

Praćenje stabilnosti enzima putem mjerenja raspodjele veličine proteina

Arambašić, Barbara

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:149:486322>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Arambašić

PRAĆENJE STABILNOSTI ENZIMA PUTEM RASPODJELE VELIČINA PROTEINA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac
doc. dr. sc. Miroslav Jerković

Zagreb, rujan 2022.

SAŽETAK

N-acetilneuraminska kiselina (Neu5Ac) je sijalična kiselina čiju sintezu katalizira enzim N-acetilneuraminat sintaza. N-acetilmanozamin (MaNAc) kondenzacijom s fosfoenolpiruvatom (PEP) daje N-acetilneuraminsku kiselinu (Neu5Ac). Za potrebe ovog rada enzim je pripremljen i pročišćen.

Prekomjerna ekspresija proteina *neuB*, koji kodira N-acetilneuraminat sintazu, postignuta je ubacivanjem plazmida u genetski modificirane stanice *Escherichia coli*. Bakterijske stanice razbijene su ultrazvukom i pročišćene centrifugiranjem. Dobiveni enzim pročišćen je u koloni s niklom i nitrilotriocetnom kiselinom i skladišten u odgovarajućem puferu na 4°C.

Stabilnost enzima sintaze N-acetilneuraminske kiseline (NeuS) je praćena preko specifične aktivnosti, raspodjele veličina čestica i koncentracije proteina.

Ključne riječi: N-acetilneuraminska kiselina, N-acetilmanozamin, fosfoenolpiruvat, N-acetilneuraminat sintaza, *neuB*

ABSTRACT

N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) is a sialic acid whose synthesis is catalyzed by the enzyme N-acetylneuramine synthase. N-acetylmannosamine (MaNAc) by condensation with phosphoenolpyruvate (PEP) gives N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac). For the purposes of this work the enzyme was prepared and purified.

Overexpression of the protein *neuB*, which encodes N-acetylneuramine synthase, was achieved by inserting the plasmid into genetically modified *Escherichia coli* cells. Bacterial cells were disrupted by ultrasound and purified by centrifugation. The resulting enzyme was purified in a column with nickel and nitrilotriacetic acid and stored in the appropriate buffer at 4°C.

The stability of N-acetylneuraminic acid synthase (NeuS) enzyme was monitored through specific activity, particle size distribution and protein concentration.

Key words: N-acetylneuraminic acid, N-acetylmannosamine, phosphoenolpyruvate, N-acetylneuraminic acid synthase, *neuB*



This work has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 956631

Sadržaj

1.UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Enzimi	2
2.1.1. Struktura enzima	3
2.1.2. Podjela enzima	4
2.1.3. Stabilnost enzima	5
2.1.4. Aktivnost enzima.....	5
2.1.5. Primjena enzima u industriji	6
2.2. Sijalične kiseline	7
2.3. N-acetilneuraminat sintaza	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Aparatura.....	10
3.1.1 Inkubator.....	10
3.1.2 Centrifuga	10
3.1.3 Ultrazvuk	11
3.1.4. Ni-NTA kolona	11
3.1.5. Spektrofotometar	12
3.1.6. Zetasizer.....	12
3.1.7. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)	13
3.2. Priprema i pročišćivanje proteina	13
3.2.1. Priprema proteina	13
3.2.2. Pročišćivanje proteina	14
3.3. Analitičke metode.....	16
3.3.1. Praćenje koncentracije proteina	16

3.3.2. Određivanje koncentracije analita kapljevinskom kromatografijom visokog učinka ..	16
3.3.3. Mjerenje specifične aktivnosti enzima	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Elektroforeza	19
4.2. Praćenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	20
4.3. Praćenje specifične aktivnosti enzima sintaze N-acetilneuraminske kiseline.....	21
4.4. Praćenje stabilnosti enzima putem određivanja veličine čestica	22
5. ZAKLJUČAK	26
6. POPIS SIMBOLA	27
7. LITERATURA	28
8. PRILOZI	30

