

# Pročišćavanje enzima lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*

---

Osrečak, Magdalena

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:353193>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREB  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Magdalena Osrečak

Pročišćavanje enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*

Završni rad

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Bruno Zelić

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, rujan 2018.

## Sažetak

Enzimi ili biološki katalizatori su tvari koje ubrzavaju biokemijske procese u živim organizmima. Lipaza je enzim široko rasprostranjen u prirodi i u mnogim životinjskim vrstama, biljkama, bakterijama, kvascima i gljivicama. Lipaza katalizira hidrolizu i sintezu estera formiranih iz glicerola i dugolančanih masnih kiselina. *Thermomyces lanuginosus* spada u skupinu gljiva. Enzimi koje ona proizvodi razgrađuju škrob i spadaju u termički najstabilnije enzime dobivene iz gljiva.

U ovome radu opisane su metode koje se koriste za pročišćavanje enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* kao i praktična primjena enzima lipaze. Metode koje se koriste pri pročišćavanju enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* najčešće uključuju procese kromatografije i ekstrakcije.

Ključne riječi: *Thermomyces lanuginosus*, enzimi, lipaza, pročišćavanje

## Abstract

Enzymes or biological catalysts are substances that accelerate biochemical processes in living organisms. Lipase is an enzyme widely found in nature and in many animal species, plants, bacteria, yeast, and fungi. Lipase catalyzes the hydrolysis and synthesis of esters formed from glycerol and long-chain fatty acids. *Thermomyces lanuginosus* belongs in the group of fungi. The enzymes it produces break down the starch and produce the most thermally stable enzymes obtained from the fungus. This work describes the methods used to purify enzyme lipase from *Thermomyces lanuginosus* and the practical application of lipase in daily life. Methods used for the purification of enzyme lipase from *Thermomyces lanuginosus* most commonly include chromatographic and extraction processes.

Key words: *Thermomyces lanuginosus*, enzymes, lipase, purification

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	3
3. PREGLEDNI DIO .....	5
3.1. Thermomyces lanuginosus.....	5
3.2. Enzim lipaza .....	7
3.3. Ekstrakcija proteina .....	7
3.3.1. Ekstrakcija proteina topljivih u vodi porijeklom iz životinjskih stanica i tkiva	8
3.3.2. Ekstrakcija proteina topljivih u vodenim otopinama porijeklom iz jednostaničnih organizama .....	9
3.3.3. Ekstrakcija proteina topljivih u vodi porijeklom iz biljnog tkiva .....	10
3.3.4. Ekstrakcija proteina topljivih u lipidima.....	10
3.3.5. Ekstrakcija agregiranog proteina.....	11
3.4. Kromatografske metode .....	11
3.4.1. Kromatografija isključenja po veličini.....	12
3.4.2. Ionsko izmjenjivačka kromatografija.....	16
3.4.3. Afinitetna kromatografija .....	18
3.5. Mikrobiološki procesi i mediji za proizvodnju enzima lipaze .....	20
3.5.1. Čimbenici koji utječu na proizvodnju enzima lipaze .....	21
3.5.2. Utjecaj izvora ugljika na proces proizvodnje enzima lipaza.....	22
3.6. Pročišćavanje enzima lipaza .....	23
3.7. Proizvodnja enzima lipaze porijeklom iz Thermomyces lanuginosus .....	23
3.8. Proizvodnja i pročišćavanje izvanstaničnog enzima lipaze porijeklom iz Thermomyces lanuginosus na ekstraktu ljuski palminog ploda .....	24
3.8.1. Postupak pročišćavanja .....	24
3.9. Identifikacija mikroorganizama koji proizvode enzim lipazu.....	25

3.10. Biodizel dobiven transesterifikacijom uz enzim lipazu kao katalizator .....	25
3.11. Primjena lipaze .....	26
3.11.1. Lipaza u industriji deterdženata.....	27
3.11.2. Primjena lipaza u prehrambenoj industriji .....	27
3.11.3. Lipaza u industriji celuloze i papira.....	27
3.11.4. Primjena lipaza u organskoj sintezi .....	28
3.11.5. Primjena lipaza u biotransformacijama provedenim u dvofaznim sustavima .....	28
3.11.6. Primjena lipaza u biotransformacijama provedenim u organskom mediju .....	28
3.11.7. Primjena lipaza u regioselektivnim acilacijama .....	28
3.11.8. Djelovanje lipaza u otopini racemata organskih kiselina i alkohola .....	29
3.11.9. Primjena lipaza u proizvodnji biodizela .....	29
4. Zaključak .....	30

## 1. UVOD

Biokemijski procesi koji se odvijaju u živim bićima, a koje kataliziraju enzimi koji su u osnovi proteini, su složeni. Proteini su neophodni za odvijanje životnih funkcija. Proteini su polimeri sastavljeni od aminokiselina kao monomera. Protein se sastoji od približno dvadeset prirodnih aminokiselina od kojih je svaka određena aminoskupinom i karboksilnom skupinom. Enzimi reguliraju biokemijske aktivnosti o kojima ovisi opstanak stanica. Sposobnost enzima da kontroliraju metaboličke reakcije ovisi i o načinu polimerizacije. Tako slijed aminokiselina u proteinu određuje oblik proteina kao i njegovu funkciju [1]. Enzimi su bitni za kemijsku, prehrambenu, tekstilnu, farmaceutsku industriju, koriste se u medicini i veterini, te za proizvodnju biogoriva.

Metode koje se koriste za pročišćavanje proteina najčešće uključuju procese kromatografije i ekstrakcije. Ovisno o razlikama između svojstava proteina koji se trebaju pročistiti i svojstava ostalih supstancija koje se nalaze u uzorku, za pročišćavanje smjese proteina koriste se različite metode [2].

Lipaza je sveprisutan enzim znatnog fiziološkog značaja i industrijskog potencijala. Ima ulogu u transportu i preradi hranidbenih lipida (triglicerida, masti i ulja) u većini, ako ne i svim živim organizmima. Katalizira hidrolizu triglicerola u glicerol i više masne kiseline. Enzim lipaza aktivira se samo kada se apsorbira na granici ulje – voda, a ne hidrolizira otopljene supstrate u velikoj količini vodene otopine. Enzim lipaza može razdvojiti emulgirane estere glicerina i dugolančane masne kiseline kao što su triolein i tripalmitinin. Enzim lipaza pokazuje malu aktivnost u vodenoj otopini koja sadrži topljive supstrate. Može se proizvesti iz različitih mikroorganizama i viših eukariota. Većina komercijalno korištenog enzima lipaze je mikrobnog podrijetla [3,4].

Gljive ili fungi obuhvaćaju kvasce i plijesni te skupinu makroskopskih organizama, često nazvanih mesnatim gljivama. Gljive su eukarioti, nefotosintetski organizmi. Stanice gljiva su obavijene staničnom stijenkom koja je najčešće sastavljena od polisaharida hitina. Gljive mogu biti jednostanične i višestanične. Neke višestanične gljive nalikuju biljkama, ali ne mogu provoditi proces fotosinteze kao što mogu biljke. Veliki broj gljiva pripada porodicama s kojima se susrećemo svaki dan. Zajedno s bakterijama sudjeluju u razgradnji organskih tvari u okolišu. Gljive se od

bakterija razlikuju u nizu osobina kao što su veličina (gljive su općenito veće), struktura, stanična struktura i način razmnožavanja. Gljive imaju izrazitu biokemijsku aktivnost, stoga mnoge gljive imaju i komercijalnu ulogu u proizvodnji piva, vina, fermentiranih mliječnih proizvoda te antibiotika. Neke vrste gljiva uzrokuju infektivne bolesti kod ljudi, a druge mogu razgrađivati namirnice [1]. *Thermomyces lanuginosus* je organizam koji spada pod gljive. Cilj ovog rada je objasniti metode pročišćavanja enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*.



