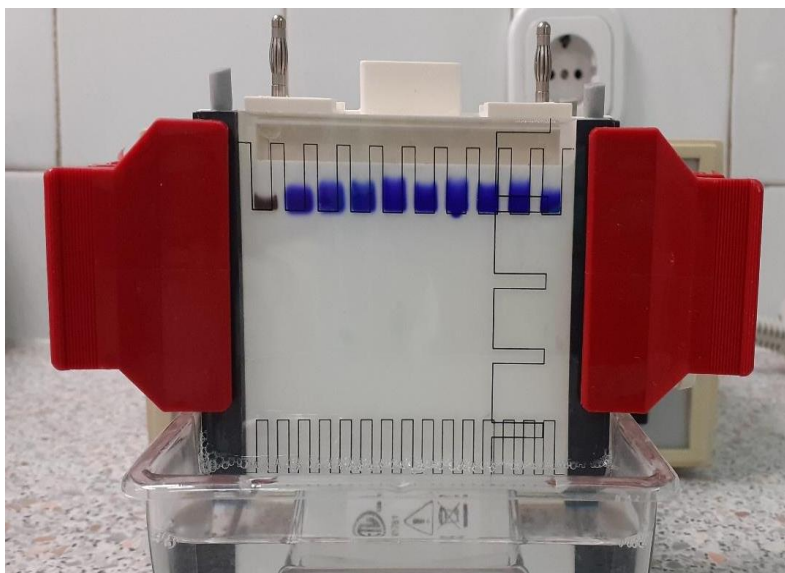
Pufer za elektroforezu je pripremljen miješanjem 30,285 g Tris pufera, 144,134 g glicina, 10 g SDS-a i 1000 mL vode. Otopinu je potrebno razrijediti 10 puta prije korištenja.

Pufer za pripremu uzoraka pripremljen je miješanjem 0,20 mL 10%-tnog bojila bromfenolplavo, 3,55 mL vode, 1,25 mL 0,5 M Tris pufera pH vrijednosti 6,8, 2,50 mL glicerola i 2 mL SDS-a. Neposredno prije pripreme uzorka u 0,950 mL pufera za pripremu uzoraka je dodano 50  $\mu$ L  $\beta$ -

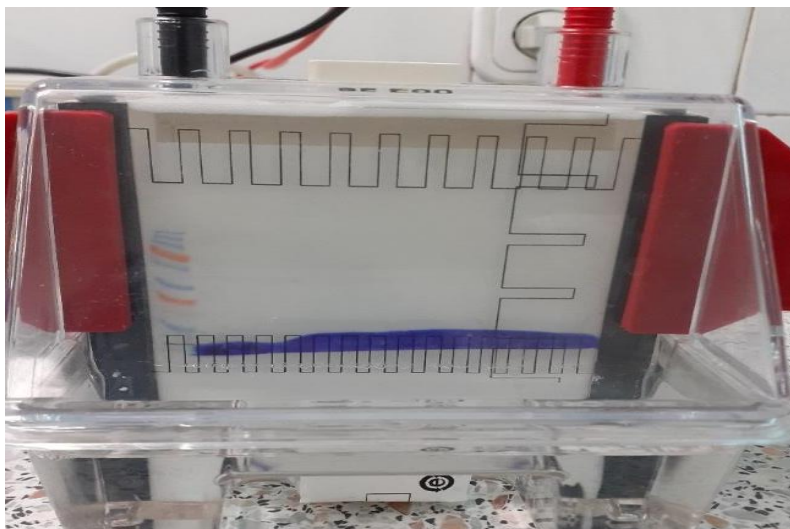
merkaptoetanola. Pomiješano je 0,010 mL uzorka i 0,010 mL pufera za pripremu uzoraka nakon čega su uzorci centrifugirani 1 minutu. Nakon toga se uzorci stavljaju na sušenje u sušionik na 10 minuta na 95°C te se ponovno centrifugiraju 1 minutu.

### 3.3.5. Provedba elektroforeze

Nakon što je složena aparatura za provedbu elektroforeze (Slika 10.) napunjen je prostor iznad jažica (i jažice) i gornja komora puferom za elektroforezu. Prva jažica se puni proteinskim markerom dok se ostale pomoću igle ispunjavaju s 0,010 mL već prije pripremljenim uzorcima. Nakon toga se donja komora ispunjava puferom za elektroforezu. Elektroforeza se provodila pri konstantnom naponu od 100 V na 10 minuta (Slika 11.), a zatim pri 200 V toliko dugo dok se uzorci nisu spustili na dno stakalca što bi bilo otprilike 45 minuta (Slika 12.).



