

Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima endo-1,4-ksilanaze upotrebom eutektičnih otapala

Anđelović, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:149:403503>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Sara Anđelović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Sara Anđelović

PROČIŠĆAVANJE SIROVOG EKSTRAKTA ENZIMA
ENDO-1,4-KSILANAZE UPOTREBOM EUTEKTIČKIH OTAPALA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

Neposredni voditelji: doc. dr. sc. Anita Šalić, Tea Sokač, mag. ing. oecoiing.

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Bruno Zelić
2. doc. dr. sc. Anita Šalić
3. prof. dr. sc. Marko Rogošić

Zagreb, rujan 2022.

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Bruni Zeliću na strpljenju, savjetima i vodstvu pri izradi ovog rada.

Također, veliko hvala doc. dr. sc. Aniti Šalić i Tei Sokač, mag. ing. oecoing. na neposrednom vodstvu, svim savjetima, objašnjenjima i svom trudu koje su uložile prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela.

Na kraju, hvala mojoj mami, sestrama i Timoteju na nesebičnoj podršci i razumijevanju.

SAŽETAK

Ksilanaza spada u skupinu enzima ključnih za depolimerizaciju te se koristi za razgradnju linearnog polisaharida ksilana u ksilozu, razgrađujući pri tome hemicelulozu, jednu od glavnih komponenata stanične stijenke. Ksilanaza je svoju primjenu pronašla u industriji celuloze i papira, prehrambenoj industriji te kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Kako bi se ksilanaza što učinkovitije upotrijebila, potrebno je proizvesti enzim velike katalitičke aktivnosti pri čemu je ključan korak pročišćavanje enzima.

Proces pročišćavanja enzima je složen i povezan s brojnim izazovima kao što su pronalazak brzih, učinkovitih i ekološki prihvatljivih metoda uz istovremeno smanjenje proizvodnih troškova. Ekstrakcija eutektičkim otapalima (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DESs) pokazala se kao učinkovita i održiva metoda ekstrakcije glicerola iz biodizela, ekstrakcije biološki aktivnih sastojaka iz prirodnih izvora, kao učinkovit reakcijski medij koji osigurava poboljšanje kontakta između reaktanata što rezultira poboljšanjem organskih sinteza i katalize. Kako bi se proces pročišćavanja enzima dodatno pospješio, kao alternativa klasičnim procesima koji se provode u šaržnim makroekstraktorima, sve više se koriste mikroekstraktori.

U ovom radu provedeno je pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze podrijetlom iz *Trametes versicolor* dobivenog fermentacijom na čvrstim nosačima repinih rezanaca. Pročišćavanje enzima ksilanaza provedeno je vodenim dvofaznim sustavom kapljevina-kapljevina na bazi DES-a u šaržnom ekstraktoru i u mikroekstraktoru.

Ključne riječi: enzim ksilanaza, DES, ekstrakcija, šaržni ekstraktor, mikroekstraktor

SUMMARY

Xylanase belongs to a group of enzymes crucial for depolymerization and it is used to break down the linear polysaccharide xylan into xylose, breaking down hemicellulose, one of the main components of cell wall. Xylanase has found its application in the pulp and paper industry, the food industry and the chemical and pharmaceutical industries. In order to use xylanase as efficiently as possible, it is necessary to produce an enzyme of high catalytic activity, the key step being the purification of the enzyme.

The enzyme purification process is quite complex and presents certain challenges such as finding fast, efficient and environmentally friendly methods while reducing costs. Extraction with eutectic solvents (DESs) has proven to be an effective and sustainable method of extracting glycerol from biodiesel, extracting biologically active ingredients from natural sources, as an effective reaction medium that ensures improved contact between reactants in organic synthesis and catalysis. In order to further improve the enzyme purification process, as an alternative to classical processes carried out in batch macroextractors, microextractors are being used.

In this work, purification of the crude extract of *endo*-1,4-xylanase enzyme from *Trametes versicolor* produced by solid-state fermentation on beet pulp was carried out. Purification of the xylanase enzyme was performed with DES based aqueous two-phase liquid-liquid system in a batch extractor and in a microextractor.

Key words: xylanase, DES, extraction, batch extractor, microextractor

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Enzimi	2
2.1.1. Nomenklatura i klasifikacija enzima.....	3
2.1.2. Ksilanaza	4
2.1.3. Fermentacija na čvrstim nosačima	5
2.1.4. Metode pročišćavanja enzima	7
2.2. Vodeni dvofazni sustavi i ekstrakcija kao metoda pročišćavanja enzima	10
2.3. Eutektička otapala	10
2.4. Mikroekstraktor.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali.....	12
3.1.1. Kemikalije	12
3.1.2. Aparatura.....	12
3.1.3. Priprema otopina	13
3.1.4. Priprema eutektičkih otapala	15
3.2. Metode	15
3.2.1. Ekstrakcija proteina nakon procesa fermentacije na čvrstim nosačima	15
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina	16
3.2.3. Ugušćivanje ekstrakta enzima	16
3.2.4. Ispitivanje interakcije sirovog ekstrakta enzima <i>endo</i> -1,4-ksilanaza i eutektičkih otapala	17
3.2.5. Šaržna ekstrakcija enzima ksilanaza korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičkog otapala	17
3.2.6. Kontinuirana ekstrakcija enzima ksilanaza korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičkog otapala u mikroekstraktoru	18

3.2.7. Elektroforeza	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. Određivanje početne koncentracije proteina te dokazivanje prisutnosti enzima <i>endo</i> -1,4-ksilanaze u uzorku sirovog ekstrakta	21
4.2. Pročišćavanje sirovog enzima korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi DES-a u šaržnom ekstraktoru	22
4.3. Pročišćavanje sirovog enzima ksilanaza korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi DES-a u mikroekstraktoru	26
4.4. FTIR i UV/VIS spektrofotometrijska analiza	28
5. ZAKLJUČAK.....	35
6. LITERATURA	36
7. PRILOZI	40
Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina.....	40
8. ŽIVOTOPIS.....	41

1. UVOD

Enzimi su katalitički temelj metabolizma svih stanica, i kao takvi fokus su brojnih istraživanja. Od davnina enzimi su imali važnu ulogu u mnogim proizvodnim procesima, poput proizvodnje vina, sira, kruha i drugih namirnica. Kako u drugoj polovici dvadesetog stoljeća raste znanje o uporabi mikroorganizama, njihovih metaboličkih proizvoda te enzima, raste i broj istraživanja vezanih za njihovu potencijalnu industrijsku primjenu [1].

Biološki katalizatori, enzimi, utječu na brzinu kemijske reakcije te su kao takvi neophodni za živi i neživi svijet koji nas okružuje. Veoma je važno da enzimi koji se u reakcijama koriste kao katalizatori posjeduju veliku katalitičku aktivnost, koja se uobičajeno postiže njihovim pročišćavanjem [2]. Procesi pročišćavanja dugotrajni su i skupi, te uvijek postoji interes i potreba za pronalaskom novih, bržih, učinkovitijih te cjenovno prihvatljivijih postupaka.

Tijekom potrage za novim i jeftinijim metodama pročišćavanja, ekstrakcija eutektičkim otapalima pokazala se kao održiva i učinkovita metoda, ponajprije u pročišćavanju biodizela, odnosno uklanjanju glicerola iz biodizela [3]. Eutektička otapala smjesa su dviju ili više komponenata koje su u čistom stanju pri sobnoj temperaturi krutine, a temperatura taljenja eutektičkog otapala znatno je niža od temperature taljenja čistih komponenata. Sastoje se od molekula od kojih je jedna donor vodikove veze, a druga akceptor vodikove veze pri čemu su molekule međusobno povezane vodikovim vezama. Eutektička otapala odlikuju se svojstvima kao što su velika sposobnost otapanja različitih komponenata, dobra biorazgradivost, niska hlapljivost, nezapaljivost, ekološka prihvatljivost, laka priprava i niska cijena [4].

Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost procesa pročišćavanja enzima *endo*-1,4-ksilanaze korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičkog otapala. Enzim ksilanaza korišten u ovom radu podrijetlom je iz *Trametes versicolor*, a proizveden je fermentacijom na čvrstim nosačima iz repinih rezanaca. U nizu šaržnih eksperimenata ispitan je utjecaj pet različitih DES-ova na učinkovitost ekstrakcije enzima ksilanaza iz sirovog ekstrakta. Nakon preliminarnih istraživanja, odabran je DES korištenjem kojeg je postignuta najveća učinkovitost procesa ekstrakcije te je s njim provedena kontinuirana ekstrakcija enzima ksilanaza u mikroekstraktor. Osim toga, FTIR analizom (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) i UV/VIS spektrofotometrijskom analizom ispitan je utjecaj odabranog DES-a na enzim ksilanazu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Enzimi

Enzimi su proteinske makromolekule koje kataliziraju biokemijske reakcije. Nastaju preklapanjem linearnih polipeptidnih lanaca što njihovu trodimenzionalnu strukturu čini složenom. Katalitički potencijal enzima često je veći od onog koji imaju klasični kemijski katalizatori. Osim toga, kemijski katalizatori djeluju najčešće pri ekstremnijim uvjetima dok je katalitička aktivnost enzima velika pri blagim reakcijskim uvjetima što ih, između ostaloga, čini ekološki prihvatljivijim katalizatorima. Enzimi su ključne komponente živih organizama u kojima se konstantno odvija veliki broj reakcija kataliziranih enzimima kako bi se metabolizam stanica odvija nesmetano [5]. Velika prednost enzima, osim što ubrzavaju reakcije, je što tijekom katalitičkih reakcija ostaju nepromijenjeni te se mogu koristiti u više ciklusa iste ili nove reakcije. Reaktanti u biokemijskim reakcijama, čiju pretvorbu kataliziraju enzimi, se vrlo često nazivaju supstratima. Svaki enzim djeluje specifično što znači da pojedini enzim često katalizira samo određene vrste reakcija određenih tvari, odnosno supstrata. Po svojoj prirodi svi enzimi su proteini, no mnogi sadrže i neproteinski dio koji se naziva kofaktor [6].

Najstariji poznati zapis komercijalne uporabe enzima, odnosno mikroorganizama, potječe od opisa proizvodnje vina u Hamurabijevom zakoniku (drevni Babilon, oko 2100. pr. Kr.). Upotreba mikroorganizama kao izvora enzima za fermentaciju bila je raširena među drevnim civilizacijama. Reference na ove procese pronađene su u spisima ne samo iz Babilona već i iz ranijih civilizacija Rima, Grčke, Egipta, Kine i Indije. Drevni tekstovi također sadrže postupak proizvodnje octa, koji se temelji na enzimatskoj konverziji alkohola u octenu kiselinu [7]. Iako je biološka kataliza od otkrića fermentacije korištena tisućama godina, tek su u 19. stoljeću znanstvenici potaknuli pitanje jesu li za postupak kao što je fermentacija odgovorni živi organizmi ili kemijska supstanca [5].

Danas enzimi imaju važnu ulogu u brojnim procesima proizvodnje hrane i pića te su sastojci proizvoda široke primjene kao što su na primjer deterdženti za pranje rublja. Primjena enzima u farmaciji i medicini je od velikog interesa budući da se razvoj raznih bolesti može povezati s poremećajima u sintezi i aktivnosti jednog ili više enzima humanog staničnog metabolizma [7].

2.1.1. Nomenklatura i klasifikacija enzima

Prihvaćeni sustav za klasifikaciju i nomenklaturu enzima zasniva se na tri opća načela. Prvo načelo podrazumijeva da se nazivi enzima, posebno oni koji završavaju na *-ase*, koriste samo za pojedine enzime, tj. pojedine katalitičke cjeline i ne primjenjuju na sustav koji sadrži više od jednog enzima. Drugo načelo nalaže imenovanje i klasifikaciju enzima prema reakciji koju katalizira, što se odnosi na uočenu kemijsku promjenu izazvanu enzimom. Pri tome se mehanizam djelovanja zanemaruje, a srednji kofaktor ili protetske skupine nisu uključene u naziv. Dakle, enzim se ne može sustavno imenovati sve dok reakcija koju enzim katalizira nije ispravno identificirana. Treće načelo nalaže imenovanje i klasifikaciju enzima prema vrsti katalizirane reakcije koja omogućuje dodjelu enzimskih brojeva (E.C.) za olakšavanje naknadne jednoznačne identifikacije [8].

Prema izvješću prve Komisije za enzime 1961. godine [9], enzimi su podijeljeni u šest glavnih razreda prema vrsti katalizirane reakcije. Svaki razred sastoji se od kodnog broja s prefiksom E.C., koji sadrže četiri elementa odvojena točkom te imaju sljedeće značenje:

1. prva znamenka označava kojem od šest glavnih razreda enzim pripada,
2. druga i treća znamenka opisuju vrstu katalizirane reakcije,
3. četvrta znamenka je serijski broj enzima u njegovom podrazredu.

Razlike šest glavnih razreda enzima, prema vrsti katalizirane reakcije, prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija enzima prema vrsti katalizirane reakcije [6], [8].