## 2. OPĆI DIO

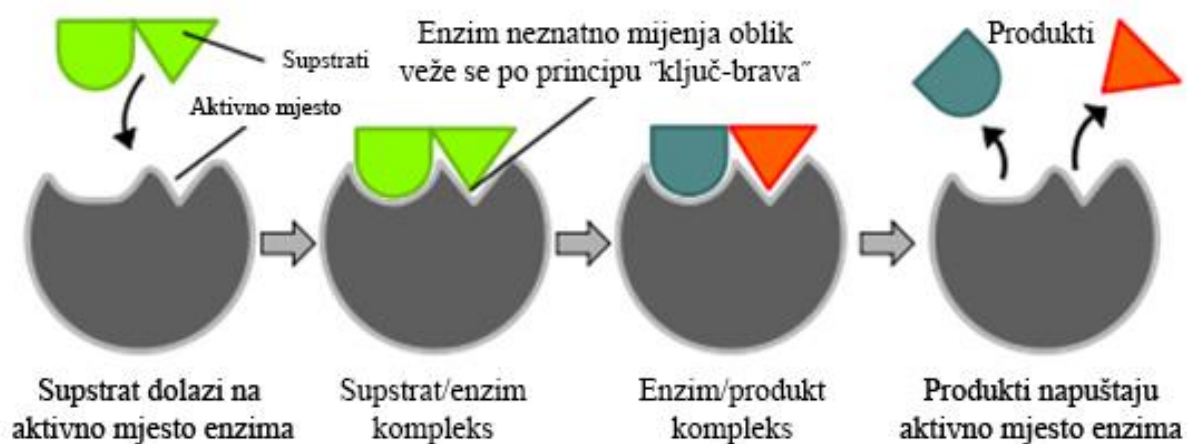
Enzimi ili biološki katalizatori su tvari koje ubrzavaju biokemijske procese u živim organizmima. Enzimi su proizvodi žive stanice, a po kemijskoj su prirodi proteini iako među njima ima i katalitičkih ribonukleinskih kiselina. Po reakcijama koje kataliziraju enzimi se svrstavaju u šest skupina: *oksidoreduktaze* (reakcije oksidacije i redukcije), *transferaze* (prijenos skupina atoma), *hidrolaze* (hidrolitičke reakcije), *liaze* (eliminacija skupina atoma uz nastanak dvostruke veze), *izomeraze* (reakcije izomerizacije) i *ligaze* (reakcije stvaranja kovalentne veze uz istodobnu hidrolizu adenozin-trifosfata). Postoje dvije metode fermentacije koje se koriste za proizvodnju enzima. Prva metoda je submerzna fermentacija, a druga je fermentacija na čvrstim nosačima. Kod sumberzne fermentacije proizvodnja enzima provodi se djelovanjem mikroorganizama u kapljevitom hranjivom mediju. Kod fermentacije na čvrstim nosačima se uzgoj mikroorganizama i proizvodnja enzima provode na čvrstom supstratu.

Enzimi se izoliraju različitim metodama pri čemu se za izolaciju ekstracelularnih proteina mogu koristiti jednostavni procesi kao što je centrifugiranje dok je za intracelularne enzime prvo nužno razbiti staničnu stjenku te su za ovu vrstu proteina postupci izolacije i pročišćavanja dugotrajniji i kompleksniji. Tvari na koje enzim djeluje nazivaju se njegovim *supstratima* (Slika 1). Naziv enzima obično se tvori dodatkom sufiksa -aza nazivu supstrata ili nazivu reakcije koju katalizira. Često se rabe i stara trivijalna imena. Enzimi su katalizatori kojima se aktivnost može regulirati tvarima koje nisu njihovi supstrati, pa to omogućuje skladno funkcioniranje svih procesa u živoj stanici i organizmu. Aktivnost pojedinih enzima koče njihovi specifični inhibitori, a pojačavaju je aktivatori [5]. Enzimi se koriste u različitim industrijskim granama, a kao sporedni produkti nastaju u onim industrijskim procesima koji kao osnovni proizvodni proces imaju fermentaciju. Najznačajniji predstavnici ovih industrijskih grana su proizvodnja vina, piva i sira.

Afinitetna kromatografija je najčešće korištena metoda pročišćavanja proteina i koristi se kao prvi korak pročišćavanja kada je ciljani protein specifičan. U daljnjim koracima pročišćavanja potrebne su dodatne metode koje se koriste za uklanjanje prisutnih nečistoća. Pročišćavanje nespecifičnih proteina često zahtjeva korištenje

nekoliko stupnjeva pročišćavanja, odnosno nekoliko različitih metoda pročišćavanja koje je potrebno koristiti odgovarajućim redoslijedom [2].

Korištenje enzima za provedbu procesa može se pratiti još od drevnih civilizacija. Danas je poznato otprilike 4.000 enzima, a oko 200 je u komercijalnoj upotrebi. Većina industrijski korištenih enzima mikrobnog je podrijetla. Enzimi se primjenjuju u različitim granama industrije kao što su kemijska, prehrambena, tekstilna i farmaceutska industrija, u proizvodnji biogoriva, medicini, veterini, i kozmetici [6].



Slika 1. Djelovanje enzima na supstrate

### 3. PREGLEDNI DIO

#### 3.1. *Thermomyces lanuginosus*

*Thermomyces lanuginosus* je gljiva, slobodnoživući patogen koji je uključen u neke bolesti kod životinja te povezan s kvarljivošću raznih poljoprivrednih proizvoda. *Thermomyces lanuginosus* dobro proizvodi spore na većini laboratorijskih medija, a nastale spore su termostabilne [7]. Enzimi koje proizvodi *Thermomyces lanuginosus* razgrađuju škrob i spadaju u termički najstabilnije enzime koji se dobivaju iz gljiva. Visoka čistoća proizvoda (glukoza i maltoza) i njihova termostabilnost ukazuju na potencijalnu korisnost glukoamilaze i  $\alpha$ -amilaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* u enzimatskoj saharifikaciji škroba. Enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces Lanuginosus* je jednolančani protein koji se sastoji od 269 amino kiselina. Njegova molekularna masa je 31.700 g/mol i približno je kružnog oblika.

Enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* je prilično stabilan, održava svoju aktivnost na temperaturama od 55 do 60 °C, s maksimalnom aktivnošću pri pH-vrijednosti 9. Lipaze općenito imaju tendenciju formiranja bimolekularnih agregata na način da se međusobno povezuju svojim aktivnim centrima. Enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* spada u grupu lipaza s jačom tendencijom formiranja bimolekularnih agregata, a vezanje je toliko snažno da se čak i druge imobilizirane lipaze mogu koristiti za pročišćavanje ili čak imobiliziranje enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*. Ova činjenica treba se uzeti u obzir prilikom ocjenjivanja svojstava enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* jer njen monomer i dimer pokazuju različite karakteristike obzirom na aktivnost, stabilnost i selektivnost [8,9].

U istraživanju koje su proveli Rajasekaran i Maheshwari [10], sa svrhom utvrđivanja prirodnog staništa termofilnih gljivica, koristila se imunofluorescentna mikroskopija za praćenje rasta termofilnih gljivica u tlu. Spore *Thermomyces lanuginosus* (sveprisutnih termofilnih gljivica) nanese su na satna stakalca i ukopane u poljsko tlo gdje je razina vlage povoljna za rast mikroba, dok je temperatura tla za vrijeme odvijanja eksperimenta varirala od 22 do 28 °C. Satna stakalca sa sporama prikupljena su nakon tri tjedna, a klijavost spora je provjerena bojanjem s pripravkom fluorescentnog izotiacianatom konjugiranog antitijela koji se

koristi kako bi se specifično identificirao rast gljivica. Međutim, spore su ostale latentne unatoč tome što su spore koje su u laboratoriju bile pohranjene na sličan način (ispod zemlje), ali u petrijevim zdjelicama, u inkubatoru na temperaturi 50 °C proklijale (Slika 2). Ovi rezultati nisu poduprijeli stav da je zemlja „prirodno stanište“ termofilnih gljivica. Razni uređaji za prikupljanje uzoraka zraka prikupili su i spore termofilnih gljivica iz zraka u državama s umjerenom klimom (Slika 3). Njihova široko rasprostranjena pojava u tlu vjerojatno je posljedica zračnog raspršivanja spora, primjerice iz procesa kompostiranja, putem zračnih struja. Termofilne gljivice su primarno kompostne gljivice budući da je koncentracija spora termofilnih gljivica po gramu kompostnog materijala otprilike  $10^6$  puta veća nego u tlu [7].



Slika 2. Kolonije *Thermomyces lanuginosus* na satnom stakalcu pri temperaturi 50 °C



Slika 3. Mikroskopski prikaz spore *Thermomyces lanuginosus*

### 3.2. Enzim lipaza

Lipaza je enzim koji hidrolizira trigliceride u masne kiseline i glicerol. Široko je rasprostranjena u prirodi, a pronađena je u mnogim vrstama životinja, biljkama, bakterijama, kvascima i gljivicama. Važna karakteristika lipaza je njihova sposobnost hidroliziranja esterske veze, kataliziranje reakcije transesterifikacije triglicerida, razdvajanje komponenata racemične smjese te kataliziranje sinteze esterske veze u bezvodnom mediju. Poznato je da su lipaze najčešće korišteni enzimi u organskim sintezama [9]. Kod eukariota, enzim lipaza je uključen u različite faze metabolizma kao što su razgradnja masti, apsorpcija, promjena sastava i metabolizma lipoproteina. Kod biljaka lipaza se nalazi u tkivima kao energetska zaliha [6]. Enzim lipaza se najčešće pročišćava ekstrakcijskim i kromatografskim metodama.