*Slika 11.* Početak elektroforeze



*Slika 12.* Kraj elektroforeze

### 3.3.6. Bojanje gelova

Prije bojanja gelova potrebno je pripremiti otopinu za bojanje koja je pripremljena miješanjem 0,1 g Coomassie Brilliant Blue-a, 50 mL metanola, 7 mL 10%-tne octene kiseline i 43 mL vode. Otopina za bojanje se izlije u kadu za bojanje, u koju se dodaje gel s elektroforezete se bojanje provodi na Orbital tresilicu na 100 okr/min tijekom sat vremena .

Nakon bojanja gela potrebno je provesti i njegovo odbojavaje. koje se provodi 10%-tna octena kiselina. Odbojavanje se vrši pri istim uvjetima kao i bojanje te traje do pojave proteinskih bandova na gelu (otprilike sat vremena).

### 3.4. Određivanje koncentracije proteina- metoda po Bradfordu

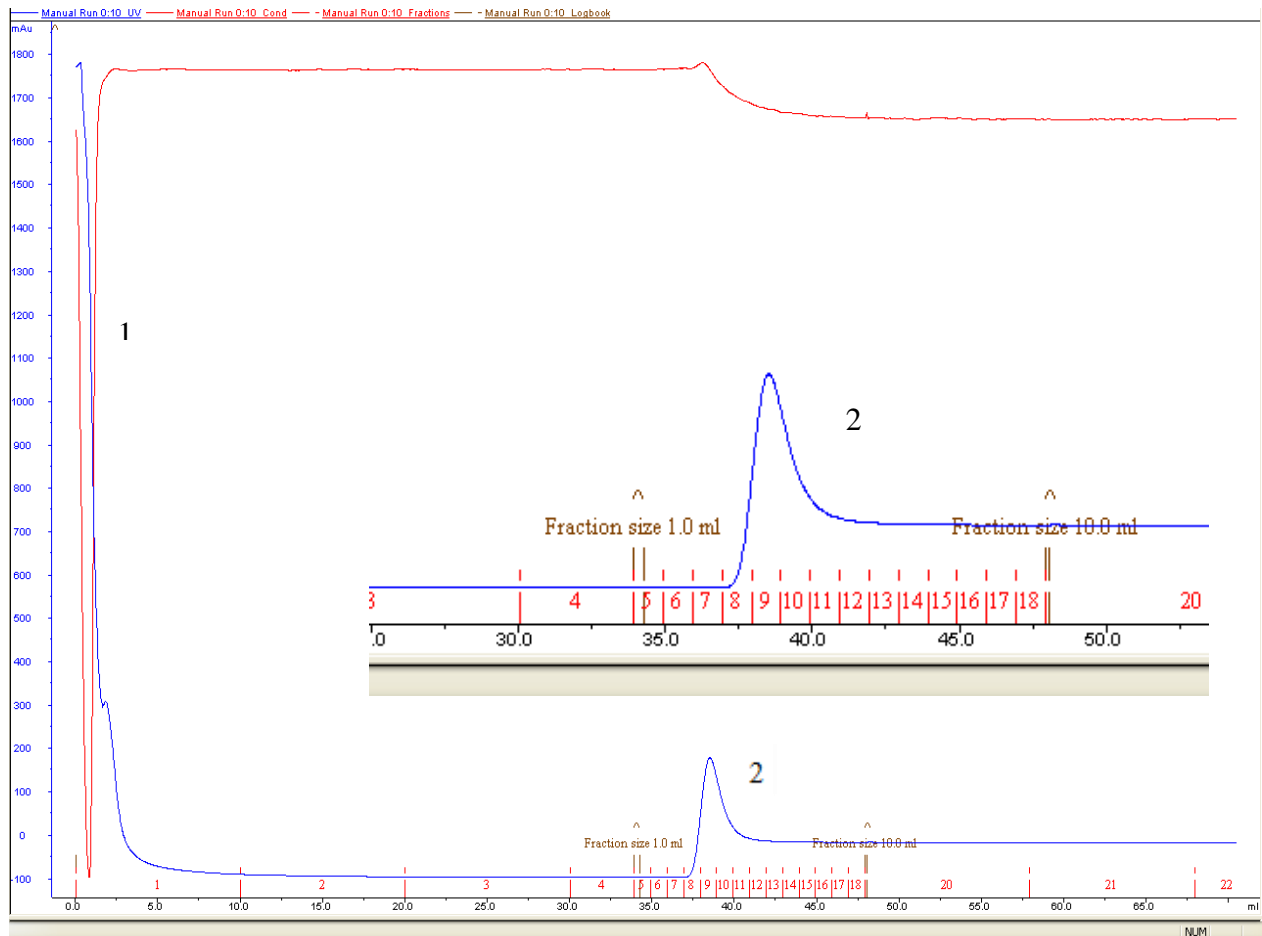
Metoda po Bradfordu je spektrofotometrijska metoda koja se koristi za određivanju koncentracije proteina u uzorku na valnoj duljini od 595 nm. Prvo je potrebno pripremiti reagens na idući način: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 reagens s 50 mL etanola, 100 mL 85%-tne  $H_3PO_4$  i 850 mL redestilirane vode. Prije nego što se započne s mjerenjem apsorbancije uzoraka potrebno je