Prva znamenka	Razred enzima	Vrsta katalizirane reakcije
1	Oksidoreduktaze	Reakcije oksidacije i redukcije; obuhvaća sve enzime koji kataliziraju redoks reakcije.
2	Transferaze	Kataliziraju prijenos atoma ili skupine između dvije molekule, kao što su metil, acil, amino glikozil ili fosfat.
3	Hidrolaze	Reakcija hidrolize; katalitičko cijepanje C-O, C-N, C-C i drugih veza.
4	Liaze	Uklanjanje skupine iz podloge; katalitička eliminacija C-O, C-N, C-C i drugih veza.
5	Izomeraze	Reakcije izomerizacije; kataliziraju geometrijske ili strukturne promjene unutar molekule.
6	Ligaze	Katalitičko spajanje dviju molekula

2.1.2. Ksilanaza

Ksilanaze su hidrolaze koje kataliziraju endohidrolizu 1,4- β -D-ksilozidnih veza u ksilanu. Rasprostranjena su skupina enzima uključena u proizvodnju ksiloze, a proizvodi ih mnoštvo organizama, uključujući bakterije, alge, gljive, praživotinje, puževe, rakove i insekte [10,11]. Mikrobne ksilanaze pokazuju različite specifičnosti prema supstratu i različita biokemijska svojstva što ih čini pogodnim za različite primjene u industrijskim i biotehnološkim procesima. Obzirom da su ksilanaze pronašle primjenu u proizvodnji hrane i pića, prehrani životinja, izradi papira, proizvodnji celuloze, tekstila i u farmaciji, povećana je potražnja za ksilanazama na globalnoj razini [12]. Tipični primjeri mikroorganizama koji proizvode izoenzime ksilanaze uključuju *Aspergillus niger*, čiji sojevi proizvode petnaest različitih izvanstaničnih ksilanaza, i *Trichoderma viride*, čiji sojevi proizvode trinaest različitih izvanstaničnih ksilanaza [10]. Ksilanaze iz različitih izvora mogu imati različita fizikalno-kemijska svojstva, strukture, specifičnu aktivnost i iskorištenje, čime se povećava učinkovitost i opseg hidrolize, ali istovremeno i njihova raznolikost i složenost [10]. S obzirom na rasprostranjenu upotrebu enzima ksilanaza, nužno je razviti održive, brze i jeftine procese njegove proizvodnje.

2.1.2.1. Klasifikacija enzima ksilanaza

Enzim ksilanaza se može općenito klasificirati u tri skupine na temelju molekulske mase i izoelektrične točke, kristalne strukture te katalitičko/kinetičkog svojstva. Na temelju molekularne mase i izoelektrične točke, enzim ksilanaza se dijeli u dvije skupine. U prvu skupinu pripadaju ksilanaze veće molekularne mase (iznad 30 kDa) s niskom izoelektričnom (kiselom) točkom, dok se u drugoj skupini nalaze ksilanaze niže molekularne mase (ispod 30 kDa) s visokom izoelektričnom (baznom) točkom. Međutim, primijećeno je nekoliko iznimaka u ovoj klasifikaciji gdje neke ksilanaze nije moguće svrstati u te dvije skupine. Stoga je uveden prikladniji sustav koji uključuje primarnu strukturu (kristal) i usporedbu katalitičke domene s svojstvima kao što su kinetika, katalitička svojstva, specifičnost supstrata i opis proizvoda. Genomske, strukturne (3D kristalne strukture) i funkcionalne informacije o enzimu ksilanaza grupirane u podrazrede glikozid hidrolaza (GH) dostupne su u bazi podataka enzima kojima su supstrati ugljikohidrati (CAZy) [13].

CAZy je baza podataka o enzimima koji igraju ključnu ulogu u razgradnji, modifikaciji i sastavljanju glikozidnih veza u ugljikohidratima i glikokonjugatima. Sastoji se od niza genomskih bilješki, klasifikacije podrazreda, strukturnih (3D kristal) i funkcionalnih (biokemijskih) podataka o enzima kojima su supstrati ugljikohidrati iz javno dostupnih izvora, poput Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI) [14].

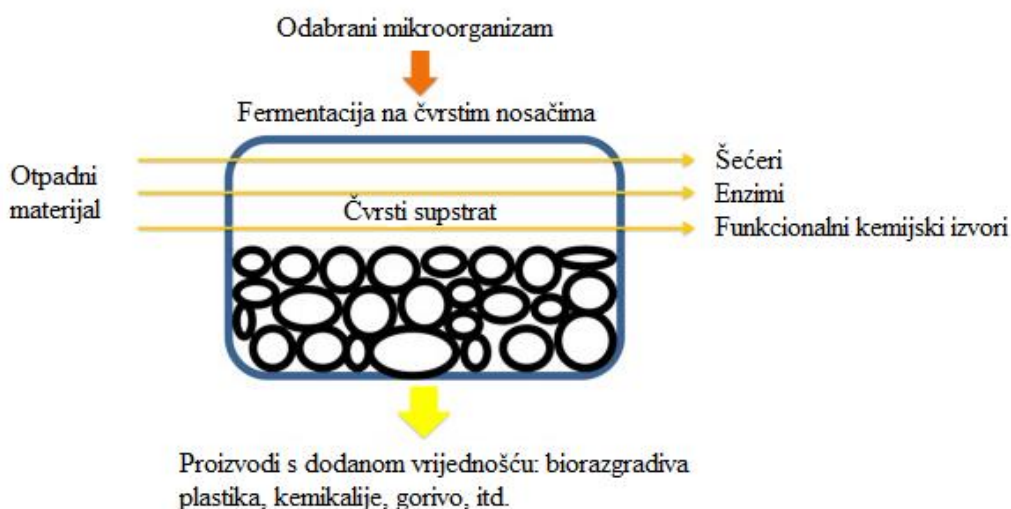
Glavni GH podrazredi povezani s ksilanazom su 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 i 62. GH podrazredi 5, 7, 8, 10, 11, i 43 imaju jednu zasebnu katalitičku domenu, dok enzimi grupirani u GH podrazrede 16, 51 i 62 imaju dvije katalitičke domene s bifunkcionalnim svojstvom. Enzimi grupirani u GH podrazrede 9, 12, 26, 30 i 44 pokazuju sekundarnu aktivnost ksilanaze [12].

2.1.3. Fermentacija na čvrstim nosačima

Kako bi enzimi bili što isplativiji za korištenje nužno je pronaći metode njihove proizvodnje koje su održive, jeftine i brze. Jedan od načina je korištenje otpadnih materijala iz agroindustrije kao jeftinog i dostupnog supstrata za uzgoj mikroorganizama uz proizvodnju enzima fermentacijom na čvrstim nosačima.

Fermentacija na čvrstim nosačima (engl. *Solid State Fermentation*, SSF) definira se kao proces fermentacije u kojem mikroorganizmi rastu na krutim materijalima bez prisutnosti slobodne kapljevine (Slika 1.). Korišteni supstrat mora posjedovati dovoljno vlage da podrži rast i metabolizam mikroorganizama [15,16]. U SSF-u vlaga potrebna za rast mikroba postoji

u apsorbiranom stanju ili u kompleksu s čvrstom matricom, a sam supstrat djeluje kao izvor ugljika. SSF se koristi za proizvodnju antibiotika, jednostaničnih proteina, nezasićenih masnih kiselina, enzima, organskih kiselina, biopesticida, biogoriva i aroma [17].



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz procesa fermentacije na čvrstim nosačima [18].

Cilj SSF-a je omogućiti bliski kontakt gljive ili bakterije s netopljivim supstratom i omogućiti što veću dostupnost hranjivih tvari iz supstrata za fermentaciju. Ovisno o prirodi krute faze koja se koristi, razlikuju se dvije vrste SSF sustava. Najčešće korišteni sustav uključuje uzgoj na prirodnom materijalu, a rjeđe na inertnoj podlozi impregniranoj kapljevitim medijem. Postupci fermentacije u krutom stanju mogu se klasificirati i prema tome je li početna kultura mikroorganizama za fermentaciju čista ili miješana. Čiste kulture općenito se koriste u industrijskim procesima SSF-a, jer pomažu u optimalnom iskorištavanju supstrata za ciljani proizvod, dok se miješane kulture koriste za biokonverziju agroindustrijskih ostataka [15,17].

Kulture koje su najčešće koriste u procesima fermentacije su mikrobne kulture gljiva i bakterija. Ipak, najboljim mikroorganizmom za provedbu SSF smatraju se nitaste gljive. Hifalni način rasta gljiva i njihova dobra otpornost na nisku aktivnost vode te uvjeti visokog osmotskog tlaka daju gljivama veliku prednost u odnosu na jednostanične mikroorganizme u kolonizaciji čvrstih supstrata i iskorištavanju dostupnih hranjivih tvari. Gljive su vrlo učinkoviti proizvođači enzima, pa se tako različiti sojevi nitastih gljiva koriste u proizvodnji različitih hidrolitičkih enzima kao što su celulaze, ksilanaze i pektinaze [15].

SSF je ekonomski isplativa i prihvatljiva tehnologija za industrijske procese biokonverzije i biorazgradnje. Razvoj održivog SSF-a i tehnologije bioprocasa novo je multidisciplinarno područje s mogućom primjenom u proizvodnji enzima, kemikalija, bioetanolu i farmaceutskih proizvoda. SSF nudi mnoge prednosti u odnosu na konvencionalnu submerznu fermentaciju, kao što su, jednostavni i jeftini supstrati, otapanje hranjiva iz krutih podloga nije potrebno, izostanak striktno kontrole većine procesnih parametara tijekom provedbe fermentacije, iskorištenje proizvoda je uglavnom veće, manji su energetske zahtjevi, proizvodi se manje otpadne vode, a izolacija produkata je u pravilu jednostavnija. SSF pruža fleksibilnost u pogledu sirovina koje se koriste te mogućnosti proizvodnje različitih proizvoda s dodanom vrijednošću [19].

Bioreaktore za SSF prikladno je podijeliti u četiri skupine, na temelju strategija prozračivanja i miješanja koje se koriste:

1. Bioreaktori s pliticama u kojima sloj supstrata nije moguće prisilno prozračivati te ostaje statičan tijekom cijelog razdoblja fermentacije ili se vrlo rijetko miješa.
2. Bioreaktori sa slojem supstrata koji se prisilno prozračuje pri čemu sloj ostaje statičan tijekom cijelog razdoblja fermentacije ili se vrlo rijetko miješa.
3. Bioreaktori s rotirajućim bubnjem u kojima sloj supstrata nije prisilno prozračen, pri čemu se zrak uvodi u bioreaktor u prostoru iznad bubnja, ali se sloj miješa kontinuirano ili vrlo često.
4. Bioreaktori u kojima se sloj supstrata prisilno prozračuje i miješa kontinuirano ili vrlo često. Za ovu vrstu bioreaktora moguće su različite izvedbe [20].

2.1.4. Metode pročišćavanja enzima

Jednom kada se enzim proizvede, nužno ga je pročistiti. Naime, tijekom proizvodnje enzima uglavnom se dobivaju smjese proteina u kombinaciji s različitim nečistoćama i sporednim produktima. Sve to potrebno je ukloniti kako bi se enzim koristio kao katalizator. S povećanjem čistoće enzima, povećava se i njegova katalitička aktivnost pa je vrlo bitno odabrati pogodnu metodu pročišćavanja. Neke od tradicionalnih metoda pročišćavanja enzima su filtriranje, centrifugiranje, isoljavanje, taloženje, elektroforeza, ultrafiltracija te kromatografija (kromatografija ionske izmjene, kromatografija isključenja po veličini, ...). Kako bi pročišćavanje enzima bilo uspješno provedeno potrebno je odabrati odgovarajuće metode koje povećavaju prinos i čistoću enzima uz minimalni broj procesnih stupnjeva [2].

- Isoljavanje

Isoljavanje je postupak izdvajanja enzima iz otopine pomoću neutralnih soli temeljeno na činjenici da je većina enzima manje topljiva pri visokim koncentracijama soli. Koncentracija soli pri kojoj se enzimi talože razlikuje se od enzima do enzima. Dodavanje neutralne soli komprimira solvacijski sloj oko enzima i povećava interakcije među enzimima. Povećanjem koncentracije soli u otopini sve veći dio vode povezan je s ionima soli. Radi toga manji broj molekula vode dostupan je solvacijskom sloju oko molekule enzima, što dovodi do nakupljanja i taloženja enzima iz otopine. Postupak izoljavanja koristan je za koncentriranje razrijeđenih otopina enzima te pročišćavanje enzima uz istovremeno održavanje njihove aktivnost [21].

- Kromatografija ionske izmjene

Kromatografija ionske izmjene (ili ionska kromatografija) je zbog velike sposobnosti razlučivanja i visokog oporavka aktivnosti enzima jedna od najčešće korištenih metoda pročišćavanja enzima [6].

Metoda se temelji na separaciji ioniziranih molekula prema razlikama u naboju u funkciji pH-vrijednosti. Nabijene molekule u uzorku odvajaju se uz pomoć elektrostatske sile privlačenja koje prolaze kroz ionsku smolu pri određenoj pH-vrijednosti i temperaturi. Odvajanje se odvija reverzibilnom izmjenom iona prisutnih u otopini i u ionsko izmjenjivačkoj smoli. Postupak razdvajanja molekula iz smjese ovisi o vrsti upotrijebljene smole za izmjenu iona. Postoje dvije vrste ionskih smola:

- Smole za izmjenu kationa su izmjenjivači negativnog naboja, sadrže pozitivno nabijeni protuion i namijenjene su zadržavanju kationa.
- Smole za izmjenu aniona su pozitivno nabijeni izmjenjivači, sadrže negativno nabijeni protuion i namijenjene su zadržavanju aniona [22].

- Kromatografija isključenja po veličini

Kromatografija isključenja po veličini je separacijska metoda koja se temelji na razdvajanju molekula uzorka na temelju njihove veličine i oblika, odnosno molekulske mase. Manje molekule ulaze u pore čestica punila i zaostaju u koloni, dok veće molekule brže prolaze kroz kolonu jer zbog svoje veličine ne mogu difundirati u pore čestica punila kolone. Osim što je kromatografija isključenja po veličini dobra metoda pročišćavanja korisna je i za dobivanje informacija o molekulskoj masi enzima te sastavu sirovog ekstrakta enzima.

- Elektroforeza

Elektroforeza je primarno analitički postupak, ali je idealna metoda odvajanja te se koristi i za pročišćavanje enzima. Brzina i smjer migracije enzima u električnom polju ovisi o jakosti polja, naboju enzima, veličini i obliku enzima te viskoznosti medija što ima za rezultat različite položaje na kojima se u gelu, mediju koji je stacionarna faza procesa elektroforeze, akumuliraju različiti enzimi [6].