1.UVOD

Biokataliza uz pomoć enzima omogućuje sve oblike života, od najmanjih mikroorganizama do ljudskog bića. Sve veće prihvaćanje biokatalize od strane farmaceutske i kemijske industrije dovelo je otkrića inovativnih alata koji omogućuju veću aktivnost i selektivnost katalizatora. Kao rezultat toga sada se mogu zadovoljiti strogi reakcijski uvjeti u malom vremenskom rasponu. U današnje vrijeme veliki broj industrijskih procesa koriste biokatalizu za proizvodnju vrijednih finih kemikalija, kao što su optički aktivni lijekovi i sredstva za zaštitu bilja. Biološka priroda enzima čini ih manje opasnim za zdravlje i manje toksičnim za okoliš, a upravo takva svojstva privlače industriju hrane i pića. [1]

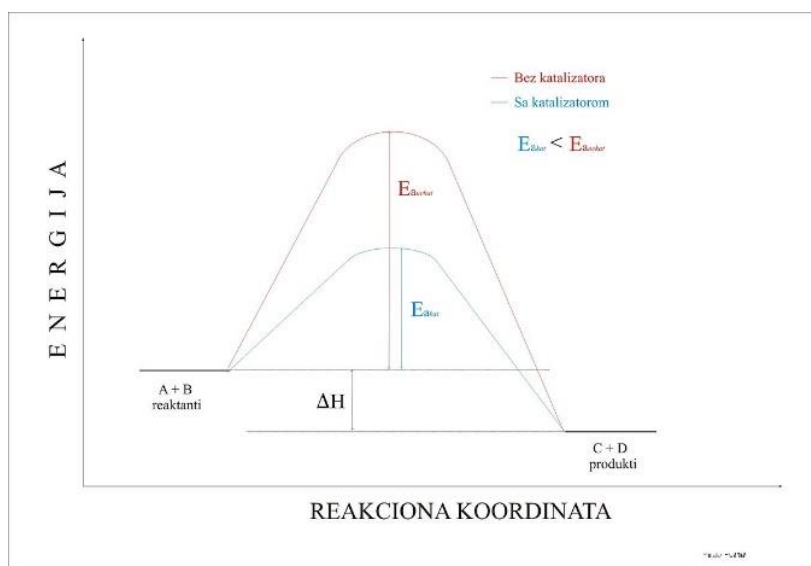
Enzimi kataliziraju širok raspon kemijskih reakcija, općenito pod vrlo blagim reakcijskim uvjetima. Enzimi kao katalizatori u organskoj kemiji i biotehnologiji su bili ograničeni zbog nedovoljne stereoselektivnosti, slabe regioselektivnosti, uskog opsega supstrata i nedovoljne stabilnosti. Danas se većina navedenih ograničenja može riješiti primjenom proteinskog inženjeringa. Proteinsko inženjerstvo je područje rada koji zahtjeva puno vremena i resursa, stoga se i dalje radi na stvaranju novih katalizatora i na proširenju znanja o mehanizmima katalize. [2]

Zahvaljujući modernoj tehnologiji otkriveni su brojni novi enzimi iz raznih izvora. Međutim u većini slučajeva ti enzimi nisu optimizirani za praktične primjene u industriji zbog razlike u staničnom okolišu i industrijskom okruženju. [2]

2. OPĆI DIO

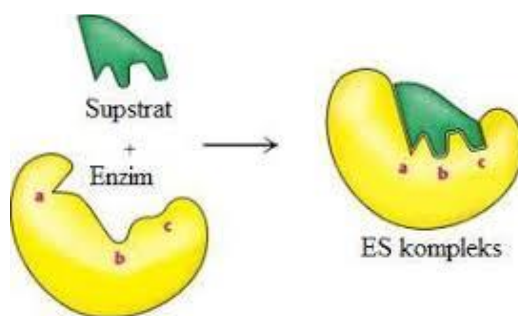
2.1. Enzimi

Enzimi su homogeni biološki katalizatori. Enzimi imaju sposobnost specifičnog vezanja različitih molekula i smanjuju energiju aktivacije (slika 2.1.). Gotovo svi enzimi su građeni od proteina ili nukleinskih kiselina. [3]