### 3.3. Ekstrakcija proteina

Općenito bi se procesi ekstrakcije i pročišćavanja proteina trebali provoditi pri nižim temperaturama, a najčešće se provode na temperaturama 0 – 4 °C. Izbor procesa ekstrakcije ovisi o vrsti uzorka i fizikalno-kemijskim svojstvima proteina. Prvi korak koji je potrebno provesti prije ekstrakcije je razbijanje stanične stijenke. Blaži uvjeti provedbe procesa razbijanja stanične stijenke rezultirat će većom

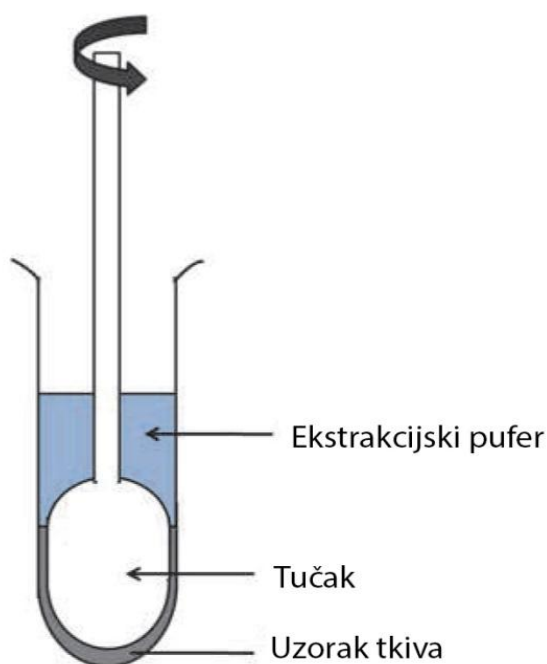
koncentracijom i aktivnošću ciljanog proteina. Većina životinjskih stanica je meka i lako lomljiva, pa se za njihovo razbijanje trebaju primijeniti blaže metode. Bakterije, gljivice i većina biljnih stanica imaju čvršću staničnu stjenku te je za njihovo razbijanje potrebno provesti intenzivnije procese. Sastav i svojstva ekstrakcijskog pufera ili otopine također su bitni. Puffer odgovarajuće koncentracije, ionske snage i pH-vrijednosti koristi se za ekstrakciju u vodi topljivog proteina. U nekim slučajevima, ekstrakcijskom puferu se dodaje deterdžent ili druga prikladna disocijacijska tvar. Inhibitori proteaze ponekada su potrebni kako bi se spriječilo uništavanje proteazom ekstrahiranih proteina. Činjenica je da ekstrakt proteina dobiven iz stanične membrane ima manje kontaminanata nego ekstrakt dobiven iz cijele stanice te ga je lakše pročistiti.

Uklanjanje dijelova stanice (stanični debris) potrebno je provesti prije same ekstrakcije proteina kako bi se povećala učinkovitost procesa i smanjio gubitak aktivnosti enzima. Proces razbijanja stanica, odnosno stanične membrane treba provoditi na način kako bi se što je moguće više smanjio utjecaj ovog procesa na ciljani enzim. Najučinkovitija metoda uklanjanja dijelova stanice je centrifugiranje koje je također potrebno provesti pri odgovarajućim uvjetima (pri nižim temperaturama) kako bi se smanjio gubitak aktivnosti ciljanog enzima [11].

### 3.3.1. Ekstrakcija proteina topljivih u vodi porijeklom iz životinjskih stanica i tkiva

Proteini, koji su komponente lomljivih jednostaničnih tkiva kao što su krvne stanice životinja, mogu biti ekstrahirani korištenjem hipotonične puferske otopine. Ako uzorak sadrži različite tipove stanica, razdvajanje različitih stanica prije same ekstrakcije učinit će pročišćavanje učinkovitijim i lakšim. Ova metoda temeljena je na osmozi, a također se koristi i za životinjske stanice uzgojene u sintetskim ili kompleksnim medijima. Za provedbu procesa ekstrakcije proteina iz životinjskih stanica i tkiva se u nekim slučajevima koristi i blagi surfaktant. Tretman ultrazvukom ili ciklusi zamrzavanja ili blaga mehanička agitacija mogu se koristiti u procesu razbijanja stanica i razdvajanju različitih staničnih komponenti. Za provedbu procesa razbijanja stanica višestaničnog mekog tkiva može se koristiti ručni ili električni homogenizator odgovarajuće veličine. Za uzorke malog volumena može se koristiti mikrocentrifugalna cijev čiji je kraj u obliku tučka (Slika 4). Za ekstrakciju proteina iz

tvrdog tkiva kao što je životinjski mišić potrebna je oprema kao što je primjerice blender s jakom oštricom koji osigurava razbijanje materijala veće vlažne čvrstoće. Druga metoda koja se koristi za razbijanje životinjskih i nekih biljnih stanica je dekompresija pomoću dušika. Kod ove metode stanice se komprimiraju strujom dušika u tlačnoj posudi. Nakon postizanja određenog kritičnog tlaka, ovisnog o vrsti stanica, tlak u posudi se u kratkom vremenu izjednačava s vanjskim tlakom što rezultira pucanjem stanične stijenke. Ovom metodom moguće je dobiti i netaknute organele [11].



Slika 4. Homogenizacija tkiva ručnim homogenizatorom

### 3.3.2. Ekstrakcija proteina topljivih u vodenim otopinama porijeklom iz jednostaničnih organizama

Ova grupa metoda koristi se za razbijanje stanične stijenke bakterija, kvasaca, gljivica i nekih algi. Njihove stanične stijenke jače su nego one životinjskih stanica stoga su potrebne drugačije metode kojima se može postići razbijanje stanične stijenke. Jednostavna, ali spora metoda je miješanje stanica, koja se može ubrzati dodatkom staklenih kuglica ili kuglica drugih materijala te tada ovu metodu razbijanja stanične stijenke nazivamo mljevenje kuglicama. Razbijanje stanične stijenke

ultrazvukom je druga metoda koja se koristi za razbijanje ove vrste stanica. Pri tome se razbijanje stanica provodi u odgovarajućem puferu kome za ubrzanje postupka može biti dodan enzim ili blagi deterdžent. Enzimi koji se pri tome najčešće koriste su lizozim, celulaza i kitinaza kojima je zajednička karakteristika da razgrađuju komponente od kojih je izgrađena stanična stijenka te na taj način ubrzavaju proces razbijanja stanica. Kao deterdženti najčešće se koriste različiti neionski ili dipolarni deterdženti kao što su Triton X-100 i 3-[(3-holamidopropil) dimetilamonij]-1-propansulfonat (CHAPS) jer su blagi i imaju neznatan utjecaj na denaturaciju proteina. Druge metode koje se koriste za razbijanje stanica mikroorganizama uključuju visokotlačne uređaje poput različitih preša te uređaje za mikrofluidizaciju. U ovim sustavima, stanična suspenzija se u odgovarajućoj komori uređaja potiskuje hidrauličkom pumpom kroz uzak otvor pri čemu je izlazni tok smjese na atmosferskom tlaku. Sila smicanja koja pri tome nastaje djeluje na staničnu stijenkku što rezultira njenim pucanjem [11].

### 3.3.3. Ekstrakcija proteina topljivih u vodi porijeklom iz biljnog tkiva

Ekstrakcija proteina topljivih u vodi porijeklom iz biljnog tkiva učinkovito se provodi mljevenjem stanica bez ili uz dodatak pijeska (ili sličnog inertnog materijala) u tarioniku s tučkom u prisustvu odgovarajućeg pufera. Ako je biljno tkivo pretvrdo da bi se na ovaj način samljelo može se provesti i brzo zamrzavanje kapljevitim dušikom što će učiniti biljno tkivo lomljivim pri čemu se zamrzavanje provodi prije dodatka pufera. Neke biljne stanice mogu se razbiti dekompresijom dušikom [11].

### 3.3.4. Ekstrakcija proteina topljivih u lipidima

Većina proteina topljivih u lipidima su proteini koji se nalaze na površini stanične membrane. Ovi lipidi nazivaju se proteolipidi, a mogu se ekstrahirati iz stanica korištenjem različitih organskih otapala kao što je primjerice smjesa kloroforma i metanola. Ekstrakcija vodenim otopinama koje sadrže blage deterdžente poput Triton X-100 i CHAPS spada u alternativne metode izolacije proteina koji se nalaze na površini stanične membrane ili organelama. Ovisno o vrsti proteina mogu



se koristiti i jaki deterdženti, ali njihova primjena može uzrokovati trajnu denaturaciju proteina [11].

### 3.3.5. Ekstrakcija agregiranog proteina

Ekspresijom rekombinantnih proteina u stanici bakterije domaćina dolazi do nastajanja netopljivih agregata proteina koji su poznati kao inkluzijska tijela. Ovaj tip proteina vrlo je teško izolirati iz stanice bakterije domaćina, a da pri tome ne dođe do trajne denaturacije proteina. Za izolaciju proteina iz bakterijskih inkluzijskih tijela koriste se otopine jakih denaturanata poput smjese gvanidina i HCl ili uree. Ove otopine uspješno ekstrahiraju proteine iz inkluzijskih tijela, ali se njihovim djelovanjem denaturirani protein ponekad ne može renaturirati. Osim ovih otopina koriste se i otopine blagih deterdženata poput vodene otopine smjese Triton X-100, CHAPS i sarkozila. Ova otopina je manje učinkovita, ali proces ekstrakcije proteina rezultira prirodnijim oblicima proteina [11].