Elektroforetsko odvajanje gotovo se uvijek provodi u poroznim gelovima koji služe kao molekularno sito i pojačavaju odvajanje. Molekule manje od pora gela lako se kreću kroz gel, dok molekule veće od pora gela postaju praktički nepokretne. Električno polje primjenjuje se tako da proteini migriraju s negativne na pozitivnu elektrodu, obično odozgo prema dolje [23].

- Ultrafiltracija

Ultrafiltracija je filtracijski proces čija je pokretačka sila ostvarena razlika tlakova, a temelji se na razdvajanju komponenata u vodenim otopinama prema molekularnoj veličini, obliku i/ili naboju, ovisno o veličini pora filternog sredstva. Ultrafiltracijski proces odvajanja pomoću membrana s veličinom pora od 1-100 nm, ukloniti će tvari velike molekulske mase, organske i anorganske molekule te koloidne tvari. Iako se za neke veće predstavnike enzima mogu koristiti ultrafiltracijske tehnike, enzimi se zbog svoje veličine češće razdvajaju nanofiltracijom. Nanofiltracija se odlikuje veličinom pora filternog sredstva manjom od 1 nm, što ju čini pogodnijom tehnikom za razdvajanje enzima [24,25].

Iako su spomenute metode učinkovite, često se moraju ponavljati u više koraka kako bi se dobio enzim željene čistoće. Sve to usporava, a i značajno poskupljuje proces pročišćavanja enzima. Zbog ovih nedostataka sve je popularnije korištenje vodenih dvofaznih sustava za pročišćavanje proteina i enzima ekstrakcijom. Vodeni dvofazni sustavi u pravilu su prikladni za pročišćavanje osjetljivih biomolekula kao što su enzimi te ne izazivaju njihova oštećenja ni strukturne promjene.

2.2. Vodeni dvofazni sustavi i ekstrakcija kao metoda pročišćavanja enzima

Vodeni dvofazni sustavi opsežno su proučavani radi njihove sposobnosti istodobnog odvajanja i pročišćavanja raznih bioloških proizvoda s visokim iskorištenjima i visokom čistoćom [26]. Ovisno o sastavu, vodeni dvofazni sustavi mogu se prilagoditi za odvajanje i pročišćavanje stanica, nukleinskih kiselina, proteina, antitijela i malih molekula. Nastaju kada se polimeri, soli, alkoholi manjih molekulskih masa i/ili ionske kapljevine kombiniraju u kritičnim koncentracijama, što rezultira stvaranjem dviju faza. Obje faze su u načelu hidrofilne, iako obično gornja faza ima tendenciju biti nešto hidrofobnija. Glavne prednosti ove metode pročišćavanja enzima uključuju potencijal primjene u industriji, sposobnost integracije procesa, uporabu kemikalija koje imaju nisku toksičnost i koje su biokompatibilne [27].

Tradicionalne metode pročišćavanja enzima su dugotrajne i skupe, a najčešće provedbom tih metoda dolazi do neželjenog gubitka aktivnosti enzima. Vodeni dvofazni sustavi razvijeni su kao alternativa tradicionalnim metodama ekstrakcije, te se temelje na prijenosu otopljene tvari iz jedne vodene faze u drugu vodenu fazu. Kao ekološki prihvatljivo ekstrakcijsko sredstvo sve više se koriste DES-ovi, koji s odgovarajućom soli tvore vodeni dvofazni sustav [28]. Takvi sustavi karakterizirani su visokom učinkovitošću ekstrakcije čime zadovoljavaju zahtjeve odvajanja i imaju veliku vrijednost primjene [29].

2.3. Eutektička otapala

Eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DESs) definiraju se kao smjesa dvije ili više krutih tvari koje stvaranjem vodikove veze tvore eutektičku kapljevitú smjesu. Temperatura taljenja DES-a niža je od temperature taljenja čistih komponenata. DES čine Lewis ili Brønsted kiseline i baze koje mogu sadržavati različite anionske i/ili kationske vrste [30].

Interes za primjenu DES-ova znatno se povećao na industrijskoj i akademskoj razini zbog njihove lake pripreme, niskih troškova proizvodnje, ekološke prihvatljivosti, velike snage otapanja i biorazgradivosti [4,28]. Štoviše, mogućnost podešavanja njihovih svojstava čini ih idealnim kandidatima za široki raspon primjena, kao što su to primjerice procesi pročišćavanja enzima. Osim prethodno spomenutih prednosti korištenja, DES u odnosu na ostala otapala odlikuju i primjenski interesantna fizikalno-kemijska svojstva kao što su niska hlapljivost, visoka toplinska stabilnost, biorazgradivost, nezapaljivost i ekološka prihvatljivost [31].

2.4. Mikroekstraktor

Upotreba mikrotehnologije sve je češća u separacijskim procesima. S obzirom da omogućavaju kontinuiranu proizvodnju i intenzifikaciju procesa, mikrotehnologija se smatra jednom od ključnih metoda za razvoj održivih procesa.

Mikroekstraktori, odnosno mikrostrukturirani ili mikrokanalni ekstraktori, uređaji su čija je barem jedna karakteristična dimenzija manja od milimetra, a dizajnirani su pomoću metoda mikrotehnologije i preciznog inženjerstva [32,33]. Kao separatori, koriste se u mikroprocesnom inženjerstvu, te u raznim područjima kemijske i farmaceutske industrije, biotehnologije i medicine. Mikroekstraktori su prije svega namijenjeni procesima manjeg kapaciteta, iako se specifičnim pristupom uvećanju procesa mogu razviti mikroekstraktorski sustavi za provedbu visokotonažnih procesa.

U odnosu na konvencionalne, makroekstraktore, upotreba mikroekstraktora može rezultirati značajnim prednostima kao što su:

- kontinuirani rad koji omogućuje naknadnu obradu nestabilnih međuprodukata s boljom selektivnošću,
- različite profile koncentracija u odnosu na šaržne procese zbog kontinuiranog rada i učinkovitijeg prijenosa tvari,
- kraće vrijeme ekstrakcije, reda veličine sekunde,
- velika vrijednost koeficijenta prijenosa topline dovodi do bolje kontrole brzine ekstrakcije, lokalni gradijenti temperature značajno su manji nego u klasičnim, šaržnim makroekstraktorima,
- grijanje i hlađenje mikroekstraktora je puno brže, što omogućuje veći raspon radnih temperatura.

Mikroekstraktori imaju i svoje nedostatke koji su usko povezani s njihovim malim dimenzijama, a prvenstveno se odnose na začepljenje mikrokanala, koroziju, pulsirajući tok te kraća vremena zadržavanja [32].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U svrhu razvoja vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnog otapala za kontinuiranu ekstrakciju enzima *endo*-1,4-ksilanaze, odabrano je pet različitih DES-ova. Na samom početku eksperimentalnog dijela rada proveden je niz različitih eksperimenata s odabranim DES-om u šaržnom ekstraktoru. Sustav s najvećom učinkovitošću ekstrakcije prenesen je u mikroekstraktor pomoću kojeg je ispitana mogućnost intenzifikacije procesa. Na kraju su provedene FTIR i UV/VIS spektrofotometrijska analiza ekstrahiranog enzima.

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U eksperimentima su korištene sljedeće kemikalije:

- akrilamid, Acros Organics, SAD
- amonijev peroksidisulfat, Alfa Aesar, Njemačka
- bromfenol plavo, Fisher Scientific, Belgija
- Commassie Brilliant Blue G-250, Fluka, SAD
- dikalijev hidrogen fosfat, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- glicin, Sigma-Aldrich, SAD
- goveđi serumski albumin, Sigma, Njemačka
- β -merkaptoetanol, Sigma-Aldrich, SAD
- metanol, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamin, TCI Europe N.V., Belgija
- *N,N'*-metilbisakrilamid, TCI Europe N.V., Belgija
- natrijev dodecil sulfat, Sigma-Aldrich, SAD
- octena kiselina ledena, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- octena kiselina, Kemika, Hrvatska
- Pageruler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Scientific, SAD
- TRIS (hidroksimetil) aminometan, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo

3.1.2. Aparatura

Za provedbu eksperimenata korištena je sljedeća aparatura:

- centrifuga (Universal 320 R, Hettich, SAD)
- digestor (PC150960, Flores Valles, Španjolska)

- FTIR spektrometar (Perkin Elmer, Spectrum One FTIR spectrometer, SAD)
- homogenizator (Vibromix 10, Tehnica, Slovenija)
- magnetska miješalica (MS-H-S, DLAB, SAD)
- orbitalna tresilica (PSU-10i, Orbital shaker, Biosan, SAD)
- pumpe (Harvard PHD 4400 Programmable, Harvard Apparatus, Inc, SAD)
- spektrofotometar (UV-1601, Shimadzu, Japan)
- spektrofotometar (UV-1800, Shimadzu, Japan)
- tresilica (Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, SAD)
- vertikalna jedinica za elektroforezu (SE260 Mighty Small II Deluxe, Hoefer, SAD)

3.1.3. Priprema otopina

- Bradfordov reagens

U smjesi 50 mL 95%-tnog etanola i 100 mL 85%-tne ortofosforne kiseline otopljeno je 100 mg bojila Commassie Brilliant Blue G-250. Tako pripremljena otopina nadopunjena je ultračistom vodom do volumena od 1 L. Dobiveni reagens je potom filtriran. Otopina se nakon pripreme čuva na 4 °C u boci obloženoj folijom koja sprječava negativan utjecaj svjetlosti. Prije korištenja Bradfordov reagens je potrebno termostatirati na sobnoj temperaturi (25 °C).

- 30%-tna vodena otopina akrilamida

Otopina je pripremljena na način da je 8,7 g akrilamida i 0,3 g *N,N'*-metilbisakrilamida otopljeno u 30 mL ultračiste vode uz miješanje na magnetskoj miješalici pri 400 okr/min te uz zagrijavanje (do 30 °C) do potpunog otapanja svih komponenti. Otopina je zatim profiltrirana korištenjem RC-45 filtera (CHROMAFIL Xtra jednokratni filter RC-45/13). Priprema otopine provedena je u digestoru. Pripremljena otopina čuva se u tamnom pri sobnoj temperaturi (25 °C) ili hladnjaku (4 °C) do 30 dana.

- 10%-tna vodena otopina natrijevog dodecil sulfata (SDS)

Otopina je pripremljena otapanjem 0,1 g natrijevog dodecil sulfata u 1 mL ultračiste vode. Prilikom pripreme otopine voda je natrijevom dodecil sulfatu dodavana polako, kap po kap s pipetom ili kapaljkom, a otopinu nije preporučljivo miješati jer se jako pijeni. Tako pripremljena otopina čuva se u hladnjaku (4 °C).

- 10%-tna vodena otopina amonijevog perksoisulfata (APS)

Otopina je pripravljena otapanjem 0,1 g amonijevog peroksidisulfata u 1 mL ultračiste vode. Otopina se priprema neposredno prije upotrebe jer je vrlo nestabilna pri sobnoj temperaturi (25 °C), ali se može čuvati u hladnjaku (4 °C) do 12 h nakon pripreme.

- 1,5 mol/L TRIS pufer pH-vrijednosti 8,8

Otopina je pripravljena otapanjem 9,09 g TRIS-a u 50 mL ultračiste vode te je pH otopine podešana dodatkom 1 mol/L otopine HCl.

- 0,5 mol/L TRIS pufer pH-vrijednosti 6,8

Otopina je pripravljena otapanjem 3,03 g TRIS-a u 50 mL ultračiste vode te je pH otopine podešana dodatkom 1 mol/L otopine HCl.

- 10%-tna vodena otopina bromfenolplavo (BPB)

Otopina je pripravljena otapanjem 0,1 g bromfenolplavog u 1 mL ultračiste vode.

- Gelovi za elektroforezu

Za provedbu elektroforeze potrebno je pripremiti gel za razdvajanje i gel za sabijanje. Gelovi su pripravljeni miješanjem određenih volumena unaprijed pripravljenih otopina kao što je navedeno u Tablici 2.

Tablica 2. Volumeni otopina potrebni za pripremu gelova za elektroforezu

Otopina	Gel za razdvajanje		Gel za sabijanje	
	-	V, mL	-	V, mL
H₂O	0,3348	3,350	0,6019	3,050
1,5 mol/L TRIS pH 8,8	0,2498	2,500	0,2467	1,250
Akrilamid 30 %	0,3997	4,000	0,1303	0,660
Natrijev dodecil sulfat (SDS) 10%	0,0100	0,100	0,0099	0,050
Amonijev peroksidisulfat (APS) 10%	0,0050	0,050	0,0099	0,050
N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin	0,0007	0,007	0,0014	0,007

- Pufer za provedbu elektroforeze

Otopina pufera priprema se otapanjem 30,285 g TRIS-a, 144,134 g glicina i 10,000 g SDS-a u 1 L ultračiste vode uz miješanje na magnetskoj miješalici pri 400 okr/min do otapanja svih komponenti. Dobivena temeljna otopina pufera razrijeđena je 10 puta prije korištenja.

- Pufer za uzorke

Otopina pufera za uzorke pripremljena je miješanjem 1,25 mL 0,5 mol/L TRIS-a pH 6,8, 2,50 mL glicerola, 2,00 mL 10%-tne vodene otopine SDS-a, 0,20 mL 10%-tne vodene otopine BPB-a i 3,55 mL ultračiste vode.

- Otopina za bojanje

Otopina je pripremljena otapanjem 0,1 g Commassie Brilliant Blue G-250 bojila u 50 mL metanola, 7 mL 10%-tne otopine octene kiseline i 43 mL ultračiste vode.