Slika 2.1. Mehanizam katalize

Enzimi ne mijenjaju položaj ravnoteže u reakciji, ubrzavaju reakciju u oba smjera i olakšavaju nastajanje prijelaznog stanja. Sadrže aktivno mjesto gdje se veže supstrat koji zauzima samo mali dio enzima i po svome obliku odgovara supstratu. Prvi korak enzimske katalize je nastanak kompleksa enzim-supstrat, što prikazuje slika 2.2. Supstrati se na aktivno mjesto vežu mnogobrojnim slabim interakcijama. [3]



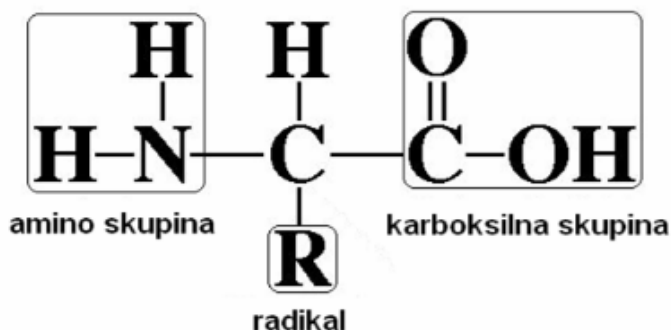
Slika 2.2. Nastajanje kompleksa enzim-supstrat

Emil Fisher je predložio teoriju prema kojoj se supstrat ponaša poput ključa koji se uklapa u aktivno mjesto koje predstavlja enzim. Slika brave i ključa objašnjava specifičnost supstrata, ali ne i njegovu aktivnost. Kao dodatno objašnjenje Daniel E. Koshland je postavio teoriju induciranog uklapanja u kojem su enzim i supstrat modificirani zajedno nakon vezanja [4].

Enzimi su osjetljivi na uvjete u kojima se reakcija odvija, gube aktivnost u uvjetima ekstremnih temperatura, pH i ionske jakosti. Bitno je reći da su enzimi skloni inhibiciji. Mnogi lijekovi funkcioniraju kao inhibitori enzima. Inhibitor je tvar koja stupa u interakciju s enzimom smanjujući njegovu aktivnost. Kompetitivni inhibitor utječe na prvi korak katalize, odnosno na vezanje supstrata za aktivno mjesto. Nekompetitivni inhibitor utječe na drugi korak katalize koji uključuje kemijsku pretvorbu vezanog supstrata. Inhibicija može biti reverzibilna ili ireverzibilna. Najjednostavniji oblik reverzibilne inhibicije je kompetitivna inhibicija. [4,6]

2.1.1. Struktura enzima

Osnovne građevne jedinice proteina su aminokiseline. Proteini su sastavljeni od 20 esencijalnih α -aminokiseline. Sastoje se od asimetričnog α -C-atoma na koji su vezane amino-skupina, karboksilna skupina te H i R ogranak (slika 2.3.). Svaki protein ima vlastiti sastav aminokiselina, odnosno specifične udjele različitih aminokiselina. Međutim redoslijed aminokiselina određuje oblik i funkciju proteina. Proteini se kreću od 50 do nekoliko tisuća aminokiselina. [4]



Slika 2.3. Građa proteina

Aminokiseline koje grade proteine su vezane peptidnom vezom. Peptidna veza nastaje povezivanjem $\alpha\text{-COO}^-$ skupine jedne aminokiseline s $\alpha\text{-NH}_3^+$ skupinom druge aminokiseline uz eliminaciju H_2O . Peptidna veza je planarna, nema slobodne rotacije jer ima svojstva dvostruke veze, međutim dvije susjedne peptidne jedinice mogu rotirati zbog jednostruke veze između $\alpha\text{-C}$ -atoma i dušikova atoma te $\alpha\text{-C}$ -atoma i karbonilnog ugljikova atoma. [4]

Primarna struktura proteina je najosnovnija razina i odnosi se na niz kovalentno vezanih aminokiselina u polipeptidnom lancu. Kovalentne veze su peptidne, bitne su za određivanje evolucijskog podrijetla. Sekundarna struktura odnosi se na prostorni raspored okosnice polipeptidnog lanca, predstavlja prostorni odnos aminokiselinskih ostataka. Primjeri sekundarne strukture su α -uzvojnica i β -nabrana ploča. Tercijarna struktura određuje prostorni oblik, odnosi se na trodimenzionalno savijanje cijelog polipeptidnog lanca. Nastaje interakcijama između prostorno približenih aminokiselina. Kvarterna struktura, najsloženija je razina, imaju je samo proteini izgrađeni od dva ili više polipeptidnih lanaca. Odnosi se na način na koji su lanci zajedno pakovani. [3]