napraviti baždarni dijagram. Baždarni dijagram se izrađuje mjerenjem apsorbancije albumina iz goveđeg seruma poznatih koncentracija 1  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$  i 7  $\mu\text{g/mL}$ . Određivanje koncentracije proteina za baždarni dijagram i u uzorcima nepoznate koncentracije proteina se provodilo tako da se u kivetu dodaje 0,8 mL uzorka i 0,2 mL reagensa te se pričekava 5 minuta. Apsorbancija se mjerila u spektrofotometru na valnoj duljini od 595 nm, a koncentracija proteina u uzorcima se izračuna pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

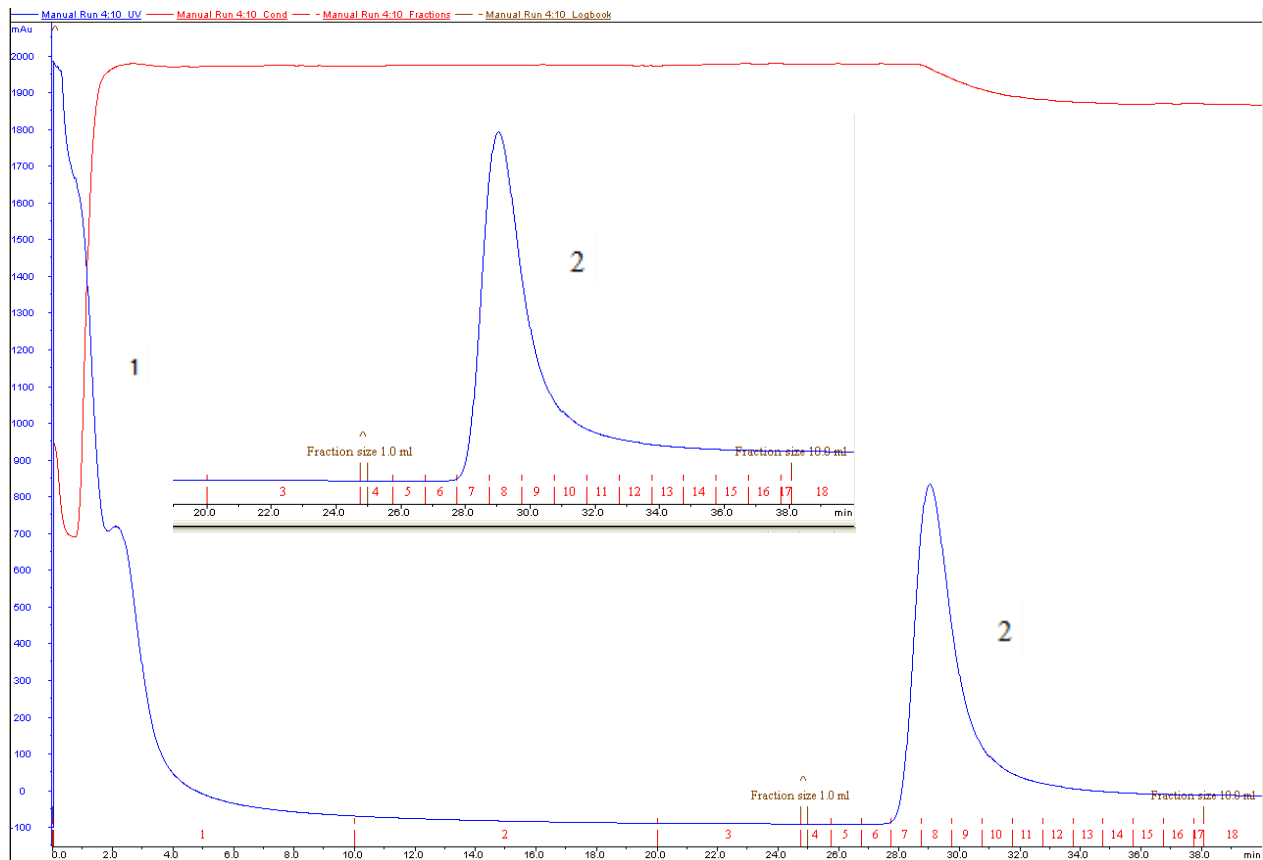
### 4.1. Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je korištena u svrhu pročišćavanja enzima MenD. Pročišćavana su dva uzorka: uzorak s manjom koncentracijom enzima (Slika 13.) i uzorak s većom koncentracijom enzima (Slika 14.). Tijekom kromatografije je mjerena apsorbancija (plava krivulja) i vodljivost (crvena krivulja). Apsorbancija ukazuju na prisutnost supstanci u uzorku. Vodljivost ukazuje na prisutnost iona soli. Nakon kondicioniranja kolone i nanošenja uzorka, kolona je isprana puferom A. Nagli pad apsorbancijske krivulje koji je označen brojem 1 na Slici 13. i Slici 14. upućuje da su neželjene supstance isprane s kolone. U idućem koraku kolona se ispire s puferom B. Krivulja vodljivosti naglo raste jer se u puferu B nalazi veća koncentracija natrijevog klorida u odnosu na pufer A. Na temelju pika apsorbancijska krivulje označenog brojem 2 na Slici 13. i Slici 14. pretpostavlja se da je enzim MenD uspješno eluiran s kolone.