3.1.4. Priprema eutektskih otapala

Eutektska otapala: kolin-klorid:propilen-glikol (1:4) (ChCl:PG (1:4)), kolin-klorid:glicerol (1:2) (ChCl:Gly (1:2)), kolin-klorid:etilen-glikol (1:3) (ChCl:EG (1:3)), betain:urea (1:3) s 40% vode (B:U (1:3) 40%) i betain:urea (1:3) s 30% vode (B:U (1:3) 30%) pripremljena su u čaši volumena 50 mL iz odabranih komponenata i vode u potrebnom masenom udjelu izračunatom iz molarnih omjera. Sadržaj je miješan na magnetskoj miješalici 2 h pri 200 okr/min na temperaturi 50 °C do formiranja homogene i bistre kapljevine. Dobivena homogena smjesa se hladila na zraku te se čuvala u staklenoj bočici na temperaturi 25 °C.

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija proteina nakon procesa fermentacije na čvrstim nosačima

Nakon osmodnevnog procesa fermentacije gljive *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima repinih reznaca provedena je ekstrakcija enzima dodavanjem ultračiste vode u 2 g fermentiranog medija. Ovako dobivena suspenzija periodično je miješana protresanjem svakih 5 min tijekom 15 min. Razdvajanje krute od kapljevite faze provedeno je centrifugiranjem pri 10.000 okr/min tijekom 5 minuta. Ekstrahirani enzimi bili su prisutni u kapljevitoj fazi koja je kao sirovi ekstrakt korištena u procesu ekstrakcije enzima.

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina korišten je linearizirani Bradford test. Linearizirani Bradford test temelji se na vezanju boje Commassie Brilliant Blue G-250 sadržane u reagensu na proteine te je vrlo brz, jednostavan i osjetljiv. Linearno područje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina u baždarnom dijagramu pojavljuje se u vrlo uskom rasponu koncentracija, od 2-10 mg/L, što može stvarati probleme tijekom analize. Iz tog razloga korišteni Bradfordov test je modificiran, odnosno lineariziran prema protokolu opisanom u radu Ernst *i sur.* [34].

Baždarni dijagram izrađen je korištenjem vodene otopine goveđeg serumskog albumina (BSA) koncentracije 1 mg/mL, što odgovara apsorbanciji od 0,660 pri valnoj duljini od 280 nm. Nakon pripreme otopine BSA apsorbancija je izmjerena u kvarcnoj kiveti. Otopina je potom razrijeđena 10 puta, te je dobivena temeljna otopina koncentracije 0,1 mg/mL. Potom je izmjerena apsorbancija svih kiveta koje su se koristile u testu s 1 mL ultračiste vode pri valnim duljinama 595 nm i 450 nm. Zatim je u kivetama pripremljeno 500 µL otopina koncentracije BSA od 0, 1, 5, 10, 15, 20 mg/L te je u svaku kivetu dodano 500 µL Bradford reagensa s razmakom od 10 sekundi. Kiveta je homogeniziran par sekundi nakon dodavanja reagensa i nakon 10 minuta spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija pri valnim duljinama od 595 nm i 450 nm. Za sve uzorke napravljena su tri paralelna mjerenja. Na temelju dobivenih apsorbancija i pripadajućih koncentracija izrađen je baždarni pravac (Prilog 1.) pomoću kojeg su određene koncentracije enzima ksilanaza u nepoznatim uzorcima.

3.2.3. Ugušćivanje ekstrakta enzima

Ugušćivanje ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze provedeno je pomoću filtera za ugušćivanje (Amicon® Ultra-0,5 mL filter za ugušćivanje, Merck KGaA, Njemačka). U filter za ugušćivanje dodano je 0,5 mL sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze, filter je zatim položen u *Eppendorf* epruvetu i centrifugiran 10 min pri 4000 okr/min i 4 °C. S obzirom na veličinu pora filtera, filter zadržava proteine te propušta vodu i čestice manjih dimenzija. Nakon prvog ciklusa centrifugiranja u filteru zaostaje 200 µL uzorka s ugušćenim proteinom. U filter se iznova dodaje svježa otopina sirovog ekstrakta enzima do početnog volumena od 0,5 mL. Postupak centrifugiranja ponavljan je do dobivanja željene koncentracije i volumena proteina potrebnog za provedbu daljnjih ispitivanja.

3.2.4. Ispitivanje interakcije sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaza i eutektičkih otapala

Kako bi se utvrdilo eventualno postojanje interakcije sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze s pripremljenim DES-ovima, odnosno utjecaj otapala na strukturu, a time i na aktivnost enzima, korištene su FTIR i UV/VIS spektrofotometrija.

Tanki sloj uzorka stavljen je u FTIR spektrometar, koji usmjerava infracrvene zrake prema uzorku i mjeri snop i frekvencije na kojima uzorak apsorbira infracrveno svjetlo. Bitno je da je nanoseni uzorak dovoljno tanak kako bi kroz njega mogle proći infracrvene zrake. Uređaj stvara optički signal sa svim kodiranim infracrvenim frekvencijama koji se zatim dekodira primjenom matematičke tehnike, Fourierove transformacije, te proizvodi preslikavanje spektralnih informacija. Snimljen je spektar za uzorak komercijalnog enzima sa svakim pripremljenim DES te spektar donje (solne) faze uzoraka nakon šaržne ekstrakcije.

Apsorpcijski spektar na UV/VIS spektrofotometru snimljen je za sirovi ekstrakt enzima *endo*-1,4-ksilanaze i za uzorke dobivene nakon šaržne ekstrakcije. U kvarcnim kivetama je pripremljeno 500 μ L sirovog ekstrakta enzima odnosno donje faze uzoraka nakon šaržne ekstrakcije, te je u svaku kivetu dodano 500 μ L ultračiste vode. Tako pripremljenim uzorcima snimljen je apsorpcijski spektar u rasponu valnih duljina 190-700 nm.

3.2.5. Šaržna ekstrakcija enzima ksilanaza korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičkog otapala

Šaržna ekstrakcija provedena je u *Falcon* epruветama volumena 15 mL u kojima je pomiješano 1,3 g pojedinog DES-a i 2 mL vodene otopine ekstrakta enzima ksilanaze u kojoj je prethodno otopljena određena količina K_2HPO_4 kako bi se u uzorcima postigla željena koncentracija soli u rasponu 0,6-0,9 g/mL. Tako dobivene smjese su homogenizirane i stavljene u inkubacijsku tresilicu 30 min pri 400 okr/min i temperaturi 25 °C. Nakon homogenizacije, smjesa je centrifugirana 5 min pri 4000 okr/min i temperaturi 25 °C nakon čega je, ukoliko su nastala dva odijeljena sloja, izmjeren volumen svakog sloja. Slojevi su međusobno odvojeni pomoću šprice i igle kako bi se izbjeglo miješanje faza te je u svakoj od faza određena koncentracija proteina Bradford testom. Za svaki uzorak napravljena su dva paralelna mjerenja.

Iz dobivenih volumena i koncentracija za svaku su smjesu izračunati koeficijent raspodjele (Jednadžba (1)) i učinkovitost ekstrakcije proteina (Jednadžba (2)) na sljedeći način:

$$K = \frac{\gamma_{P,G.F.}}{\gamma_{P,D.F.}} \quad (1)$$

$$E = \frac{\gamma_{P,G.F.} \cdot V_{G.F.}}{\gamma_{P,G.F.} \cdot V_{G.F.} + \gamma_{P,D.F.} \cdot V_{D.F.}} \quad (2)$$

gdje su $\gamma_{P,G.F.}$ i $\gamma_{P,D.F.}$ masene koncentracije proteina (P.) u gornjoj (G.), odnosno donjoj (D.) fazi uzorka, a $V_{G.F.}$ i $V_{D.F.}$ volumen gornje, odnosno donje faze.

3.2.6. Kontinuirana ekstrakcija enzima ksilanaza korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičkog otapala u mikroekstraktoru

Kontinuirana ekstrakcija enzima ksilanaza korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičkog otapala provedena je u mikroekstraktoru s dva ulaza ($L = 30$ cm, $d = 1000$ μ m). Kapljevine su dobavljene u mikroekstraktor pomoću dvije klipne pumpe koje su s mikroekstraktorom bile povezane teflonskim cjevčicama. Klip jedne pumpe napunjen je s otopinom enzima i soli željene koncentracije dok se u klipnu druge pumpe nalazio DES (Slika 2.). Protoci otopine enzima i soli te DES-a u rasponu 235,62 – 2356,20 μ L/min prilagođeni su na način da se u mikroekstraktoru dobio željeni volumni omjer otopine i DES-a. Proces ekstrakcije proveden je pri sobnoj temperaturi (25 °C). Uzorci su sakupljeni na izlazu iz ekstraktora u *Eppendorf* epruvete, nakon čega je izmjeren volumen svakog od dva odjeljenja sloja. Slojevi su međusobno odvojeni pomoću šprice i igle kako bi se izbjeglo miješanje faza te je u svakoj od faza određena koncentracija proteina Bradford testom. Za svaki uzorak napravljena su dva paralelna mjerenja, a iz dobivenih volumena i koncentracija za svaku su smjesu izračunati koeficijent raspodjele i učinkovitost ekstrakcije proteina prema prethodno definiranim jednadžbama (Jednadžbe (1) i (2)).



Slika 2. Aparatura za provedbu pročišćavanja enzima *endo*-1,4-ksilanaze u mikroekstraktoru

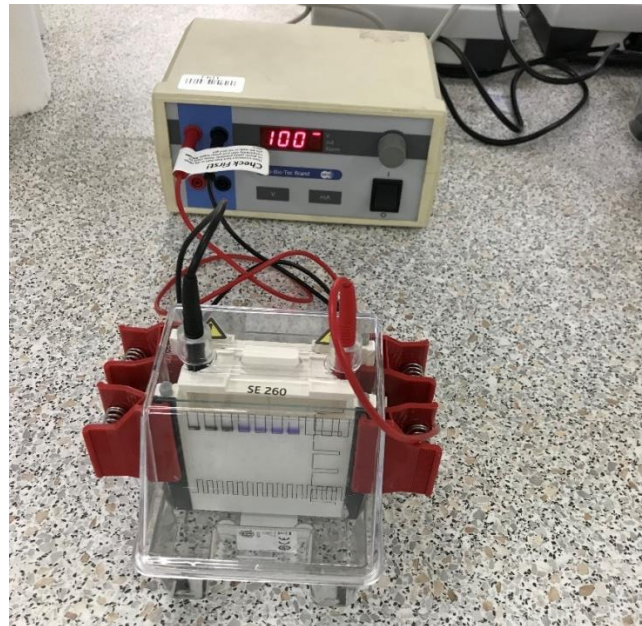
3.2.7. Elektroforeza

Nakon pripreme otopina (3.1.3) sastavljena je jedinica za elektroforezu. Između stakla koji se postavljaju na držače kao sendvič prvo je izliven gel za razdvajanje do približno 3 cm ispod ruba stakla. Gel za razdvajanje ostavljen je da polimerizira oko 30 minuta, nakon čega se izlijeva gel za sabijanje do vrha stakla te se u njega uranja češljic koji stvara jažice u koje se kasnije nanose uzorci proteina. Prostor iznad gela, uključujući jažice, napunjen je puferom za provedbu elektroforeze pomoću pipete. Pufer za provedbu elektroforeze nanosi se i u komoru za pufer i to približno 75 mL po jednoj komori.

U digestoru je miješanjem 950 μL pufera za uzorke i 5 μL β -merkaptetanola pripravljena otopina potrebna za pripremu uzoraka. Uzorak enzima pomiješan je s pripremljenom otopinom u omjeru 1:1 (10 μL uzorka + 10 μL otopine). Uzorci enzima centrifugirani su 1 min, zatim su stavljani 10 min u sušionik na 95 °C, te ponovno centrifugirani 1 min. Tako pripremljeni uzorci spremni su za punjenje jažica.

Prva jažica napunjena je s 5 μL *page ruler*-a, a ostale s 10 μL uzorka pomoću injekcijske igle. Nakon što su jažice napunjene sa svim uzorcima, donja komora za pufer napunjena je s približno 250 mL pufera za provedbu elektroforeze. Jedinica za elektroforezu zatvorena je poklopcem i priključena na izvor istosmjerne struje (Slika 3.). Prvih 10 minuta elektroforeza gelova se provodi pri konstantnom naponu od 100 V, a nakon toga pri naponu od 200 V. Elektroforeza se provodi približno 45 minuta, odnosno sve dok se crta s uzorcima nije spustila skoro do dna stakalaca. Nakon završetka elektroforeze, gel se odvaja od stakalaca te se provodi njegovo bojanje.

Bojanje se provodi u digestoru u kojem je orbitalna tresilica namještena na 100 okr/min. Uzorak se uroni u otopinu za bojanje u kojoj se boji 1 h. Kada je bojanje uzoraka završeno, gel se odbojava. Otopina za bojanje uklonjena je iz posudice, u koju je zatim stavljena 10%-tna otopina octene kiseline na način da prekrije cjelokupnu površinu gela. Pri istim uvjetima korištenim pri bojanju, uzorak je ostavljen na tresilici da se odbojava 1 h, uz jednu izmjenu 10%-tne octene kiseline.



Slika 3. Aparatura za provedbu elektroforeze

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedeno je pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze korištenjem vodenog dvofaznog sustava kapljevinna-kapljevinna na bazi eutektičkog otapala. Pročišćavanje enzima najprije je provedeno šaržnom ekstrakcijom s pet DES-ova pri različitim koncentracijama otopine soli K_2HPO_4 i ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze. Na temelju izračunatih učinkovitosti ekstrakcije proteina odabran je sustav u kojemu su provedeni svi daljnji pokusi, a kao optimalni sustav definiran je onaj u kojem je postignuta najveća učinkovitost ekstrakcije proteina. Kako bi se provela intenzifikacija procesa, ekstrakcija je provedena u mikroekstrктору.