2.1.2. Podjela enzima

Enzimi sa sličnim specifičnim reakcijama se najčešće dijele u 6 skupina to su:

1. Oksidoreduktaze koje kataliziraju prijenos redukcijskih ekvivalenata iz jednog redoks sustava u drugi.
2. Transferaze kataliziraju prijenos skupine iz jedne u drugu molekulu.
3. Hidrolaze kataliziraju reakcije hidrolize.
4. Liaze kataliziraju reakcije koje uključuje cijepanje ili stvaranje kemijskih veza, gdje dvostruke veze nastaju ili nestaju.
5. Izomeraze kataliziraju reakcije izmjene grupa unutar molekule.
6. Ligaze kataliziraju reakcije kovalentnog povezivanja dvaju molekula.

Hidrolaze imaju najveće tehnološko značenje. Razlog je u tome da ti enzimi mogu djelovati kao biokatalizatori budući da su robusni, jednostavni i ne zahtijevaju koenzim. Njihova je proizvodnja prilično jednostavna, troškovi obrade niski i dobro rade u teškim uvjetima. [6,17]

2.1.3. Stabilnost enzima

Važno svojstvo enzima je stabilnost, koja je definirana kao sposobnost održavanja aktivnosti u različitim uvjetima. Stabilniji enzimi se mogu dobiti na više načina kao što su proteinsko inženjerstvo, uporaba stabilizirajućih aditiva ili imobilizacija. Stabilnost nije važna samo tijekom primjene enzima već tijekom cijelog životnog ciklusa što obuhvaća skladištenje i proizvodnju enzima.[5]

Inaktivacija enzima se događa u dva koraka. Prvi korak predstavlja reverzibilno odvajanje izvornog enzima, a drugi dovodi do agregacije ili kovalentnih promjena u enzimu. Poznato je da temperatura, pH, ionska jakost ili kemijski reagensi potiču promjene u prostornoj konfiguraciji i aktivnosti enzima. Nakon inaktivacije najčešće slijede reakcije kao što su denaturacija sekundarnih i tercijarnih struktura, agregacija ili kemijska razgradnja. Enzimi koji imaju više polipeptidnih lanaca su prirodno stabilniji od jednostavnih monomernih enzima. [12]

Imobilizacija na krute nosače je jedna od najčešće korištenih metoda za poboljšavanje stabilnosti enzima, bolju kontrolu rada ili lakši opravak proizvoda. Toplinska stabilnost proizlazi iz molekularne krutosti koja se uvodi pričvršćivanjem na krutu podlogu i stvaranjem zaštićenog mikrookruženja. Mikrookoliš pruža optimalne reakcijske uvjete pH, temperature i ionske jakosti za imobilizirani enzim što omogućuje povećanje aktivnosti i stabilnosti. Postoje četiri glavne metode imobilizacije a to su: adsorpcija, kovalentno vezanje, hvatanje i ograničenje membrane. Za toplinsku stabilizaciju najučinkovitije je kovalentno vezanje. Neki od nedostataka imobilizacije su problemi s difuzijom i gubici aktivnosti zbog teških uvijete koji se koriste tijekom provođenja imobilizacije. [12]

2.1.4. Aktivnost enzima

Katalitička aktivnost enzima mjeri se određivanjem povećanja brzine reakcije pod definiranim uvjetima. Temperatura ima velik utjecaj ne samo na stabilnost enzima već i na aktivnost. Povećanjem temperature povećava se brzina reakcije koja se katalizira, no istovremeno povećava se i brzina kojom se enzim inaktivira. Još jedna varijabla koja dosta utječe na aktivnost enzima jest pH. pH utječe na međumolekulske sile i mijenja oblik proteina sve do točke u kojoj postane neaktivan. Direktna mutageneza predstavlja najučinkovitiju metodu za povećanje aktivnosti enzima. [6,17]