**Slika 13.** Kromatogram za uzorak s manjom koncentracijom enzima (50 mg)

Na temelju Slike 13. vidljivo je da se enzim MenD nalazi u 7., 8., 9., 10., 11 i 12. frakciji. Najveća apsorbancija je u frakcijama 8. i 9. nakon čega koncentracija proteina pada u kasnijim frakcijama.

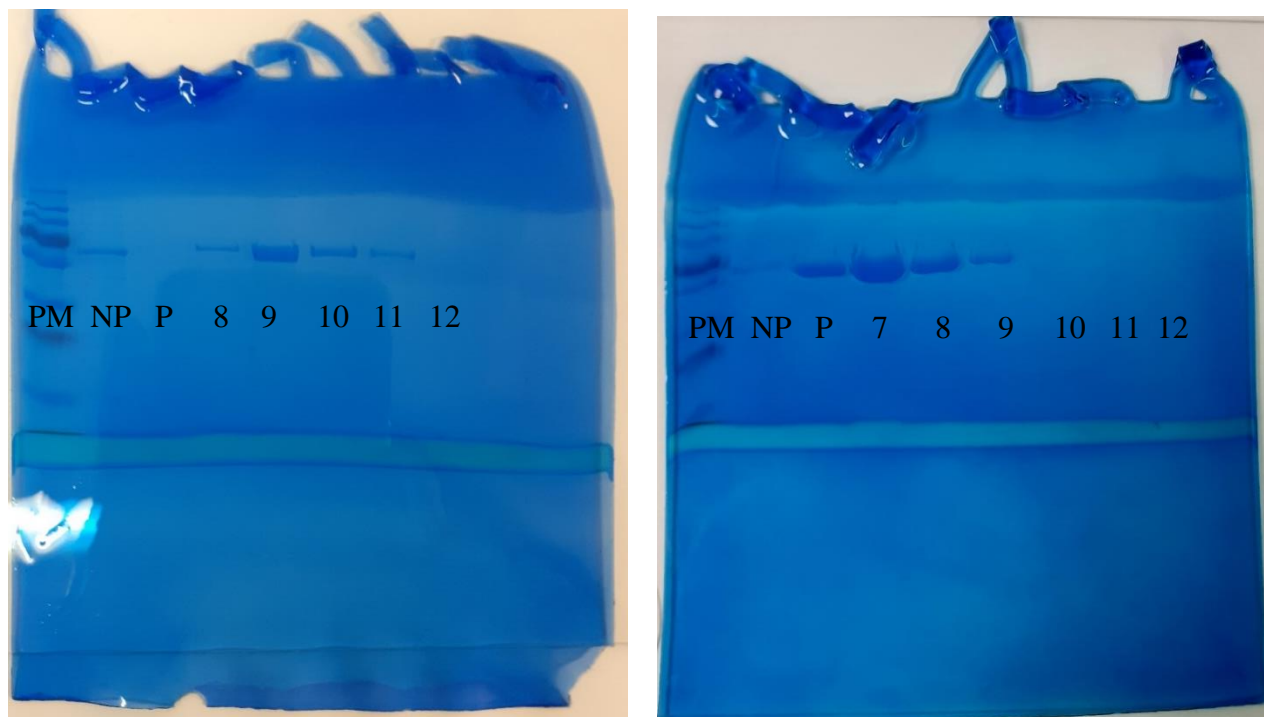


**Slika 14.** Kromatogram za uzorak s većom koncentracijom enzima (200 mg)

Na Slici 14. vidljivo je da se protein nalazi u frakcijama 8., 9., 10., 11. i 12. Najveća apsorbancija je u frakcijama 8., 9. i 10. Bitno je napomenuti kako je nanošenje uzorka (veće koncentracije) na kolonu bilo teže izvedivo zbog visoke gustoće uzorka.