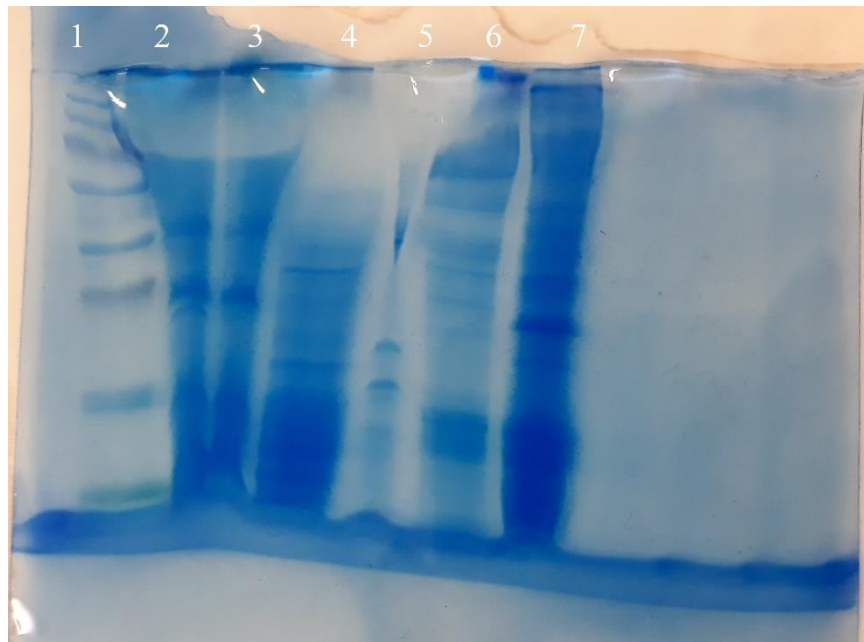
4.1. Određivanje početne koncentracije proteina te dokazivanje prisutnosti enzima *endo*-1,4-ksilanaze u uzorku sirovog ekstrakta

Prije početka procesa ekstrakcije bilo je potrebno odrediti koncentraciju proteina u sirovom ekstraktu. Određivanje početne koncentracije proteina bitno je kako bi se tijekom procesa ekstrakcije mogla pratiti učinkovitost procesa. Početna koncentracija proteina u uzorku sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze određena je pomoću Bradfordovog testa te je iznosila 0,002 mg/mL.

S obzirom da je koncentracija proteina u uzorku sirovog enzima bila mala, tj. ispod razine detekcije gel elektroforeze, uzorak enzima je ugušćen (Amicon® Ultra-0,5 mL filteri za ugušćivanje, Merck KGaA, Njemačka). Koncentracija proteina nakon ugušćivanja iznosila je 0,051 mg/mL. Tako dobiveni uzorak analiziran je gel elektroforezom. Intenzitet bojanja i debljina dobivenih vrpca ukazuju na relativnu veličinu, odnosno molekularnu masu enzima *endo*-1,4-ksilanaza (Slika 4.).

Prvi stupac gela prikazuje raspored proteinskih markera na gelu (Pageruler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa). Na temelju poznatih molekularnih masa vrpca standarda određene su molekulske mase proteina u komercijalnom uzorku enzima ksilanaza te u uzorku sirovog ekstrakta. U stupcima 2 i 3 prikazane su vrpce za sirovi ekstrakt. Kao što je vidljivo sirovi ekstrakt pokazuje tri vrpce koje odgovaraju vrijednostima molekulske mase 26 kDa, 34 kDa i 43 kDa. Dobiveni rezultati ukazuju na to da je u sirovom ekstraktu prisutno više različitih enzima, a ne samo *endo*-1,4-ksilanaza. Kako bi točno odredili koja od tri vrpce pripada enzimu *endo*-1,4-ksilanaza u stupcima 4 do 7 nanosene su različite koncentracije komercijalnog enzima *endo*-1,4-ksilanaze. Odsustvo vrpca u stupcima 4 do 6 ukazuje na to da je koncentracija enzima u tim uzorcima bila ispod razine detekcije. Tek u stupcu 7 može se uočiti pojavljivanje jedne vrpce koja odgovara molekularnoj masi 34 kDa. Na temelju dobivenih

vrijednosti možemo zaključiti kako se u sirovom ekstraktu nalazi enzim ksilanaza (34 kDa) te jedan manji i jedan veći enzim.



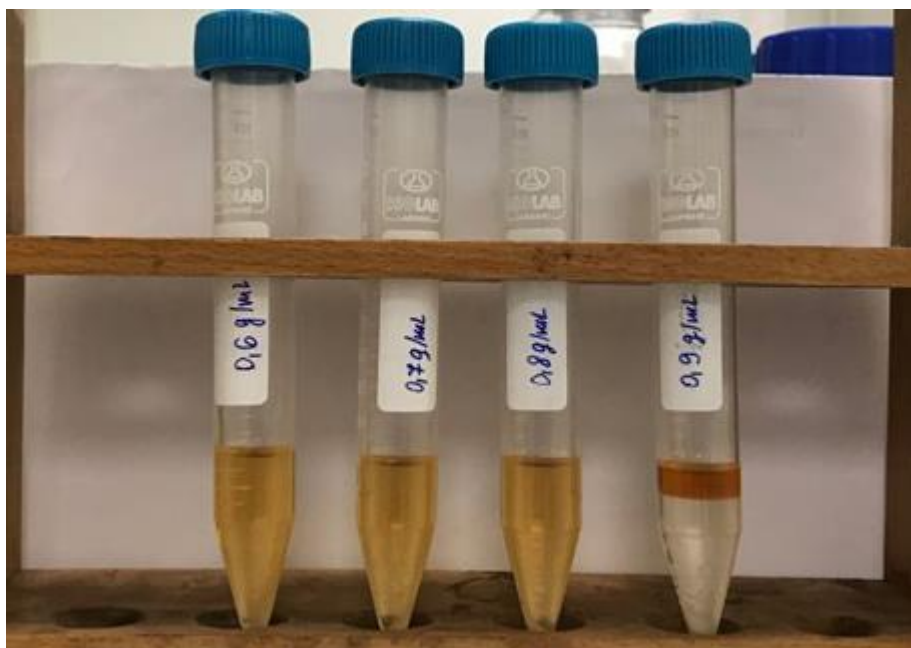
Slika 4. Proteinske ljestve i markeri na gelu; linija 1: 5 μ L PAGERULER™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, linije 2 i 3: 10 μ L ugušćenog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaza, linije 4, 5, 6 i 7: 10 μ L komercijalni enzim *endo*-1,4-ksilanaza

4.2. Pročišćavanje sirovog enzima korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi DES-a u šaržnom ekstraktoru

Eutektička otapala, pripremljena od različitih kombinacija donora i akceptora vodikove veze imaju različita fizikalno-kemijska svojstva. Prvi DES odabran u ovom istraživanju bio je betain:urea (1:3) s 30% vode (B:U (1:3) 30%). Ovo otapalo odabrano je na temelju prethodnih istraživanja koja su provedena na enzimu lipaza [35]. Kako bi uopće došlo do formiranja vodenog dvofaznog sustava bilo je potrebno odabrati i sol koja je topiva u vodi u velikim koncentracijama. Na temelju rezultata prethodno spomenutog istraživanja [36], u ovom radu odabrana je sol kalijev hidrogenfosfat i to u koncentraciji 0,6 g/mL. Ekstrakcija je provedena pri sobnoj temperaturi (25 °C), te nije uočeno formiranje dviju faza. Iako se vodeni dvofazni sustav betain:urea DES s 30% vode i 0,6 g/mL K_2HPO_4 pokazao učinkovitim za ekstrakciju enzima lipaza [35], spomenuti sustav ipak nije bio pogodan za ekstrakciju enzima *endo*-1,4-ksilanaza.

Kako bi ispitali koja je koncentracija soli potrebna za učinkovito razdvajanje faza, ekstrakcija u šaržnom ekstraktoru provedena je za raspon koncentracija K_2HPO_4 0,6-0,9 g/mL.

Provedbom ekstrakcije pri sobnoj temperaturi (25 °C) uočeno je formiranje dviju faza samo za koncentraciju K_2HPO_4 od 0,9 g/mL (Slika 5.). Određivanjem volumena i koncentracije proteina u obje faze nastale pri ovoj koncentraciji K_2HPO_4 , izračunata je učinkovitost ekstrakcije od samo 9,68 %. S obzirom da učinkovitost nije bila zadovoljavajuća, a uz pretpostavku da je koncentracija proteina u uzorku sirovog ekstrakta ($\gamma = 0,002$ mg/mL) bila preniska za provedbu procesa ekstrakcije, proces je ponovljen s ugušćenim enzimom ($\gamma = 0,081$ mg/mL).



Slika 5. Fotografija uzoraka dobivenih šaržnom ekstrakcijom u rasponu koncentracija K_2HPO_4 0,6-0,9 g/mL uz DES B:U (1:3) 30%

Provedbom šaržne ekstrakcije uzorka ugušćenog enzima u kojemu je koncentracija proteina bila 0,081 mg/mL, dobivena je veća učinkovitost ekstrakcije koja je iznosila 26,76 %. Može se pretpostaviti kako bi učinkovitost ekstrakcije i dalje rasla s povećanjem koncentracije proteina u uzorku međutim koncentraciju nije bilo moguće povećati daljnjim ugušćivanjem.

Osim odabira otapala, na učinkovitost procesa ekstrakcije može se utjecati i promjenom raznih čimbenika kao što su temperatura, pH itd. U svom radu Petračić *i sur.* [36] pokazali su da porastom temperature ekstrakcija postaje učinkovitija jer se smanjuje viskoznost DES-a, pa je u sljedećem koraku ekstrakcija provedena pri 40 °C. Kada je šaržna ekstrakcija provedena pri ovoj temperaturi dobivena je učinkovitost ekstrakcije od 2,93 %. Do ovog značajnog pada

učinkovitosti ekstrakcije s povećanjem temperature vjerojatno je došlo zbog pucanja vodikovih veza između aminokiselinskih ostataka i vode vezane na površinu enzima [37].

Kao što je prethodno navedeno, DES-ovi pripremljeni od različitih kombinacija donora i akceptora vodikove veze imaju različita svojstva te su u sljedećem koraku za provedbu šaržne ekstrakcije odabrana četiri dodatna DES-a, B:U (1:3) 40%, ChCl:PG (1:4), ChCl:Gly (1:2) i ChCl:EG (1:3). S obzirom da na formiranje faza može utjecati i koncentracija soli, šaržna ekstrakcija provedena je s četiri prethodno navedena dodatna DES-a te ponovno s DES-om B:U (1:3) 30%. Šaržne ekstrakcije sa svim DES-ovima provedene su za različite koncentracije K_2HPO_4 u rasponu 0,6-0,9 g/mL.

Kao što je vidljivo iz rezultata prikazanih u Tablici 3., kod ChCl:Gly (1:2) i ChCl:EG (1:3) za cijeli raspon koncentracija nije došlo do razdvajanja faza, kod ChCl:PG (1:4) za cijeli raspon koncentracija došlo je do razdvajanja faza uz nisku učinkovitost ekstrakcije, a kod B:U (1:3) 30% i B:U (1:3) 40% nema razdvajanja faza za koncentracije 0,6 g/mL i 0,7 g/mL. Najveća učinkovitost ekstrakcije dobivena je u pokusu provedenom s B:U (1:3) 30%, koncentracije K_2HPO_4 0,9 g/mL te je iznosila 16,29%.

Tablica 3. Rezultati šaržne ekstrakcije provedene uz različite DES za raspon koncentracija K_2HPO_4 0,6-0,9 g/mL

DES	$T, ^\circ C$	$\gamma (K_2HPO_4), g/mL$	$E, \%$	K
B:U (1:3) 30%	25	0,6	/	/
		0,7	/	/
		0,8	10,69	0,393
		0,9	16,29	0,432
B:U (1:3) 40%	25	0,6	/	/
		0,7	/	/
		0,8	14,13	0,470
		0,9	13,79	0,480
ChCl:PG (1:4)	25	0,6	11,66	0,076
		0,7	4,21	0,025
		0,8	13,06	0,087
		0,9	9,79	0,063
ChCl:Gly (1:2)	25	0,6	/	/
		0,7	/	/
		0,8	/	/
		0,9	/	/
ChCl:EG (1:3)	25	0,6	/	/
		0,7	/	/
		0,8	/	/
		0,9	/	/

Iz provedenih eksperimenata vidljivo je da se u većini slučajeva učinkovitost ekstrakcije prvo povećava s povećanjem koncentracije soli, a onda se smanjuje nakon određene vrijednosti. Razlog tome je vjerojatno smanjena topljivost proteina u donjoj fazi kao posljedica veće koncentracije soli. Zbog toga proteini prelaze u gornju fazu tj. DES. Daljnjim povećanjem koncentracije soli dolazi pak do smanjenja količine vode u sustavu što smanjuje učinkovitost ekstrakcije. Naime, udio vode je vrlo važan čimbenik za otapanje proteina u vodenim dvofaznim sustavima te je ona potrebna u određenom udjelu kako bi proces ekstrakcije bio uspješan [38].

Na temelju svih dobivenih rezultata, može se zaključiti kako je od svih ispitanih sustava vodeni dvofazni sustav na bazi betain:urea DES s 30% vode i koncentracijom K_2HPO_4 od 0,9 g/mL najučinkovitiji za ekstrakciju proteina.