2.1.5. Primjena enzima u industriji

Jedan od najvećih problema korištenja enzima u industriji je bio dobivanje većih količina enzima potrebnih za praktičnu primjenu. Tradicionalno su enzimi bili izolirani iz svojih izvora, koji su najčešće bili biljke, gljive ili neke vrste sisavaca. Krajem 70-tih godina prošlog stoljeća razvila se metoda rekombinacije DNA. Prema razvijenoj metodi određeni enzim koji se javlja u jednom organizmu može biti prekomjerno izražen u drugom domaćinu. Na taj su način velike količine enzima postale dostupne. *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* su tipični primjeri organizma domaćina. [10]

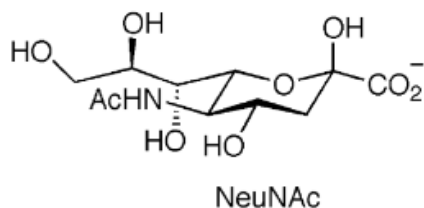
Iznimno visoka specifičnost i aktivnost enzima su istaknute karakteristike koje se sve više cijene u različitim proizvodnim sektorima, među kojima se ističu farmaceutska i kemijska industrija. U proteklih nekoliko desetljeća uloženi su veliki naponi da se poboljša učinkovitost enzima kako bi bili što prikladniji za industrijsku primjenu. Danas jedan od glavnih izazova primjene enzima je njihova osjetljivost na ekstremne uvjete kao što su visoke temperature, kiseli ili lužnati uvjeti. Stoga se sve više radi na održavanju funkcije enzima stalnom u ekstremnim uvjetima. [9]

Kemijska industrija je jedan od najvećih onečišćivača stoga se nastoji približiti održivoj i ekološki prihvatljivoj budućnosti. Pri prelasku na ekološki prihvatljivije metode velik potencijal predstavljaju enzimi. Prednost enzima je mogućnost oporavka i ponovnu obradu enzima kao katalizatora čime se smanjuje količina otpada. [6,9]

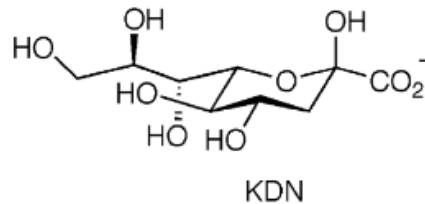
Enzimi se sve više koriste za biološku obradu otpada. Obrada se temelji na aerobnim i anaerobnim procesima gdje se mikroorganizmi dovode do degradacije. Enzimi se koriste za uklanjanje specifičnih kemikalija iz složenog industrijskog otpada ili razrijeđenih industrijskih otpadnih voda gdje uklanjaju netopljive onečišćivače. [6]

2.2. Sijalične kiseline

N-acetilneuraminska kiselina je sijalična kiselina koja se nalazi u stanicama ljudi i mnogih sisavaca. Sijalične kiseline se sastoje od devet ugljikovih atoma, većina su derivati temeljnih struktura N-acetilneuraminske kiseline (NeuNAc) koja je prikazana na slici 2.4. ili 2-keto-3-deoksi-D-glicero-D-galakto-nonulozonska kiselina (KDN) koja je prikazan na slici 2.5. [7]



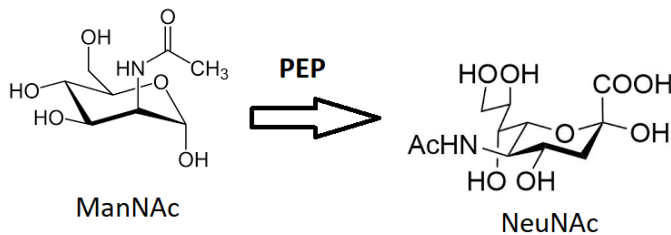
Slika 2.4. Struktura Neu5Ac



Slika 2.5. Struktura KDN-a

Kao rezultat negativnog naboja karboksilata uloga sijalične kiseline je važna za adhezijske procese, kao na primjer adhezija molekule koja je odgovorna za pravilnu uspostavu embrionalnog živčanog sustava kod kralježnjaka. Također je odgovorna za procese transporta i sijalilaciju. Sijalilacija je kovalentna adicija sijalične kiseline na terminalni kraj glikoproteina i povezana je s metastazama u određenim vrstama raka. Većina bakterija ne sintetizira sijaličnu kiselinu, no neki organizmi ih pak mogu sintetizirati radi oponašanja sustava, to su invazivni organizmi poput *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* i *Campylobacter*. [7]