#### 4.2. Elektroforeza

Elektroforeza je provedena u svrhu detekcije određenih proteina u uzorku. Proteinski marker se dodaje u jednu od jažica te se usporedbom obojenja u ostalim jažicama, u koje je dodan uzorak, može odrediti koja je molekulske mase proteina u uzorku.



**Slika 15.** Gelovi nakon elektroforeze za uzorak s manjom koncentracijom (lijevo) i za uzorak s većom koncentracijom enzima (desno); PM – proteinski marker; NP – nepročišćeni enzim; P – pročišćeni enzim

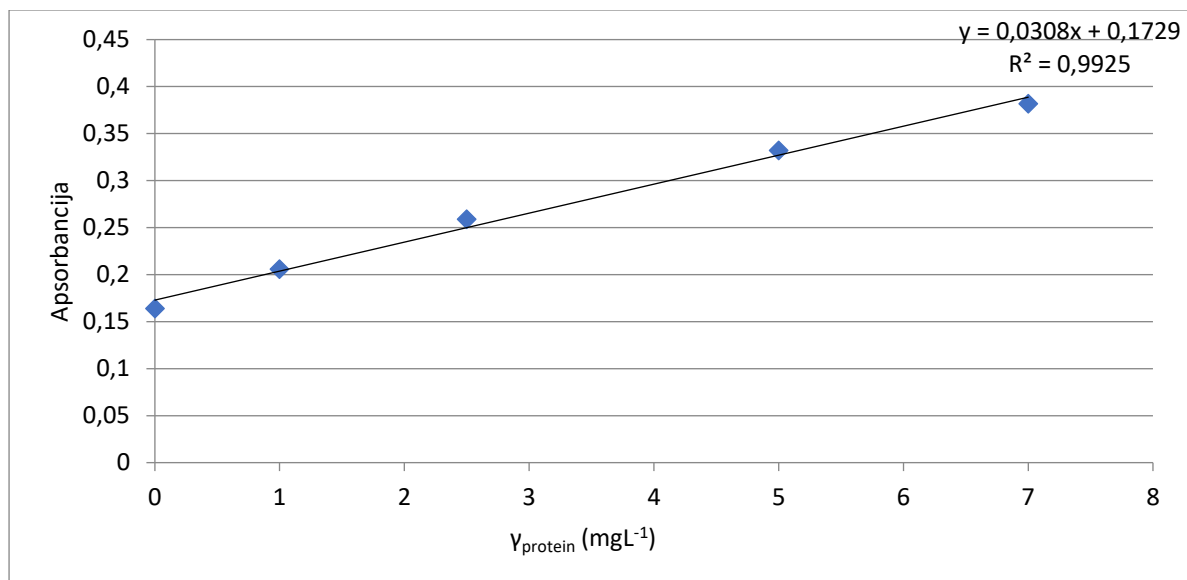
Za pročišćavanje uzorka s manjom koncentracijom enzima vidljivo je da se najveća koncentracija enzima očituje u frakcijama 9 i 10 što se donekle poklapa s rezultatima kromatograma. Enzim se nalazi u frakcijama 8 i 11 kao i u uzorku nepročišćenog enzima. U pročišćenom uzorku i u frakciji 12 nije detektiran enzim. (Slika 15. Lijevo)