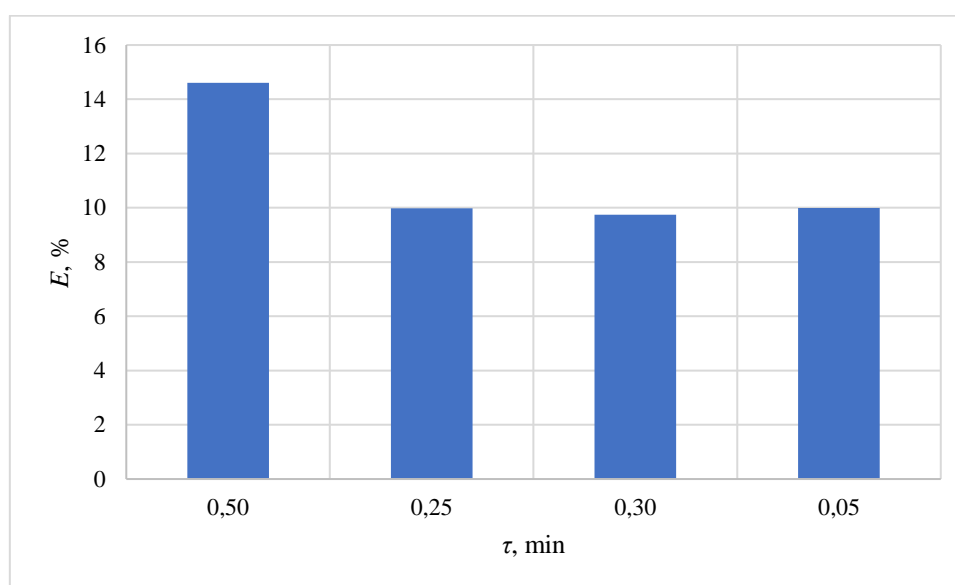
4.3. Pročišćavanje sirovog enzima ksilanaza korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi DES-a u mikroekstrктору

S obzirom da je prijenos tvari, zbog skraćenog difuzijskog puta, intenzivniji u mikroekstraktorima, pročišćavanje sirovog enzima ksilanaza korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi DES-a provedeno je na mikrorazini.

Proces ekstrakcije u mikroekstrктору proveden je vodenim dvofaznim sustavom pri kojem je postignuta najveća učinkovitost ekstrakcije u šaržnom ekstrктору, tj. s betain:urea (1:3) s 30 % vode i koncentracijom K_2HPO_4 od 0,9 g/mL. Ispitana su različita vremena zadržavanja te različiti omjeri faza u pokusima provedenim pri sobnoj temperaturi (25 °C). Kao što se može vidjeti iz rezultata prikazanih u Tablici 4., najveća učinkovitost ekstrakcije iznosila je 14,61 % u pokusu provedenom pri najdužem vremenu zadržavanja od $\tau = 0,50$ min te omjeru faza DES-a i otopine enzima i soli 1:1 (Slika 6.). Učinkovitosti ekstrakcije u mikroekstrктору malo se razlikuju od onih dobivenih šaržnom ekstrakcijom gdje je maksimalna učinkovitost ekstrakcije iznosila 16,29 %. Na temelju dobivenog možemo zaključiti kako učinkovitost ekstrakcije u ovom sustavu nije limitirana prijenosom tvari nego najvjerojatnije lošim vodikovim interakcijama između enzima ksilanaze i DES-a. Osim toga, razlog ovakvim vrijednostima učinkovitosti ekstrakcije mogu biti i smetnje uzrokovane prisustvom različitih tvari u sirovom ekstraktu, kao što su primjerice ugljikohidrati i drugi enzimi, a koji su u sirovom ekstraktu zaostali nakon fermentacije *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima repinih rezanaca.

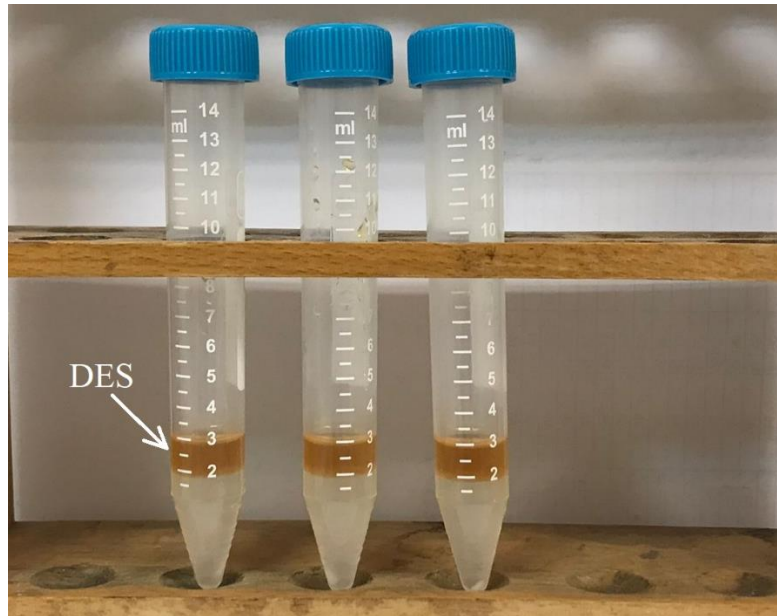
Tablica 4. Ekstrakcija sirovog enzima ksilanaza s DES-om betain:urea (1:3) 30% i koncentracijom K_2HPO_4 od 0,9 g/mL u mikroekstratoru

τ , min	ϕ (DES), $\mu\text{L}/\text{min}$	ϕ (enzim), $\mu\text{L}/\text{min}$	E , %	K
0,50	235,62	235,62	14,61	0,17
0,25	471,24	471,24	9,98	0,11
0,30	392,70	392,70	9,75	0,11
0,05	2356,20	2356,20	9,99	0,11



Slika 6. Ovisnost učinkovitosti ekstrakcije proteina o vremenu zadržavanja

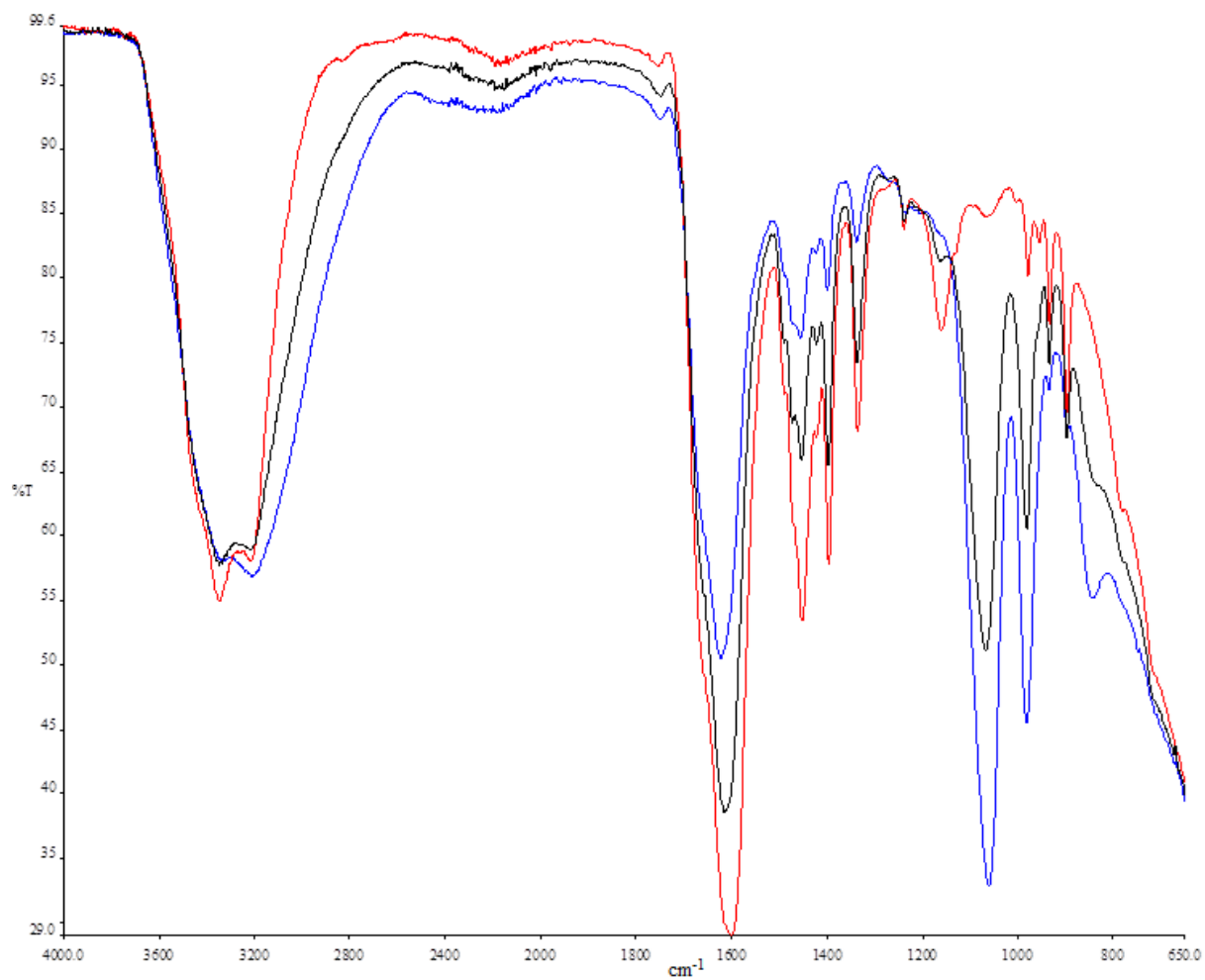
Također, iako je učinkovitost ekstrakcije proteina bila niska, u svim eksperimentima provedenim u okviru ovog istraživanja, uočena je promjena boje donje faze nakon provedene ekstrakcije. Naime, nakon ekstrakcije proteina iz podloge nakon SSF, uzorak ekstrahiranog proteina je smeđe boje zbog nečistoća koje su prisutne u podlozi. Nakon ekstrakcije pomoću DES-a, u svim uzorcima uočeno je potpuno uklanjanje boje (Slika 7.). Iz navedenog se može zaključiti da iako korišteni DES-ovi ne ekstrahiraju enzim ksilanazu s visokom učinkovitošću, uklanjaju iz uzorka proteina mnoge druge nečistoće prisutne nakon SSF. Na taj način, DES bi se ipak mogli, ako ne za ekstrakciju proteina, koristiti za pročišćavanje ostalih komponenti podloge zaostalih nakon SSF. U tom slučaju bitno je pronaći onaj DES koji uklanja što manje proteina, a što više ostalih nečistoća.



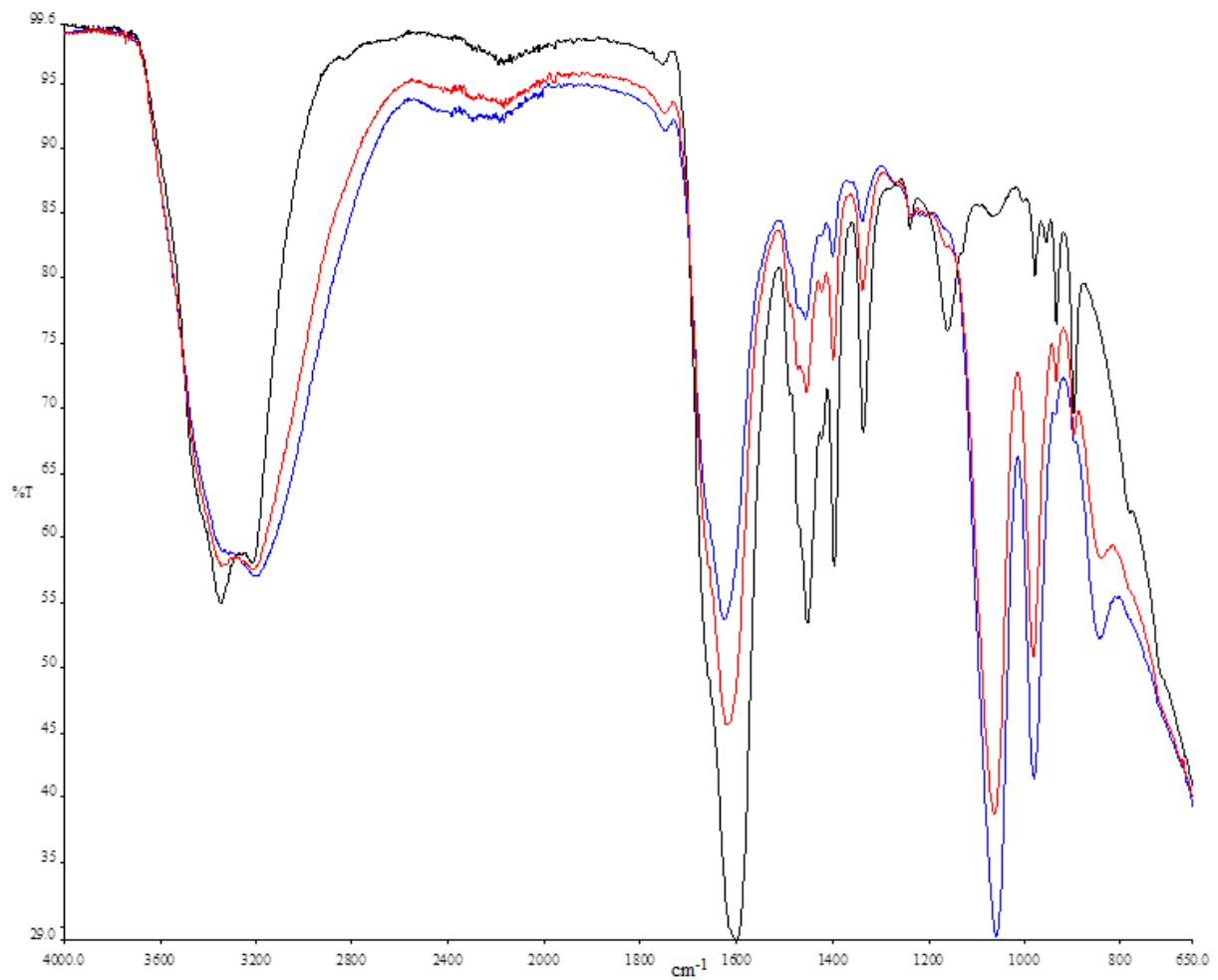
Slika 7. Uzorak nakon šaržne ekstrakcije sirovog enzima