Sinteza najpoznatije sijalične kiseline, N-acetilneuraminske kiseline, počinje stvaranjem N-acetilmanozamina (ManNAc) koji se kod sisavaca fosforilira da se dobije ManNAc 6-fosfat. Zatim slijedi kondenzacija ManNAc ili ManNAc-6P s fosfenolpiruvatom (PEP) kako bi se dobio Neu5Ac (slika 2.6.). [7]

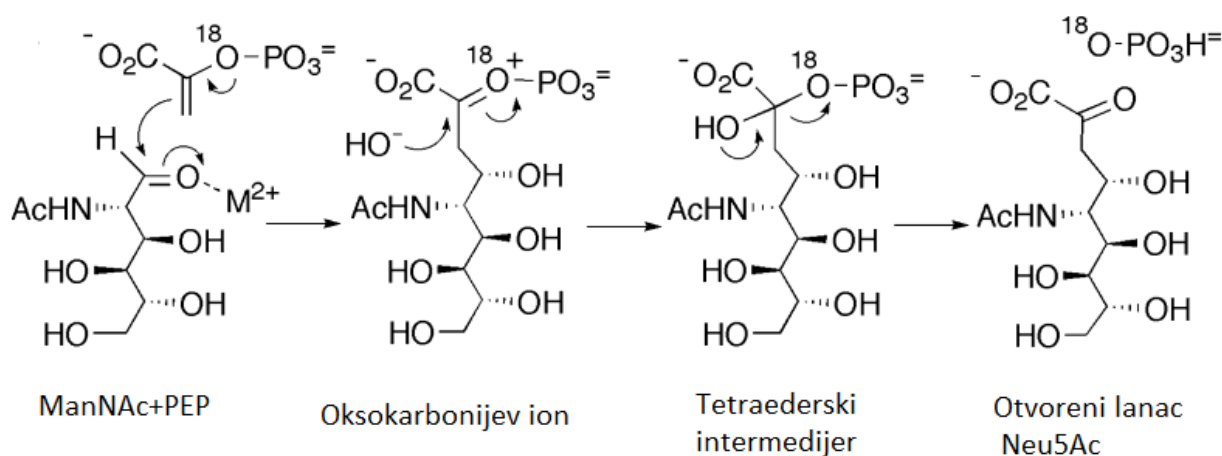


Slika 2.6. Nastajanje Neu5Ac-a

Sijalična kiselina je neophodna za razvoj mozga, spoznaju i pamćenje kod životinja, nedostatak enzima NeuS otežava sijalilaciju glikolipida i glikoproteina kod ljudi. Kada je potražnja za enzimom velika kapacitet za sintezu je ograničen. To je posebno izraženo u djetinjstvu kada organi, a posebno mozak ubrzano rastu. [7]