Za pročišćavanje uzorka s većom koncentracijom enzima vidljivo je da se najveća koncentracija enzima očituje u frakcijama 7,8 i 9 što se ponovo donekle poklapa s rezultatima kromatograma. Enzim se nalazi u uzorcima pročišćenog i nepročišćenog enzima. U frakcijama 10, 11 i 12 nije detektiran enzim. (Slika 15. Desno)



### 4.3. Određivanja koncentracije proteina Bradford metodom

Prije određivanje masene koncentracije proteina u uzorcima korištenjem Bradfordove metode, potrebno je napraviti baždarni dijagram (Slika 16.).



**Slika 16.** Baždarni dijagram

Rezultati mjerenja proteina za uzorak manje koncentracije (50 mg) pokazuju da se najveća koncentracija proteina nalazi u frakciji 10 te ona iznosi 0,1832 mg/L, nakon nje slijede frakcija 9 (0,1692 mg/L), frakcija 11 (0,0652 mg/L) i frakcija 8 (0,0349 mg/L). Početna koncentracija proteina u uzorku iznosi 6,5779 mg/L.

Rezultati mjerenja proteina za uzorak veće koncentracije (200 mg) pokazuju da se najveća koncentracija proteina nalazi u frakciji 8 te ona iznosi 0,0447 mg/L, nakon nje slijede frakcija 9 (0,0382 mg/L), frakcija 7 (0,0089 mg/L) i frakcija 10 (0,0014 mg/L). Početna koncentracija proteina u uzorku iznosi 1,1234 mg/L.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je ispitana mogućnost pročišćavanja enzima MenD te su provedena dva pročišćavanja, pročišćavanje s manjom masom uzorka (50 mg) koncentracije 0.0422 mg/L i većom masom uzorka (200 mg) koncentracije 0.0802 mg/L. Za pročišćavanja je korištena metoda afinitetne kromatografije s kromatografskom kolonom HisTrap<sup>TM</sup> excel. Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti da se manja i veća masa uzorka mogu pročistiti ovom metodom, iako je nanošenje uzorka veće koncentracije na kolonu teže izvedivo.

Potvrda postojanja enzima MenD u prikupljenim frakcijama nakon provedene afinitetne kromatografije je bila provedena elektroforezom. Na gelu na kojem je provedena elektroforeza uzorka veće koncentracije je vidljivo veće obojenje i to u više frakcija u odnosu na gelu na kojem je provedena elektroforeza uzorka manje koncentracije. Na temelju tih spoznaja se može zaključiti da je iz uzorka veće koncentracije pročišćeno više enzima u odnosu na uzorak manje koncentracije.

Kao dodatna metoda u ovom radu korištena je Bradfordova metoda za određivanje koncentracija enzima u frakcijama. Bilo je moguće odrediti koncentraciju oba uzorka uz prethodnu izradu baždarnog dijagrama.

## 6. LITERATURA

- [1] Bommarius A., Riebel B., Biocatalysis, Wiley- VCH, Weinham, 2004. (str. 1-3; 138-140)
- [2] Illanes A., Enzyme biocatalysts, Springer, 2008. (str. 1-6; 16-20; 60-70; 84-87)
- [3] Bhasin M., Billinsky J., and Palmer D., Steady-State Kinetics and Molecular Evolution of Escherichia coli MenD [(1R,6R)-2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate Synthase], an Anomalous Thiamin Diphosphate-Dependent Decarboxylase-Carboligase, American Chemical Society, 2003. (str. 1)
- [4] Filipović I., Lipanović S., Opća i anorganska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1995. (str. 464-467)
- [5] Ghisalba O., Meyer H., Wohlgemuth R., Industrial Biotransformation, John Wiley & Sons, Inc, Švicarska, 2010. (str. 1)
- [6] Palmer T., Bonner P., Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry- Drugo izdanje, Woodhead Publishing, 2007. (str. 2-3; 15-18; 68-71)
- [7] Findrik Blažević Z., Bioreaktori: Interna skripta za dio kolegija reaktori i bioreaktori, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017. (str. 13-14)
- [8] Pojmovnik, [http://eskola.chem.pmf.hr/udzbenik/web\\_Sikirica/e-pojmovnik.html](http://eskola.chem.pmf.hr/udzbenik/web_Sikirica/e-pojmovnik.html) (22. Srpnja 2020.)
- [9] Biology online, Induced fit model, <https://www.biologyonline.com/dictionary/induced-fit-model> (22. Srpnja 2020.)
- [10] Leksikonski zavod Miroslav Krleža, Hrvatska enciklopedija, <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=36334> (23. Srpnja 2020.)
- [11] New England Biolab, Cloning Ligation, <https://www.nebiolabs.com.au/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-ligation/cloning-ligation> (23. Srpnja 2020.)
- [12] The Allison Lab, <https://allison.bio.uci.edu/projects/completed-projects/extracellular-enzymes-and.html> (24. Srpnja 2020.)
- [13] Portal hrvatske tehničke baštine, Tehnička enciklopedija 1963.-1997., Peti svezak Elek-F 1976., Enzimi, <https://tehnika.lzmk.hr/tehnicka-enciklopedija-1966-1997/>, (24. Srpnja 2020.)

- [14] Imobilizirani enzimi i njihova uporaba, <https://hr.sodiummedia.com/4108098-immobilized-enzymes-and-their-use>, (24. Srpnja 2020.)
- [15] Hollmann F., Byung Park J., Bühler B., The use of enzymes in the chemical industry in Europe Andreas Schmid, Elsevier, 2002. (str. 359)
- [16] Wohlgemuth R., Comprehensive Biotechnology- Drugo izdanje, Pergamon, 2011. (str. 591-601)
- [17] Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, J. Pollard David, M. Woodley John, ScienceDirect, 2006. (str. 66)
- [18] Buxbaum E., Fundamentals of Protein Structure and Function, Springer, 2007. (str. 39-43)
- [19] Dennison C., A guide to Protein Isolation, Kluwer Academic Publishers, 2002. (str. 67-68; 71-72)
- [20] Bolanča T., Ukić Š., Ionska Kromatografija: Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013. (str. 1)
- [21] Piljac I., Elektroforeza, Sveučilište u Zadru, Zadar, 2006. (str. 1)
- [22] E-škola, <http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor293.htm> (12. srpnja 2020.)
- [23] Illanes A., Cauerhff A., Wilson L., Castro G.R., Recent trends in biocatalysis engineering, Elsevier, 2011. (str. 49)
- [24] Nestl B.M., Hammer S.C., Nebel B., Hauer B., New Generation of Biocatalysts for Organic Synthesis, Angew. Chem. Int. Ed. 2014. (str. 3071)
- [25] Narancic T., Davis R., Nikodinovic-Runic J., O' Connor K.E., Recent developments in biocatalysis beyond the laboratory, Springer, 2015.

## 7. POPIS SIMBOLA I OZNAKA

$c$  - množinska koncentracija ( $\text{mmol}/\text{dm}^3$ )

$\gamma$  - masena koncentracija ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )

$V$  - volumen (mL)

$m$  - masa (g)

ABS – apsorbancija

PM – proteinski marker

NP – nepročišćeni enzim

P – pročišćeni enzim

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - natrijev hidrogenfosfat

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  - natrijev dihidrogenfosfat dihidrat

$\text{NaCl}$  - natrijev klorid

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - amonijev sulfat

$\text{H}_2\text{O}$  – voda

$\text{HCl}$  – klorovodična kiselina

$\text{H}_3\text{PO}_4$  – fosforna kiselina

$\text{CH}_3\text{COOH}$  – octena kiselina

MetOH – metanol

ThDP – tiamin difosfat

MenD – sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline

BSA – albumin

MBAm – N,N'-metilbisakrilamid

SDS – natrijev dodecilsulfat

APS – amonijev peroksidisulfat

TEMED – tetrametiletilendiamin

BPB – bromfenolplavo

CBB - Coomassie Brilliant Blue

## Životopis

Nolla Todorović [REDACTED] U osnovnu školu Rapska kreće 2004. godine te 2012. godine upisuje X. Gimnaziju "Ivan Supek". Nakon završene srednje škole, 2016. godine odlučuje nastaviti obrazovanje na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije (studij Ekoinženjerstva) Sveučilišta u Zagrebu.