4.4. FTIR i UV/VIS spektrofotometrijska analiza

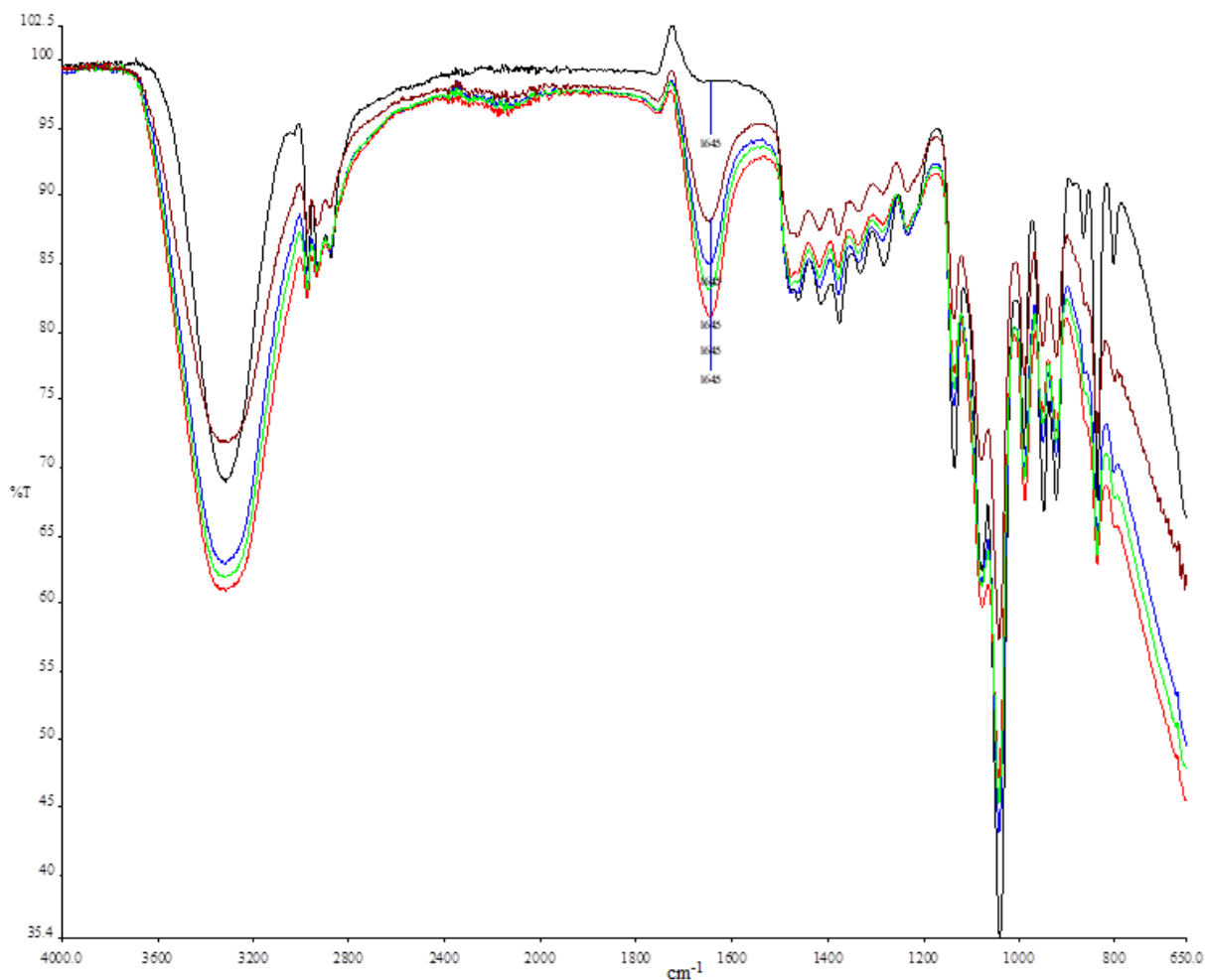
U prisutnosti DES-a može doći do promjene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina [39]. Promjene u tercijarnoj strukturi mogu biti uzrokovane formiranjem vodikovih veza između enzima i DES-a. U svrhu provjere nastanka vodikovih veza provedena je FTIR analiza uzoraka. Na temelju prethodnih istraživanja provedenih na enzimu lipaza [35] pretpostavljeno je kako neće doći do značajnijih promjena u izgledu spektara DES-a s i bez enzima *endo*-1,4-ksilaza. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 8., 9. i 10.



Slika 8. Rezultati FTIR analize za DES B:U (1:3) 40% (— čisti DES, — uzorak enzima nakon šaržne ekstrakcije s DES pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,8 g/mL, — uzorak nakon šaržne ekstrakcije s DES pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,9 g/mL)



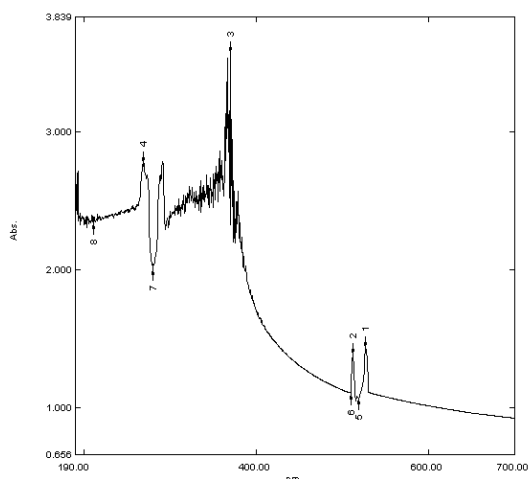
Slika 9. Rezultati FTIR analize za DES B:U (1:3) 30% (— čisti DES, — uzorak enzima nakon šaržne ekstrakcije s DES pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,8 g/mL, — uzorak enzima nakon šaržne ekstrakcije s DES pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,9 g/mL)



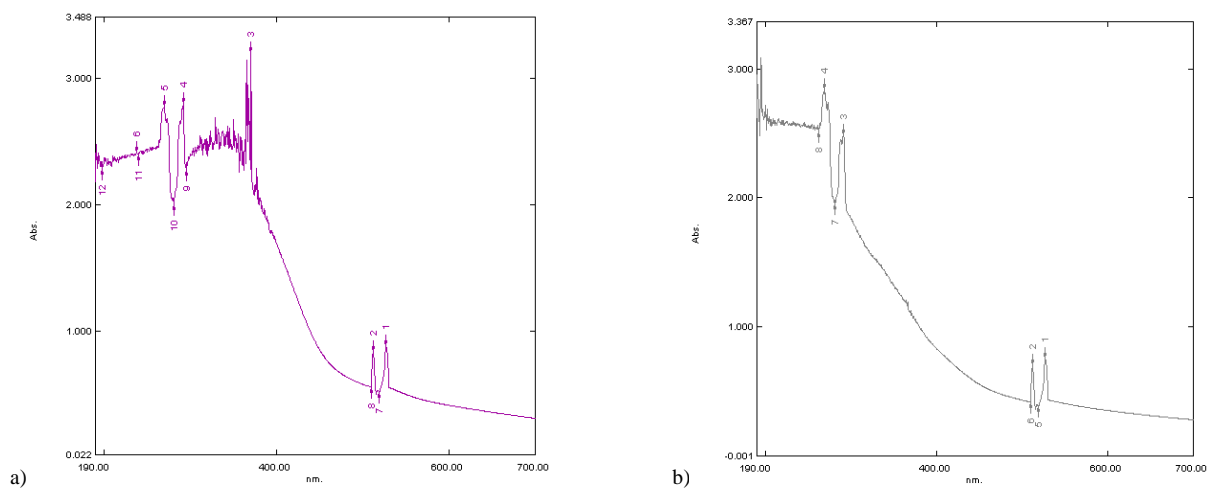
Slika 10. Rezultati FTIR analize za DES ChCl:PG (1:4) (— čisti ChCl:PG, — uзорak enzima nakon šaržne ekstrakcije s DES pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,6 g/mL, — uзорak enzima nakon šaržne ekstrakcije s DES pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,7 g/mL, — uзорak enzima nakon šaržne ekstrakcije s DES pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,8 g/mL, — uзорak enzima nakon šaržne ekstrakcije s DES pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,9 g/mL)

Kao što je vidljivo iz spektara, u svim ispitivanim uzorcima došlo je do povećanja intenziteta nekih vrpca. Za početak, može se uočiti široka vrpca istezanja skupina -OH koja se nalazi u području 3500-3005 cm^{-1} . Također, u području 3000-2800 cm^{-1} prisutne su istezne vibracije skupina -CH. Nakon toga slijedi karakteristična vrpca za istezanje karbonilne skupine C=O koja se javlja u području 1849-1600 cm^{-1} . U području od 750 do 1500 cm^{-1} prisutan je veliki broj vrpca u kojima je uočeno povećanje intenziteta. Te vrpce odgovaraju C-O i C-C vezama koje su karakteristične za ugljikohidrate pa možemo zaključiti da je povećanje intenziteta ovih vrpca uzrokovano ekstrakcijom zaostalih šećera iz podloge. Ekstrakcija šećera iz podloge također može biti jedan od razloga smanjene učinkovitost ekstrakcije proteina.

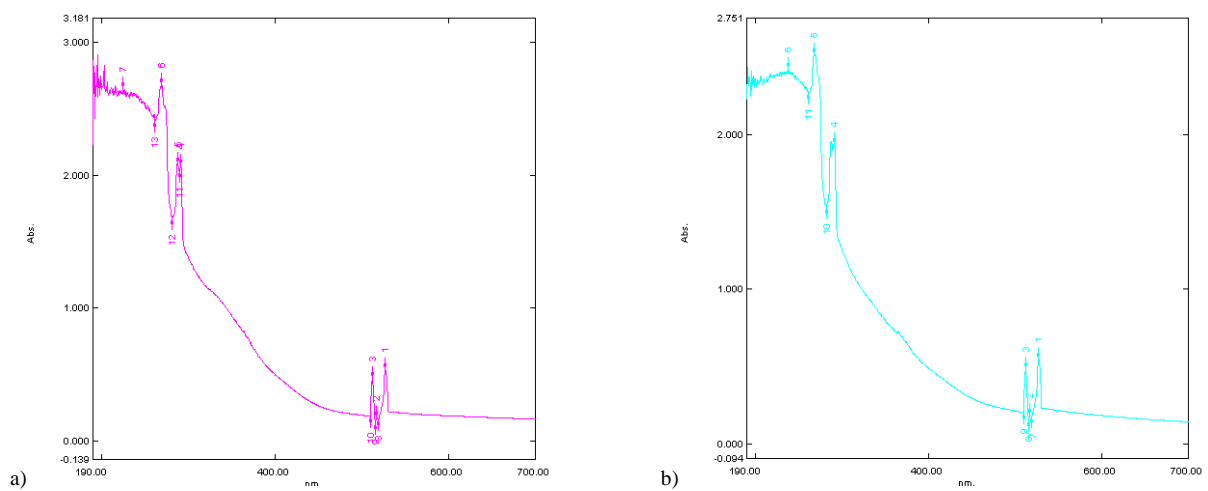
Na samom kraju ispitan je utjecaj DES-a na sekundarnu strukturu enzima. Pritom je korištena UV/VIS spektrofotometrija te su uspoređeni spektri sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze sa spektrima enzima ksilanaze nakon ekstrakcije različitim DES-ovima. Ovi spektri prikazani su na Slikama 11.-14.



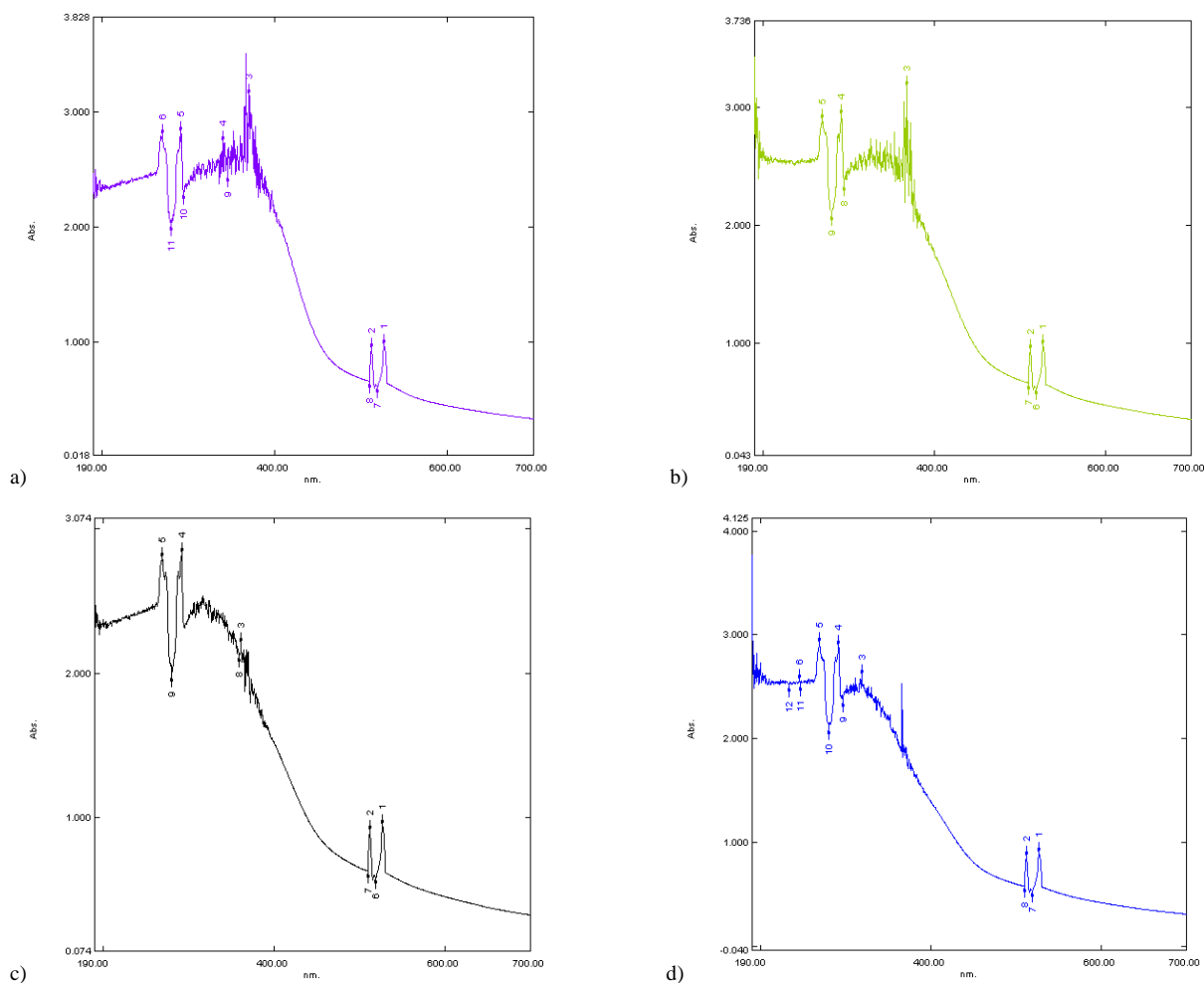
Slika 11. Apsorpcijski spektar uzorka sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze na valnim duljinama u rasponu od 190 do 700 nm