### 3.4. Kromatografske metode

Kromatografija je jedna od metoda koja se koristi za određivanje i pročišćavanje bioloških tvari. Načelo kromatografskog odvajanja je distribucija ili razdvajanje molekula između dvije faze koje se ne miješaju i nazivaju mobilna i stacionarna faza. Kromatografske metode klasificiraju se po različitim kriterijima, uključujući fizički oblik stacionarne faze, prirodu mobilne faze i/ili stacionarne faze, mehanizam razdvajanja ili druga svojstva kromatografskih sustava. Primjerice, papirna kromatografija dobila je naziv prema materijalu koji se koristi kao stacionarna faza; tankoslojna kromatografija (TLC) i kolonska kromatografija nazivaju se tako po fizičkim oblicima stacionarnih faza. Plinska kromatografija ima mobilnu plinsku fazu i krutu stacionarnu fazu. Obzirom na mehanizme razdvajanja kromatografija se dijeli na adsorpcijsku kromatografiju, razdjelnu kromatografiju, kromatografiju isključenja po veličini, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju i afinitetnu kromatografiju. Kolonska kromatografija je najpopularnija kromatografska metoda koja se koristi za pročišćavanje proteina.

Konvencionalna kolonska kromatografija provodi se pri niskom tlaku. Mobilna faza teče kroz stacionarnu fazu u koloni djelovanjem gravitacije ili se protok mobilne faze osigurava pomoću niskotlačne pumpe te se ova vrsta kromatografije naziva i niskotlačna tekućinska kromatografija (LPLC). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je napredna verzija kolonske kromatografije. Visokotlačne pumpe i visokokvalitetni materijali koji se koriste kao stacionarna faza te detektori visoke osjetljivosti rezultiraju da se HPLC-om postiže učinkovitije razdvajanje komponenata smjese i skraćivanje vremena rada. Osim ovih metoda za pročišćavanje proteina koriste se i druge kolonske kromatografske metode kao što su tekućinska kromatografija brzih proteina (FPLC), kapilarna kromatografija, tekućinska kromatografija reverzne faze (RPLC) itd. FPLC je kao metoda slična HPLC, ali se provodi pri nižim radnim tlakovima. Od svih ovih kromatografskih metoda LPLC, HPLC i FPLC se najčešće koriste za pročišćavanje proteina. Kromatografskim metodama proteini se uglavnom razdvajaju po veličini, naboju i sposobnosti vezivanja na krutu fazu. Razdvojeni proteini eluiraju se iz kolone, a mogu se pratiti različitim detekcijskim metodama kao što su na primjer adsorpcijska spektrometrija ili spektrofluorimetrija [11].

#### 3.4.1. Kromatografija isključenja po veličini

Kromatografija isključenja po veličini (SEC, eng. size exclusion chromatography) ili gel-filtracijska kromatografija ili gel-permeacijska kromatografija omogućuje razdvajanje komponenata različitih molekularnih veličina pri blagim procesnim uvjetima. Ova metoda se može koristiti za pročišćavanje proteina ili razdvajanje grupa molekula pri čemu se primjerice uzorak razdvaja u dvije veće grupe (Slika 5). Razdvajanje molekula po grupama se uglavnom koristi za desalinizaciju ili izmjenu pufera smjese koja se pročišćava [6].



Slika 5. Pojednostavljeni prikaz razdvajanja različitih molekula kromatografijom isključenja po veličini

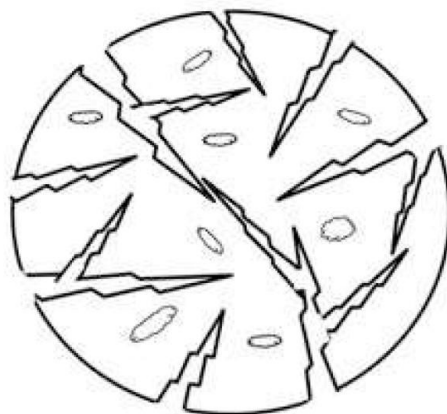
SEC je metoda kojom ne dolazi do koncentriranja komponenata uzoraka. Prolaskom kroz kolonu zona uzorka se širi što rezultira razrjeđivanjem komponenata uzoraka. U preparativnoj kromatografiji isključenja po veličini, maksimalna rezolucija može se postići u slučaju kada je volumen uzorka od 0,5 % do 2 % ukupnog volumena kolone. U nekim slučajevima i volumen uzorka koji je 5 % ukupnog volumena kolone može rezultirati prihvatljivim razdvajanjem komponenata smjese. Moguće je raditi i s većim volumenima uzoraka u slučaju kada je razdvajanje ciljanog proteina i nečistoće učinkovito. Da bi se povećao kapacitet procesa pročišćavanja kromatografijom isključenja po veličini uzorak je potrebno prethodno koncentrirati drugim metodama. Pri tome je potrebno izbjegavati koncentriranje na koncentracije

veće od 70 mg/ml, jer rezultirajuće povećanje viskoznosti uzorka može smanjiti razlučivost [2].

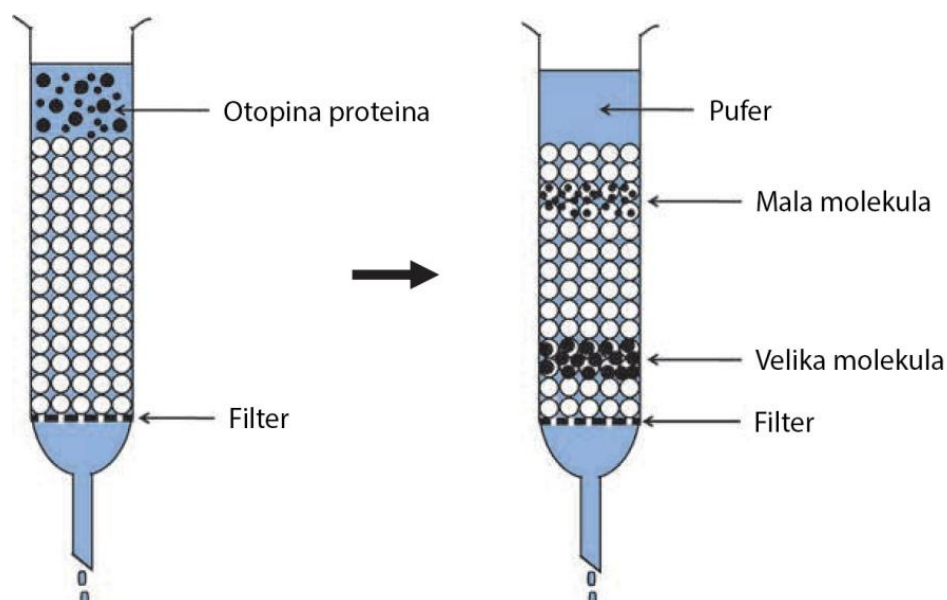
Kromatografija isključenja po veličini najbolja je kromatografska metoda za očuvanje izvorne strukture i funkcije pročišćenog proteina jer se za njenu provedbu može koristiti više vrsta pufera što posljedično rezultira najboljim procesnim uvjetima za pročišćavanje ciljanog proteina. Stacionarna faza kromatografije isključenja po veličini obično je izgrađena od poroznih hidrofilnih gel kuglica (Slika 7). Punila koja se koriste za LPLC kolone izrađena su od agaroze, dekstrana, poliakrilamida i kemijskih derivata navedenih tvari. Punila koja se koriste u HPLC i FPLC kolonama napravljena su od jačih materijala kao što su primjerice umreženi dekstran i polistiren. Umreženi polistiren može se koristiti za odvajanje hidrofobnih tvari uz prisustvo organskih otapala.

Princip rada kromatografije isključenja po veličini se sastoji od difuzije molekula u pore kuglica punila. Molekule veće od pora punila ne mogu ući u punilo, a manje mogu. Budući da pore mogu biti u više veličina, molekule, uključujući proteine, razvrstane su prema njihovim molekularnim masama. Zbog toga veće molekule prolaze kroz kolonu brže od manjih molekula.

Kromatografija isključenja po veličini može se koristiti i za određivanje molekularne mase proteina. Smjesa prikladnih proteina poznatih molekularnih masa propuštanjem kroz kolonu razvrstat će se ovisno o svojim molekularnim masama. Iz baždarnog pravca koji korelira vrijeme zadržavanja i molekularnu masu svakog od proteina ove smjese, može se preko vremena zadržavanja proteina nepoznate molekularne mase procijeniti njegova molekularna masa. Na učinkovitost procesa razdvajanja proteina utjecaj ima i razdioba veličina čestica punila i vrsta punila jer su različiti tipovi punila pogodni za razdvajanje proteina različitih molekularnih masa [11].



Slika 6. Shematski prikaz pora kuglice hidrofилnog gela korištenog u kromatografiji isključenja po veličini



Slika 7. Pojednostavljeni prikaz razdvajanja dva proteina korištenjem kromatografije isključenja po veličini

Kromatografija isključenja po veličini uglavnom se provodi izokratski (jedan puffer, bez gradijenta). Razdvajanje se može postići korištenjem mobilne faze šireg područja pH-vrijednosti i ionske snage u različitim temperaturnim područjima. Mobilna faza može sadržavati različite dodatke kao što su kofaktori, proteinski stabilizatori, deterdženti, urea i gvanidin hidroklorid. Pufferski sastav mobilne faze obično ne utječe na razlučivanje, iako uključuje nisku koncentraciju soli, na primjer 25 do 150 mM NaCl se preporuča kako bi se eliminirala slaba elektrostatička interakcija

između proteina i kromatografske matrice. Sastav pufera odabire se na način da odgovara tipu uzorka te kako bi održao aktivnost ciljanog proteina. Prednost kromatografije isključenja po veličini je da uzorak ne mora biti suspendiran u istom puferu kao onaj koji se koristi kao mobilna faza. Mobilna faza kromatografije isključenja po veličini se odabire ovisno o uvjetima potrebnima za daljnje pročišćavanje, analizu, pohranu ili korištenje. Izbor mobilne faze je uz izbor punila ključan parametar za optimizaciju razlučivosti kromatografije isključenja po veličini [6].

Proteini se pri ulasku u kolonu kod kromatografije isključenja po veličini vežu na punilo pri niskoj ionskoj jakosti. Uvjeti provedbe procesa se zatim prilagođavaju na način da se vezane tvari desorbiraju različitim brzinama. Elucija proteina se inače provodi povećavanjem koncentracije soli u mobilnoj fazi ili gradijentnom, odnosno postupnom promjenom pH-vrijednosti mobilne faze. Najčešća korištena sol za eluciju proteina je NaCl, ali se i drugi ioni mogu koristiti za modulaciju razdvajanja, npr.  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $CH_3COO^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $I^-$  ili  $Bi^-$ . Kapacitet i ionska jakost korištenog puferskog sustava također mogu utjecati na razdvajanje. Ioni koji se koriste za eluiranje proteina mogu promijeniti karakteristike procesa kromatografije isključenja po veličini.

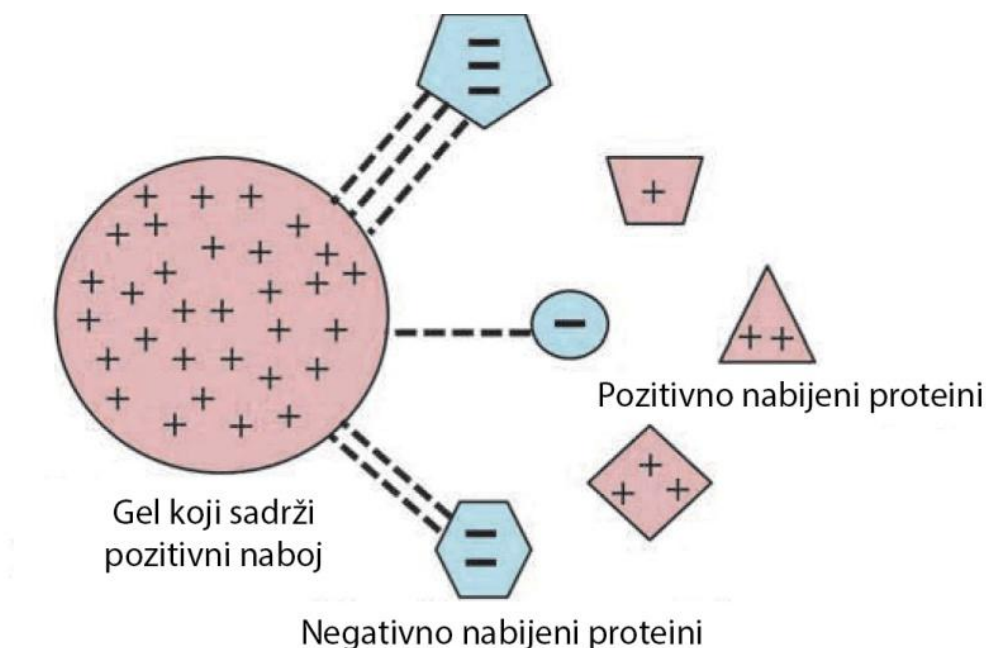
Kromatografija isključenja po veličini je metoda koja služi za pročišćavanje proteina, a primjenjuje se tek nakon provedenih primarnih metoda pročišćavanja (razbijanje stanice, uklanjanje staničnog debrisa, isoljavanje). Nakon provedbe primarnih procesa pročišćavanja smjesa proteina je u pravilu koncentrirana te se kromatografijom isključenja po veličini u pravilu uklanjaju nečistoće. Također se može koristiti za uklanjanje preostalih oligomera i agregata ciljanog proteina. Stoga je pročišćeni ciljani protein kromatografijom isključenja po veličini u pravilu homogen. Kromatografija isključenja po veličini se rijetko koristi kao prvi korak pročišćenja smjese proteina, ali i u ovom slučaju može biti korisna za male volumene uzoraka umjerene složenosti [6].

#### 3.4.2. Ionsko izmjenjivačka kromatografija

Ovom kromatografskom metodom moguće je razdvojiti komponente smjese prema jačini neto električnog naboja proteina. Postoje dva tipa ionsko izmjenjivačke

kromatografije: anionska i kationska. Materijal kojim je kolona u ionsko izmjenjivačkoj kromatografiji ispunjena zove se ionski izmjenjivač te može biti anionski i kationski. Anionski izmjenjivači sadrže pozitivno nabijene aktivne grupe dok kationski izmjenjivači imaju negativno nabijene aktivne grupe.

Ionsko izmjenjivačka kromatografija s anionskim izmjenjivačem koristi se za odvajanje proteina koji sadrže negativne naboje. Suprotno tome, ionsko izmjenjivačka kromatografija s kationskim izmjenjivačem koristi se za odvajanje proteina koji sadrže pozitivne naboje. Postoji više vrsta ionskih izmjenjivača ovisno o matrici materijala i ionskim grupama koje sadrži. Celuloza, agaroz, dekstran i polistiren koriste se kao punila u LPLC, dok su polistiren, polieter i silika tipična punila za HPLC. Matrica je kemijski modificirana kako bi sadržala ionske grupe koje su slabo kisele, jako kisele, slabo bazične ili jako bazične. Matrica sa slabo kiselom grupom (kationski izmjenjivač) kao i ona sa slabo bazičnom grupom (anionski izmjenjivač) prikladna je za razdvajanje i pročišćavanje većine proteina. Izbor izmjenjivača ovisi o području pH-vrijednosti u kojem je protein stabilan te području pH-vrijednosti u kojem je moguća primjena izmjenjivača. Pojednostavljeno se proces razdvajanja smjese proteina kod ionsko izmjenjivačke kromatografije može prikazati kako je dano na Slici 8. Elucija proteina iz kolone može se provoditi izokratski ili gradijentno. Ionska jakost i pH-vrijednost medija koji se koristi za eluiranje su ključni za dobro odvajanje proteina iz smjese [11].



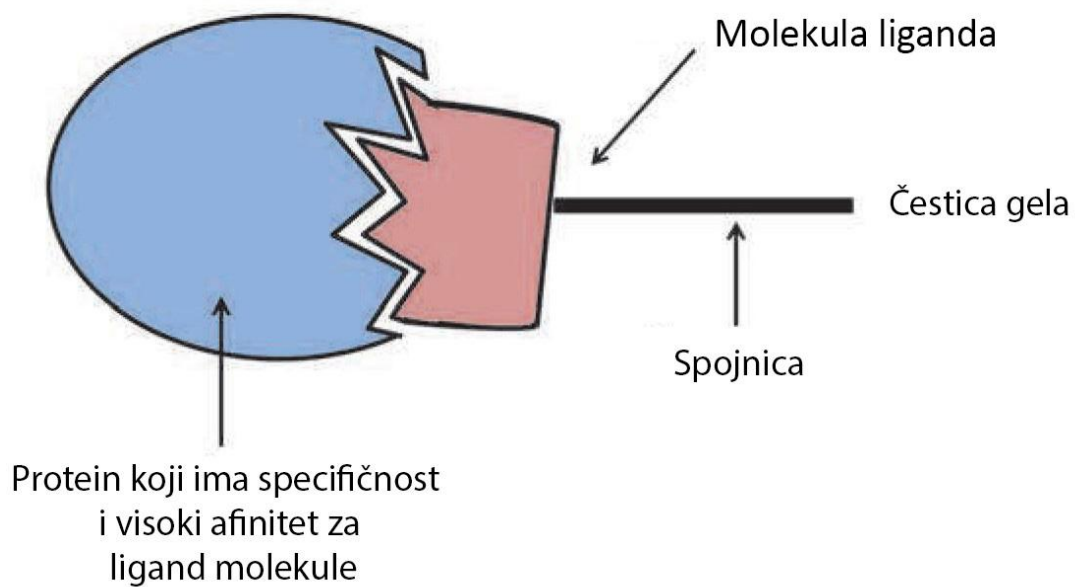
Slika 8. Pojednostavljeni prikaz procesa ionsko izmjenjivačke kromatografije

### 3.4.3. Afinitetna kromatografija

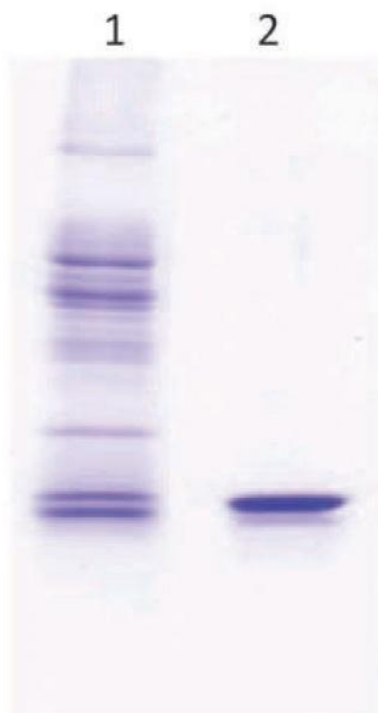
Afinitetna kromatografija je učinkovita kromatografska tehnika, ali je materijal koji se koristi kao punilo, odnosno stacionarna faza skup. Razdvajanje molekula temelji se na sposobnosti vezanja makromolekula s makromolekulama ili vezanja makromolekula s ligandima niske molekularne mase. Spajanje je specifično za određene molekule ili skupine molekula. Pojednostavljeni prikaz procesa afinitetne kromatografije u kojem je jedna molekula smjese vezana na matrici prikazan je na Slici 9. Stacionarna faza u afinitetnoj kromatografiji može biti poliakrilamid, polistiren, umreženi dekstran, agarozna itd. Postoji niz kemijskih tvari koje reagiraju na različite funkcionalne skupine punila. Pri separaciji proteina ne smije doći do kemijske reakcije jer to može rezultirati smanjenjem aktivnosti ili potpunom deaktivacijom proteina. Postoji velik broj komercijalno dostupnih afinitetnih punila koja se primjenjuju za različite svrhe, kao što je protein A Sepharozna za pročišćavanje imunoglobulina, manan-agarozna za pročišćavanje lektina pomoću manoze vezane na matricu od agara (Slika 10). Nakon što se protein veže na aktivni centar punila, a nečistoće se vežu na kolonu, vezani proteini eluiraju bilo promjenom pH-vrijednosti mobilne faze bilo uvođenjem u kolonu konkurentne tvari koja ima veći afinitet prema aktivnom centru punila. Afinitetna kromatografija je izrazito učinkovita metoda i u



pravilu se koristi na način da je punilo zapakirano u malu kolonu stoga ovaj kromatografski sustav ne zahtjeva sofisticiranu izvedbu [11].



Slika 9. Pojednostavljeni prikaz procesa afinitetne kromatografije



Slika 10. Rezultat jednostupnjevito procesa afinitetne kromatografije na primjeru pročišćavanja lizina koji se veže na enzim manozu porijeklom iz *Dendrobium chrysotosum* u jednom koraku. Sirovi ekstrakt (traka 1) i pročišćeni lektin (traka 2) odvojeni pomoću SDS-PAGE tehnike i obojeni s Coomassie Brilliant Blue R250.

### 3.5. Mikrobiološki procesi i mediji za proizvodnju enzima lipaze

Lipaze mikrobiološkog podrijetla uglavnom se proizvode submerznom fermentacijom, ali se kao proizvodna tehnika može koristiti i fermentacija na čvrstim nosačima. U nekim slučajevima je za proizvodnju enzima lipaze proučavano i korištenje imobilizirane stanične kulture. Provedena su brojna istraživanja kako bi se definirala optimalna kultura i uvjeti provedbe procesa za proizvodnju enzima lipaze fermentacijom. U ovim procesima proizvodnja enzima lipaze ovisna je o vrsti i koncentraciji izvora ugljika i dušika, pH-vrijednosti kulture, temperaturi uzgoja i koncentraciji otopljenoga kisika. Vrsta i koncentracija izvora ugljika korištenog u mikrobiološkim procesima proizvodnje lipaze ključni su za dobivanje prihvatljivih prinosa lipaze, a nekoliko autora uspjelo je ostvariti dobar prinos na enzimu lipaza i u procesima provedenim u mediju bez prisustva masnoća i ulja [6].

Enzimi od industrijskog interesa se u pravilu proizvode uz prisutnost različitih induktora. U slučaju mikrobiološke proizvodnje enzima lipaze, prisutnost triacil glicerola, površinski aktivnih tvari, biljnih ili otpadnih ulja u većini slučajeva ima inducibilni učinak na proces proizvodnje enzima lipaze. Većina do sada proučenih lipaza mikrobiološkog podrijetla su vanstanični enzimi čija proizvodnja je inducirana dodatkom različitih komponenata. Pri tome se enzim sintetizira unutar stanice koja ga transportira na vanjsku površinu stanične membrane ili ga otpušta u okoliš. Vanstanične lipaze pretežito se proizvode iz jednostaničnih mikroorganizama, kao što su gljive, kvasci i bakterije [12].

Procesi u kojima se provodi submerzni uzgoj gljiva koje proizvode enzim lipazu su brojni i njihove karakteristike uveliko variraju, što značajno utječe na složenost optimizacije ovih procesa obzirom na aktivnost enzima lipaze. Tako se enzim lipaza može proizvesti submerznom fermentacijom koja se provodi kao šaržna, šaržna s dohranom i kontinuirana. Hidrolitička svojstva enzima lipaze dobivena fermentacijom iz gljiva, kao i prinos ovih procesa, u velikoj mjeri ovise o primjenjenoj metodi fermentacije [13].

### 3.5.1. Čimbenici koji utječu na proizvodnju enzima lipaze

Općenito su nitaste gljive, u odnosu na bakterije, primarni izbor za proizvodnju enzima lipaze. Naime, nitaste gljive razgrađuju materijale koji sadrže ugljik i dušik u njihovom prirodnom okolišu s visokom učinkovitošću što direktno utječe na njihovo preživljavanje. Nadalje, dodatkom različitih aktivatora gljive mogu proizvoditi određenu vanstaničnu lipazu, a sama proizvodnja bitno ovisi o korištenom gljivičnom soju, sastavu medija (izvori ugljika i dušika) te fizikalno-kemijskim faktorima poput temperature, pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika. Posljedično, lipaza proizvedena iz istog soja gljiva može imati različita biokemijska svojstva ako se proces proizvodnje provodi pri različitim uvjetima [14].

U zadnje vrijeme provode se brojna istraživanja s ciljem optimiranja procesa proizvodnje enzima lipaze porijeklom iz gljiva proučavanjem utjecaja proizvodnog medija kao i drugih procesnih uvjeta s ciljem postizanja većeg prinosa i veće aktivnosti na vanstaničnoj lipazi. Unatoč napretku postignutom tijekom posljednjih

godina, troškovi proizvodnje enzima lipaze i dalje su visoki, a učinkovitost industrijskih proizvodnih procesa umjerena [13].

### 3.5.2. Utjecaj izvora ugljika na proces proizvodnje enzima lipaza

Pri proizvodnji enzima lipaza porijeklom iz *Bacillus* u prisustvu 1%-tnog maslinovog ulja u mediju za submerzni uzgoj uočena je niska enzimska aktivnost u odsutnosti maslinovog ulja čak i nakon produženja trajanja kultivacije. Fruktosa i palmino ulje pokazali su se kao najbolji izvori ugljika i lipida za proizvodnju izvanstaničnog enzima lipaze porijeklom iz *Rhodotorula glutinosa*. Kada su se usporedila oba izvora ugljika, otkriveno je da primjena palminog ulja koncentracije 2% u mediju rezultira 12 puta većom proizvodnjom enzima lipaze nego kada se kao medij koristi otopina fruktoze [15].

Proučavana je i proizvodnja termostabilnog enzima lipaze porijeklom iz termofilnog *Bacillus* soja u mediju koji je sadržavao tripalmitin, tristearin i trimistin. Rezultati istraživanja su pokazali da je tripalmitin najbolji induktor aktivnosti lipaze. Također su uspoređena različita biljna ulja za proizvodnju enzima lipaze porijeklom iz gljive *Ophiostoma piceae* fermentacijom na čvrstim nosačima odnosno na drvetu sapanovini. Visoke razine lipazne aktivnosti dobivene su kada su različita biljna ulja (maslinovo, sojino, suncokretovo, sezamovo, ulje sjemenke pamuka, kukuruza i kokosovo ulje) korištena kao izvor ugljika pri čemu je maksimalna proizvodnja enzima lipaze dobivena korištenjem maslinovog ulja. Slično tome, fermentacija soja termofilne *Bacillus* A30-1 rezultirala je maksimalnom proizvodnjom termostabilne alkalne lipaze kada su se kao izvori ugljika koristili kukuruzno i maslinovo (1%) ulje. Na ovaj način proizvedena lipaza pokazala je aktivnost na trigliceridima od C16 do C22 masnih kiselina te na prirodnim mastima i uljima [6].

Maksimalna proizvodnja vanstaničnog enzima lipaze porijeklom iz termofilne gljive, *Rhizopus oryzae*, postignuta je kada je medij za uzgoj ove gljive sadržavao peptone kao izvor ugljika (tripton, triptički digest, ekstrakt namakanog kukuruza, polipepton). U istraživanjima proizvodnje termostabilnog enzima lipaze porijeklom iz termofilnih gljiva *Emericella regulosa*, *Humicola* sp., *Thermomyces lanuginosus*, *P. purpurogentum* i *Chrysosporium sulferum*, upotreba ekstrakta kvasca kao izvora

dušika u mediju rezultirala je konstantnim visokim razinama proizvodnje enzima lipaza [6].

### 3.6. Pročišćavanje enzima lipaza

Lipaze različitog podrijetla su nakon pročišćavanja karakterizirane obzirom na aktivnost i profil stabilnosti pri različitim vrijednostima pH i temperature, te obzirom na utjecaj metalnih iona i kaletacijskih sredstava. Brojne lipaze su različitim metodama pročišćene do homogenosti i kristalizirane. Pri tome su korištene različite metode pročišćavanja primjena kojih prvenstveno ovisi o svojstvima lipaza, a u pravilu su korištene različite nespecifične tehnike poput taloženja, kromatografije hidrofobne interakcije, kromatografije isključenja po veličini i ionsko-izmjenjivačke kromatografije. U nekim slučajevima korištena je afinitetna kromatografija kako bi se smanjio broj potrebnih koraka pročišćavanja [6].

### 3.7. Proizvodnja enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*

Submerzni uzgoj kulture *Thermomyces lanuginosus* proveden je na 45 °C u mediju koji je sadržavao vodu u kojoj se natapao kukuruz, topljivi kukuruzni škrob, ulje sjemenki soje,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  i  $CaCO_3$ , a pH-vrijednost medija podešena je na 7 dodatkom otopine NaOH [16]. U sterilni medij u tikvici nacijepijene su odmrznute, prethodno duboko zamrznute suspenzije spora i inkubirane uz trešnju 24 sata. Nakon provedenog uzgoja na tresilici cjelokupna kultura je korištena kako bi se isti medij nacijepio u fermentoru. Proces se provodio uz mješanje (212 okr/min) i aeraciju (10 L/min) uz nadtlak (20 kPa) dok je pjenjenje bilo kontrolirano automatskim dodavanjem protupjenila. Fermentacija je trajala tjedan dana nakon čega je reakcijska smjesa profiltrirana. Ovom filtratu, koji sadrži enzim lipazu i ostale vanstanične proteine, je pH-vrijednost podešena na 5,5 dodatkom vodene otopine octene kiseline te je rezultirajuća suspenzija centrifugirana kako bi se uklonio talog. Lipaza koja je zaostala u kapljevitom ostatku pročišćena je adsorpcijom pomoću akrilnih mikroporoznih membrana. Na ovaj način enzim lipaza je adsorbiran na membrani te je potpuno obnovljena desorpcijom pri pH-vrijednosti 9 korištenjem otopine  $Na_2CO_3$ . Desorbirana lipaza koncentrirana je ultrafiltracijom pri pH-vrijednosti

6, centrifugirana kako bi se uklonio talog, te zamrznuta liofilizacijom. Tijekom na ovaj način provedenog procesa pročišćavanja sačuvana je otprilike  $\frac{1}{4}$  aktivnosti enzima lipaze u rezultirajućem liofiliziranom prahu [17].

### 3.8. Proizvodnja i pročišćavanje izvanstaničnog enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* na ekstraktu ljuski palminog ploda

Vanstanična lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* proizvedena je submerznom fermentacijom na ekstraktu ljuski palminog ploda pri temperaturi 45 °C. Nakon 6 dana fermentacije vanstanični ekstrakt je pročišćen kombinacijom ultrafiltracije, taloženjem etanolom te frakcioniranjem na DEAE-celulozi i gel-filtracijom na Sefadeksu G.200. Kao rezultat je dobivena pročišćena lipaza kojoj je aktivnost bila deset puta veća od aktivnosti izvornog, nepročišćenog ekstrakta. Dodatni postupci pročišćavanja enzima rezultirali su skoro potpunim gubitkom aktivnosti. Na ovaj način proizvedena lipaza je imala najveću aktivnost pri pH-vrijednosti 6,5 i temperaturi 40 °C. Pri ovim uvjetima primijenjena je za hidrolizu prirodnih i sintetičkih triglicerida, odnosno za hidrolizu palminog ulja i trioleina [18].

#### 3.8.1. Postupak pročišćavanja

Vanstanični ekstrakt dobiven fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na ekstraktu ljuski palminog ploda prvo je koncentriran membranskom filtracijom uz korištenje Amicon TFC 10 Diaflo ćelije opremljene s PM 10 Diaflo membranom. Dobiveni filtrat je istaložen etanolom preko noći pri temperaturi 4 °C. Istaloženi proteini odvojeni su centrifugiranjem i ponovno otopljeni u fosfatnom puferu. Ravnotežna dijaliza provedena je pomoću cijevi za dijalizu. Otopine enzima ponovo su dijalizirane natrij-fosfatnim puferom deseterostruko većeg volumena, te desalizirane dijalizom destiliranom vodom i na kraju liofilizirane (smrznute sušenjem). Dobiveni prah ponovno je otopljen u fosfatnom puferu, a netopljivi dijelovi uklonjeni su centrifugiranjem. Otopina enzima zatim je nanešena na DEAE-celuloznu kolonu prethodno uravnoteženu fosfatnim puferom. Nakon ispiranja istim puferom, eluiranje je provedeno gradijentom NaCl (0-0,4 M) u otopini fosfatnog pufera. Frakcije koje su pokazivale veliku adsorpciju pri 280 nm testirane su na aktivnost enzima lipaze, a

one koje su pokazivale aktivnost enzima lipaze sakupljene su, desalinizirane i liofilizirane. Frakcije koje su pokazivale visoku adsorpciju pri 280 nm sakupljene su, koncentrirane ultrafiltracijom i ponovno pročišćene kromatografijom isključenja po veličini na Sephadex G.200 punilu. Frakcije s lipazom visoke aktivnosti ponovno su sakupljene, desalinizirane i liofilizirane [18].

### 3.9. Identifikacija mikroorganizama koji proizvode enzim lipazu

Mikroorganizmi koji proizvode lipazu pronađeni su u različitim staništima kao što su industrijski otpad, tvornice za preradu biljnih ulja, mljekare, tla zagađena uljima, uljarice, raspadajuća hrana, hrpe komposta, odlagališta ugljena i vruća vrela [6].

Mikroorganizmi koji proizvode lipaze uključuju bakterije, gljive, kvasce i aktinomicete. Jednostavna i pouzdana metoda otkrivanja aktivnosti lipaze u mikroorganizmima sastoji se od korištenja surfaktanta Tween 80 u čvrstom mediju. U slučaju postojanja lipazne aktivnosti oko kolonija mikroorganizama se kao pokazatelj proizvodnje enzima lipaze stvara neprozirni sloj. Različite varijante ove analize koriste razne Tween surfaktante u kombinaciji s Nile plavim i  $\text{Cu}^{2+}$  solima [6].

### 3.10. Biodizel dobiven transesterifikacijom uz enzim lipazu kao katalizator

Fosilna goriva imaju široku primjenu, ali i brojne nedostatke od kojih posebno treba izdvojiti ograničene rezerve i emisije štetnih plinova u atmosferu. Biodizel se u zadnjih 20-tak godina sve više koristi kao alternativa dizelu dobivenom iz nafte, prije svega jer ga je moguće proizvesti iz obnovljivih i otpadnih sirovina kao što su: biljna ulja, životinjske masti, destilati masnih kiselina, nejestiva ulja te otpadno ulje iz kuhinja. Korištenje biodizela smanjuje ovisnost o dizelu čija cijena može znatno varirati i ovisna je o poremećajima na svjetskom tržištu. Uz to se biodizel svrstava u obnovljiva goriva, a u odnosu na dizel njegovo korištenje rezultira manjom količinom stakleničkih plinova i drugih onečišćujućih tvari.

Biodizel se iz biljnih ulja može proizvesti koristeći različite metode. Jedna od najčešćih metoda je transesterifikacija koja se provodi uz korištenje kemijskih ili

bioloških katalizatora. Kemijski katalizirana transesterifikacija (bazna ili kisela) je dobro poznat proces koji ima nekoliko nedostataka kao što su dugo vrijeme provedbe procesa kada se reakcija provodi pod utjecajem kiselina kao katalizatora te nemogućnost korištenja sirovine niske kakvoće kada je reakcija katalizirana lužinama. Osim ovoga kemijski kataliziranom transesterifikacijom nastaje vrijedan sporedni produkt, glicerol, kojega je potrebno pročititi prije daljnjeg korištenja, u pravilu agresivne kemijske katalizatore potrebno je ukloniti iz reakcijske smjese nakon provedbe procesa, a obrada alkalnih ili kiselih otpadnih voda je složena i u pravilu skupa.

S druge strane enzimatska transesterifikacija, gdje se kao katalizator koristi enzim lipaza, je ekološki prihvatljiviji postupak. Prisutnost slobodnih masnih kiselina i vode u reakcijskoj smjesi ne inaktivira lipaze iako ju više koncentracije drugog reaktanta, alkohola, u procesu transesterifikacije mogu inaktivirati. Kao sporedni produkt dobiva se čisti glicerol kojeg nije potrebno pročišćavati, a skoro sav akumulirani otpad koji nastaje u procesu transesterifikacije ulja je biorazgradiv [20].

Transesterifikacija biljnog ulja u biodizel istraživana je korištenjem suspenzije enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* kao katalizatora. Prisutnost malog postotka vode bila je neophodna za očuvanje enzimatske aktivnosti koja bi u suprotnom bila značajno smanjena zbog inhibirajućeg djelovanja drugog reaktanta – metanola [20].

### 3.11. Primjena lipaze

Lipaza se široko koristi u obradi ulja i masti, proizvodnji deterdženta i različitih pripravaka za odmašćivanje, obradi hrane, sintezi kemikalija, proizvodnji papira, kozmetike i farmaceutika. Lipaza se može koristiti za ubrzavanje raspada viših masnih kiselina i poliuretana. Većina industrijski relevantne lipaze proizvedene iz mikrobioloških izvora dobiva se iz gljiva i bakterija [6].



### 3.11.1. Lipaza u industriji deterdženata

Lipaza zbog svoje mogućnosti da hidrolizira masti glavnu primjenu nalazi kao aditiv u industrijskim deterdžentima i deterdžentima za kućanstvo. Lipaze koje se koriste kao aditiv u industrijskim deterdžentima se odabiru na način da zadovolje sljedeće zahtjeve:

1. niska specifičnost supstrata uz mogućnost hidrolize masti različitih sastava,
2. sposobnost zadržavanja aktivnosti pri za enzime relativno ekstremnim uvjetima pranja robe (pH-vrijednost 10-11, temperatura 30-60 °C),
3. sposobnost zadržavanja aktivnosti pod djelovanjem različitih površinski aktivnih tvari i drugih enzima koji su uobičajeni sastojci mnogih formulacija deterdženata.

Lipaze ovih svojstava dobivaju se kombinacijom neprekidnog odabira i proteinskog (genetskog) inženjerstva [6].

### 3.11.2. Primjena lipaza u prehrambenoj industriji

Ulja i masti bitne su komponente hrane. Nutritivne i osjetilne vrijednosti i fizička svojstva triglicerida u velikoj su mjeri pod utjecajem čimbenika kao što su položaj više masne kiseline u glicerolnoj osnovi, duljini lanca više masne kiseline i njezin stupanj nezasićenosti. Djelovanje lipaza omogućuje modificiranje svojstva lipida promjenom mjesta u lancu masnih kiselina u gliceridu te zamjenom jedne masne kiseline drugom. Na ovaj način se relativno jeftin i manje poželjan lipid može modificirati u masti veće vrijednosti [6].

### 3.11.3. Lipaza u industriji celuloze i papira

Smola ili hidrofobne komponente drva (uglavnom trigliceridi i voskovi) uzrokuju ozbiljne probleme u proizvodnji celuloze i papira. Kako bi se ovo spriječilo koristi se lipaza kako bi se iz celuloze uklonila smola [6].

#### 3.11.4. Primjena lipaza u organskoj sintezi

Lipaza se koristi kako bi katalizirala široki izbor kemo-, regio- i stereoselektivnih transformacija. Većina lipaza koje se kao katalizator koriste u organskoj sintezi su mikrobnog podrijetla. Lipaze djeluju na hidrofilno-lipofilnoj međupovršini i tolerantne su na većinu organskih otapala koja se koriste u organskim sintezama [6].

#### 3.11.5. Primjena lipaza u biotransformacijama provedenim u dvofaznim sustavima

Hidroliza estera se obično provodi upotrebom lipaze u reakcijskom sustavu u kojemu je enzim lipaza suspendiran u vodenom mediju dok se ostale komponente reakcijske smjese nalaze otopljene u pogodnom organskom otapalu. U dvofaznim sustavima s organskom i vodenom fazom, lipaza se veže na granici faza, gdje ima najveću katalitičku vrijednost i ondje katalizira reakciju [6].

#### 3.11.6. Primjena lipaza u biotransformacijama provedenim u organskom mediju

Hidrolizu estera je moguće provesti i u bezvodnom mediju upotrebom lipaze u reakcijskom sustavu u kojemu su sve komponente reakcijske smjese otopljene u organskom otapalu, a u kojemu je suspendiran i sam enzim lipaza. Uobičajeno u ovakvim sustavima enzim lipaza ima znatno manju aktivnost nego u vodenim sustavima [6].

#### 3.11.7. Primjena lipaza u regioselektivnim acilacijama

Lipaze aciliraju određene steroide, šećere i derivate šećera uz visoku regioselektivnost. Tako se primjerice monoacilirani šećeri mogu proizvesti uz enzim lipazu u bezvodnom piridinu iz trietil karboksilata i raznih monosaharida. Lipaza porijeklom iz *A. niger* korištena je kako bi katalizirala regioselektivnu deacilaciju preaciliranog metil  $\beta$ -D-glukopiranozida [6].

### 3.11.8. Djelovanje lipaza u otopini racemata organskih kiselina i alkohola

Stereosenzitivnost lipaza korištena je razdvajanje različitih smjesa racemata organskih kiselina u nemješljivim dvofaznim sustavima. Racemati alkohola također se mogu razdvojiti u enantiomerne čiste oblike reakcijom transesterifikacije katalizirane lipazom.

### 3.11.9. Primjena lipaza u proizvodnji biodizela

Lipaze se uspješno koriste kao katalizatori u sintezi estera masnih kiselina. Tako se esteri proizvedeni transesterifikacijom iz masnih kiselina kratkog lanca pomoću enzima lipaze koriste kao sredstva za poboljšanje okusa u prehrambenoj industriji. Metilni i etilni esteri dugolančanih kiselina proizvedeni transesterifikacijom pomoću enzima lipaze koriste se direktno kao biogorivo – biodizel ili se koriste kao dodatak za obogaćivanje dizelskih goriva (Slika 12) [6].



Slika 11. Prikaz uzorka biodizela

#### 4. Zaključak

Lipaza je enzim koji se može proizvesti različitim fermentacijskim tehnikama pod uvjetima koji ovise o prirodi mikrobnog soja koji ih proizvodi, sastavu medija u kojemu se fermentacija provodi (izvori ugljika i dušika), te procesnim uvjetima poput temperature, pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika.

Najčešće metode koje se koriste za pročišćavanje enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* su kromatografija i ekstrakcija. Kromatografija isključenja po veličini najučinkovitija je metoda za očuvanje izvorne strukture i funkcije pročišćenog enzima lipaze jer se izborom pogodnog pufera za nanošenje i eluiranje proces može voditi pri optimalnim uvjetima za enzim.

Enzim lipaza ima široku primjenu u kemijskoj, prehrambenoj, tekstilnoj i farmaceutskoj industriji, a koristi se i u medicini i veterini te za proizvodnju biogoriva.

## 5. LITERATURA

1. Duraković, S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1996., str. 225.-226., 374.
2. [www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification) (pristup kolovoz 2018.)
3. Borkar, P. S., Agini, R., Bodade, G., Rao, S. R., Khobragade, C. N., Purification and Characterization of extracellular lipase from a new strain - *Pseudomonas Aeruginosa*, Brazillian Journal of Microbiology, 40 (2009) 358-366.
4. Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., Gupta, R., Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans*, Protein Expression and Purification, 41 (2005) 38-44.
5. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18053> (pristup kolovoz 2018.)
6. Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., Production, purification, characterization, and application of lipases, Biotechnology Advances, 19 (2001) 627-643.
7. Maheshwari, R., Fungi: Experimental Methods In Biology, Second Edition, CRC Press, Bangalore, India, 2012., str 254.
8. Singh, S., Madlala, A. M., Prior, B. A., *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases, FEMS Microbiology Reviews, 27 (2003) 3-4.
9. Fernandez-Lafuente, R., Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 62 (2010) 197–198.
10. Mishra, R. S., Maheshwari, R., Analyses of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: Their purification, properties, action on starch and responses to heat, Journal of Biosciences, 21 (1996) 653-654.
11. Sattayasi, N., Chemical Biology, InTech, 2012., str. 1-13.
12. Zouaoui, B., Bouziane, A., Isolation, Optimisation and Purification of Lipase Production by *Pseudomonas Aeruginosa*, Journal of Biotechnology & Biomaterials, 1 (2011) 1-2.

13. Geoffry, K., Achur, R. N., Screening and production of lipase from fungal organisms, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, India, 2018., str.10.
14. Salleh, A. B., Musani, R., Razak, Extra and Intracellular lipases from a thermophile *Rizopus oryzae* and factors affecting their production, Canadian Journal of Microbiology, 39 (1993) 81-100.
15. Siguira, A, Tani, T., Tominaga, Y., Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.*, The Journal of Biochemistry, 6 (1991) 109-211.
16. Liu, W.H., Beppu, T., Arima, K., Cultural condition and some properties of the lipase of *Humicola lanuginosa* S-38, Agricultural and Biological Chemistry, 36 (1972) 1919-1921.
17. Taylor, F., Stabilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* with *p*-Chlormercuribenzoic Acid, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.68 No.2 (1989) 141-143.
18. Ogundero, V. W., Partial purification and activities of an extracellular lipase of *Thermomyces lanuginosus* from Nigerian palm product, Mycopathologia, 97 (1987) 105-109.
19. Sierra G., A. Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganism and some observation on the influence of the contact between cells and fatty substrates, Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology, 23 (1957) 15-22.
20. Firdaus, M., Yusoff, M., Brask, J., Per Munk, N., Guo, Z., Fedosov, S., Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus*, Journal of Molecular Catalysis, 133 (2016) 1-3.

## ŽIVOTOPIS

Magdalena Osrečak [REDACTED] Pohađala je Osnovnu školu grofa Janka Draškovića u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole upisuje Gimnaziju Lucijana Vranjanina u Zagrebu, smjer opća gimnazija, koju završava 2013. Akademske godine 2013./2014. upisuje se na preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.