Slika 12. Apsorpcijski spektar uzorka enzima nakon šaržne ekstrakcije DES-om B:U (1:3) 30 %: a) uzorak pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,8 g/mL, b) uzorak pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,9 g/mL



Slika 13. Apsorpcijski spektar uzorka enzima nakon šaržne ekstrakcije DES-om B:U (1:3) 40 %: a) uzorak pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,8 g/mL, b) uzorak pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,9 g/mL



Slika 14. Apsorpcijski spektar uzorka enzima nakon šaržne ekstrakcije DES-om ChCl:PG (1:4): a) uzorak pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,6 g/mL, b) uzorak pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,7 g/mL, c) uzorak pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,8 g/mL, d) uzorak pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,9 g/mL

Kao što je vidljivo maksimumi apsorpcije nalaze se na istim valnim duljinama u svim uzorcima ($\lambda_{maks} = 370$ nm), što znači da nema promjena u konformaciji enzima *endo*-1,4-ksilanaze te se može zaključiti kako nije došlo do nastajanja kemijskih veza između molekula otapala i enzima tijekom procesa ekstrakcije [40].

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedeno je pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaze podrijetlom iz *Trametes versicolor* dobivenog fermentacijom na čvrstim nosačima repinih rezanaca. Pročišćavanje enzima *endo*-1,4-ksilanaza provedeno je eutektičkim otapalima, šaržnom ekstrakcijom s pet različitih DES-ova i u mikroekstraktoru s najučinkovitijim DES-om.

Najveća učinkovitost ekstrakcije u šaržnom ekstraktoru od 16,29 % postignuta je korištenjem DES-a betain:urea (1:3) s 30% vode pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,9 g/mL. Provedba ekstrakcije u mikroekstraktoru nije rezultirala povećanjem učinkovitosti procesa iz čega proizlazi da prijenos tvari nije bio dominantan procesni stupanj u provedbi ove ekstrakcije.

Provedbom FTIR analize ekstrahiranih uzoraka zaključeno je kako DES-ovi, uz proteine ekstrahiraju i šećere, odnosno ugljikohidrate koji su prisutni u sirovom ekstraktu enzima. Ovo ujedno može biti i razlog manje učinkovitosti ekstrakcije proteina iz sirovog uzorka. Iako je učinkovitost ekstrakcije bila niska, UV/VIS spektrofotometrijskom analizom potvrđeno je kako ne dolazi do strukturalne promjene enzima ksilanaze što ovu metodu, uz dodatnu optimizaciju, čini pogodnom za ekstrakciju proteina iz sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaza.

6. LITERATURA

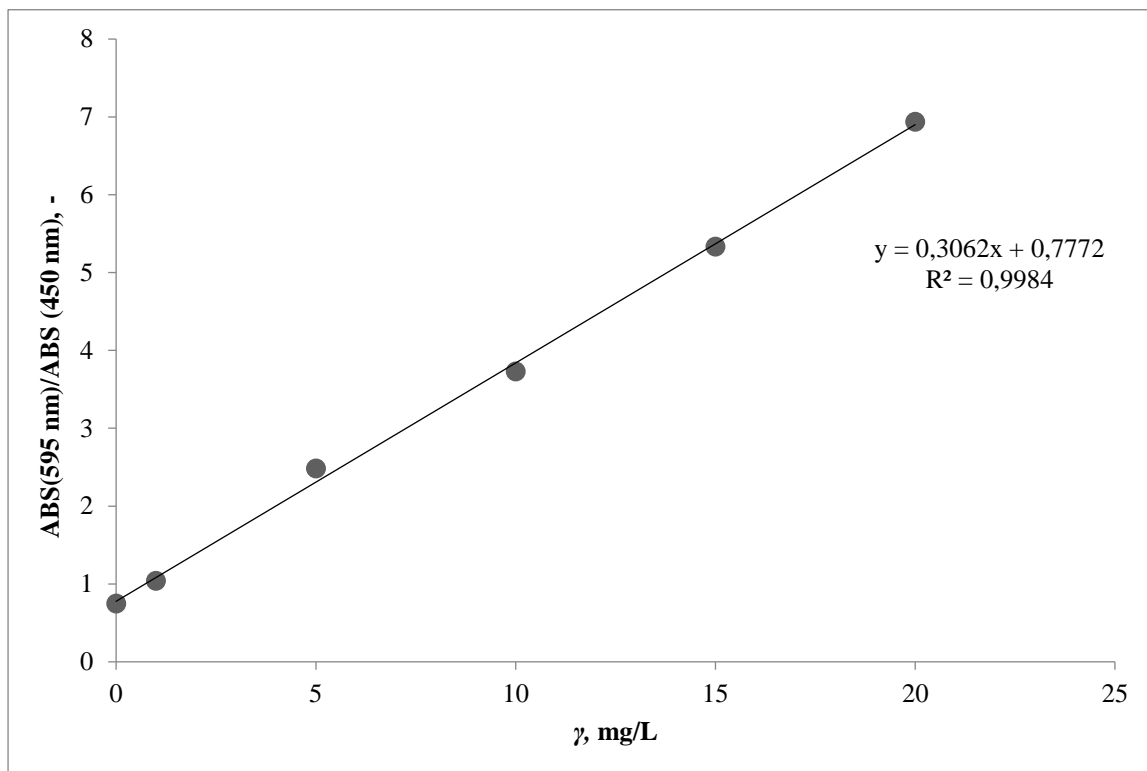
- [1] Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., Microbial xylanases and their industrial applications: A review, *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (2001) 326-338.
- [2] Bajpai, P., Purification of Xylanases, u *Xylanolytic Enzymes*. Elsevier Inc., Nizozemska, 2017, pp 53-61.
- [3] Šalić, A., Jurinjak Tušek, A., Gojun, M., Zelić, B., Biodiesel purification in microextractors: Choline chloride based deep eutectic solvents vs water, *Separation and Purification Technology* 242 (2020) 116783.
- [4] Socas-Rodríguez, B., Santana-Mayor, Á., Herrera-Herrera, A.V., Rodríguez-Delgado, M. Á., Deep eutectic solvents, u Asiri, A. M., Kanchi, S., (ur.), *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Ionic Liquids as Green Solvents*. Elsevier Inc., Amsterdam, 2019, pp 123-177.
- [5] Bugg, T. D. H., From Jack Beans to Designer Genes, u *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2012, pp 1-6.
- [6] Palmer, T., Bonner, P., An Introduction to Enzymes, u *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry. 2*, Woodhead Publishing, Sawston, 2007, pp 2-13.
- [7] Copeland, R., Wiley, J., A Brief History of Enzymology, u *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. 7*, John Wiley & Sons, New York, 2000, pp 1-10.
- [8] Aehle, W., Introduction, u *Enzymes in Industry Production and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2004, pp 1-12.
- [9] Knight, S. G., Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry Review, *AIBS Bulletin* 12 (1962) 39.
- [10] Collins, T., Gerday, C., Feller, G., Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiology Reviews* 29 (2005) 3-23.
- [11] Basit, A., Jiang, W., Rahim, K., Xylanase and Its Industrial Applications, u Peixoto Basso, T., (ur.), *Biotechnological Applications of Biomass. 32*, IntechOpen, London, 2020, pp 137-144.
- [12] Bhardwaj, N., Kumar, B., Verma, P., A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective, *Bioresources and Bioprocessing* 6 (2019) 40.
- [13] URL: <http://www.cazy.org/> (pristup 19.8.2021.)

- [14] URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristup 19.8.2021.)
- [15] Krishna, C., Solid-state fermentation systems: An overview, *Critical Reviews in Biotechnology* 25 (2005) 1-30.
- [16] Pandey, A., Solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal* 13 (2003) 81-84.
- [17] Bhargav, S., Panda, B. P., Ali, M., Javed, S., Solid-state fermentation: An overview, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 22 (2008) 49-70.
- [18] Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, W., Mishra, K., Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview, u Gupta, V. K., Pandey, A., (ur.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*. Elsevier Inc., Nizozemska, 2019, pp 345-354.
- [19] Manan, M. A., Webb, C., Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing, *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering* 4 (2017) 511-532.
- [20] Mitchell, D. A., de Lima Luz, L. F., Krieger, N., Federal, U., Berovič, M., Bioreactors for Solid-State Fermentation, u Moo-Young, M., (ur.), *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier Inc., Nizozemska, 2011, pp 347-360.
- [21] Novak, P., Havliček, V., Protein Extraction and Precipitation u Ciborowski, P., Silberring, J., (ur.), *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads*. Elsevier Inc., Nizozemska, 2016, pp 52-62.
- [22] Masoodi, K. Z., Lone, S. M., Rasool, R. S., Ion-exchange chromatography, u *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology*. Elsevier Inc., Nizozemska, 2021, pp 151–154.
- [23] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., Stryer, L., Exploring proteins and proteomes, u *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 2019, pp 350-355.
- [24] Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., Shahi, V. K., Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview, *Advances in Colloid and Interface Science*, 145 (2009) 1–22.
- [25] Sokač, T., Gojun, M., Jurinjak Tušek, A., Šalić, A., Zelić, B., Purification of biodiesel produced by lipase catalysed transesterification by ultrafiltration: Selection of membranes and analysis of membrane blocking mechanisms, *Renewable Energy*, 159 (2020) 642–651.

- [26] McQueen, L., Lai, D., Ionic liquid aqueous two-phase systems from a pharmaceutical perspective, *Frontiers in Chemistry* 7 (2019) 135.
- [27] Benavides, J., Rito-Palomares, M., Asenjo, J. A., Aqueous Two-Phase Systems, Moo-Young, M., (ur.), u *Comprehensive Biotechnology*. 2, Elsevier Inc., Nizozemska, 2011, pp 697-713.
- [28] Zeng, Q., Wang, Y., Li, N., Huang, X., Ding, X., Lin, X., Huang, S., Liu, X., Extraction of proteins with ionic liquid aqueous two-phase system based on guanidine ionic liquid, *Talanta* 116 (2013) 409-416.
- [29] Zhao, R., Pei, D., Yu, P., Wei, J., Wang, N., Di, D., Liu, Y., Aqueous two-phase systems based on deep eutectic solvents and their application in green separation processes, *Journal of Separation Science*, 43 (2020) 348–359.
- [30] De Oliviera Vigier, K., Jerome, F., Synthesis and Properties, u Ramon, D. J., i Guillena, G., (ur.), *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2019, pp 1-23.
- [31] Farooq, M. Q., Abbasi, N. M., Anderson, J. L., Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 1633 (2020) 461613.
- [32] Dimian, A. C., Bildea, C. S., Kiss, A. A., Process Intensification, u *Computer Aided Chemical Engineering*. 35, Elsevier Inc., Amsterdam, 2014, pp 397-448.
- [33] Ehrfeld, W., Hessel, V., Löwe, H., Microseparation Systems and Specific Analytical Modules for Microreactors, u *Microreactors New Technology for Modern Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2020, pp 115-142.
- [34] Ernst, O., Zor, T., Linearization of the Bradford protein assay, *Journal of Visualized Experiments* 38 (2010) 1-7.
- [35] Ljubić, A., Razvoj vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnih otapala za kontinuiranu ekstrakciju proteina u mikroekstratoru, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, diplomski rad, 2021
- [36] Petračić, A., Sander, A., Magić, L., Separation of free glycerol and glycerides from biodiesel by means of liquid-liquid extraction, *Science Journal of Energy Engineering* 5 (2017) 87-94.
- [37] Li, N., Wang, Y., Xu, K., Huang, Y., Wen, Q., Ding, X., Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein, *Talanta* 152 (2016) 23-32.

- [38] Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M. A. B., Hussain, H. I., Ahmed, S., Yuan, Z., Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biological Procedures Online*, 18 (2016) 18.
- [39] Xu, P., Zheng, G. W., Zong, M. H., Li, N., Lou, W. Y., Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis, *Bioresources and Bioprocessing* 4 (2017) 34.
- [40] Zeng, Q., Wang, Y., Huang, Y., Ding, X., Chen, J., Xu, K., Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning, *Analyst* 139 (2004) 2565–2573.

7. PRILOZI



Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina