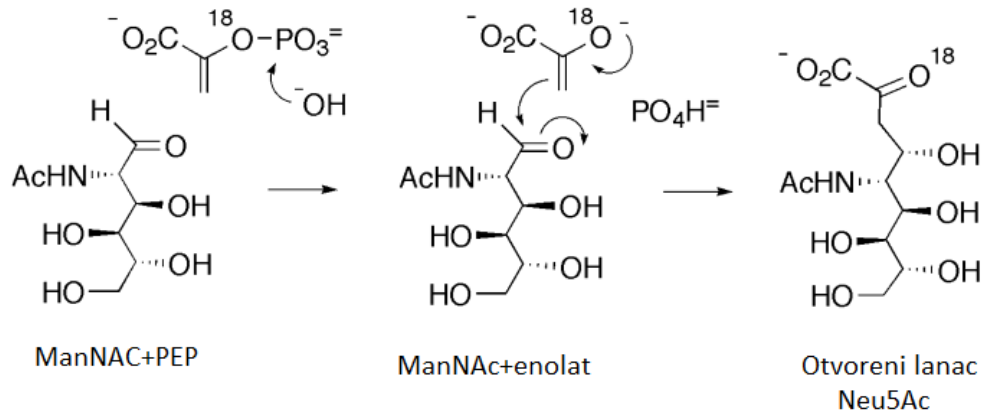
2.3. N-acetilneuraminat sintaza

Neisseria meningitidis proizvodi protein *neuB* koji kodira N-acetilneuraminat sintazu. N-acetilneuraminat sintaza pretvara fosfoenolpiruvat (PEP) i N-acetilmnozamin (ManNAc) u N-acetilneuraminsku kiselinu (Neu5Ac). Kako bi se opisalo djelovanje N-acetilneuraminat sintaze mogu se koristiti dva mehanizma. Prvi mehanizam uključuje napad C-3 PEP atoma na karbonilni ugljik ManNAc-a, tada se stvara oksokarbonijev ion koji napadnut vodom daje tetraederski intermedijer. Tetraedarski intermedijer izgubi fosfat i daje otvoreni lanac Neu5Ac-a (slika 2.7.).[7]



Slika 2.7. Jedan od dva moguća mehanizma djelovanja enzima N-acetilauraminat sintaza

U prikazanom mehanizmu dolazi do cijepanja C-O veza. Drugi mehanizam uključuje napad vode na fosfor u PEP-u da bi se dobio slobodni fosfat i enolat piruvata. Enolat bi mogao napasti karbonil ManNAc-a i stvorio bi se otvoreni lanac Neu5Ac-a (slika 2.8.). Ovaj mehanizam djeluje putem cijepanja P-O veza. [7]



Slika 2.8. Drugi mogući mehanizam djelovanja enzima N-acetilneuraminat sintaza

Ključni eksperimenti provedeni na enzimima 2-keto-3-deoksi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfat sintazi (DAH7PS) i 2-ket-3-deoksi-D-mano-oktulosonat-8-fosfat sintaza (KDO8PS), koji također koriste PEP kao supstrat, ukazuju da se koristi prvi mehanizam katalize, odnosno cijepanje C-O veza. [7]

U istraživanjima provedenim na N-acetilneuraminat sintazi uočena je važnost kofaktora za strukturu i katalitičku aktivnost *neuB*. Uočeno je da pročišćeni *neuB* stvara kristale samo u prisutnosti metalnog kofaktora, a najveći se kristali formiraju u prisutnosti Mn²⁺. Također se pokazalo da enzim ima najveću aktivnost pri pH 7.5 i temperaturi od 37°C. [8]

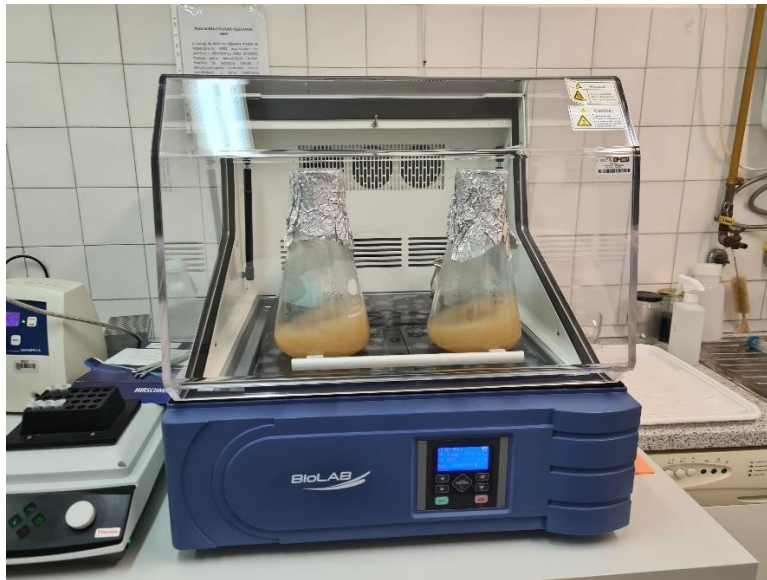
Istraživanja su pokazala da je struktura N-acetilneuraminat sintaze dobivena iz *Neisseria meningitidis* homodimer sa zamijenjenom domenom. Svaki monomer N-acetilneuraminat sintaze se sastoji od 359 aminokiselinskih ostataka podijeljenih u dvije različite domene. Dio koji spaja dvije domene smješten je od 274. do 284. ostatka. Prva domena je slična trioza-fosfat izomerazi (TIM-Triose-phosphate isomerase) s osam paralelnih β-niti koje se izmjenjuju duž okosnice peptida. Uz to prva domena ima dvije dodatne α-zavojnica koje tvore prošireno područje. Druga domena jedinstvena je za enzime čiji je supstrat PEP. Ova domena posebno je važna za vezanje supstrata, a pretpostavlja se da njezino brisanje rezultira gubitkom aktivnosti enzima. [13,16]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1 Inkubator

Za inkubaciju i miješanje starter kulture s medijem korišten je *Biolab* tresilica-inkubator koji je prikazan na slici 3.1.



Slika 3.1. Tresilica inkubator

3.1.2 Centrifuga

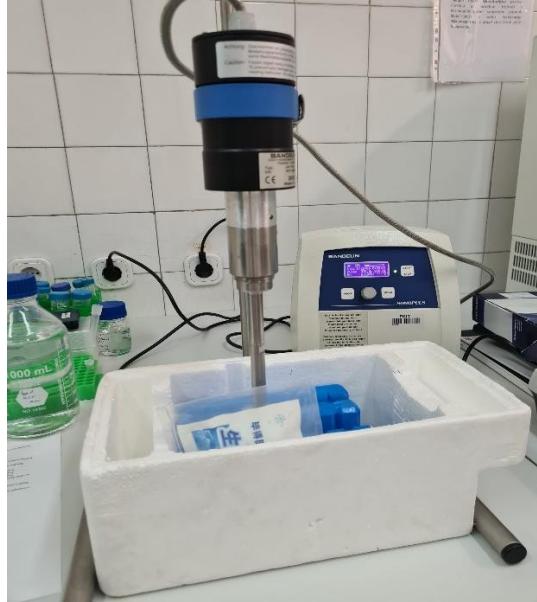
Centrifugiranje uzoraka provedeno je na *Hettich Universal 320 R* centrifugi, koja je prikazana na slici 3.2.



Slika 3.2. Centrifuga

3.1.3 Ultrazvuk

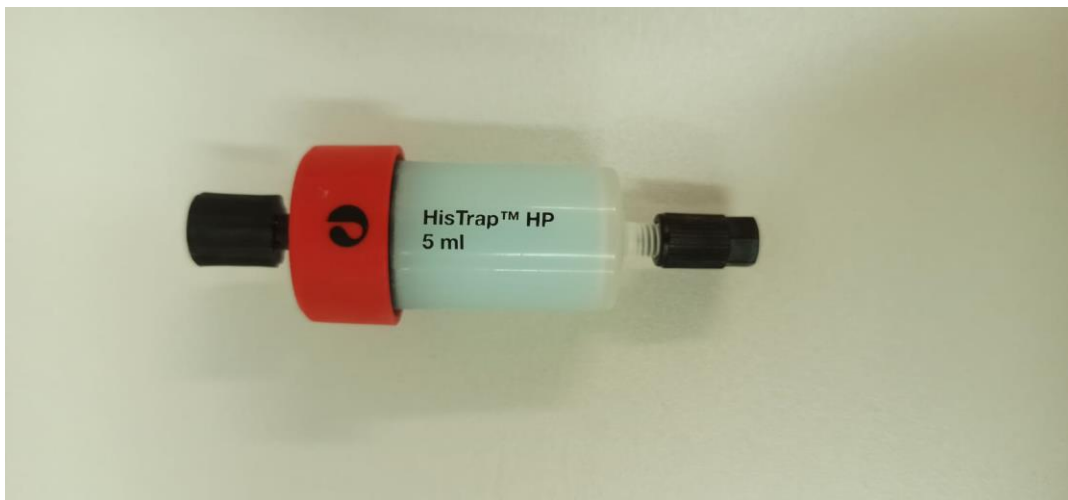
Za ekstrakciju proteina korišten je ultrazvuk *Bandelin Sonopuls HD 3100*, prikazan na slici 3.3.



Slika 3.3. Ultrazvuk

3.1.4. Ni-NTA kolona

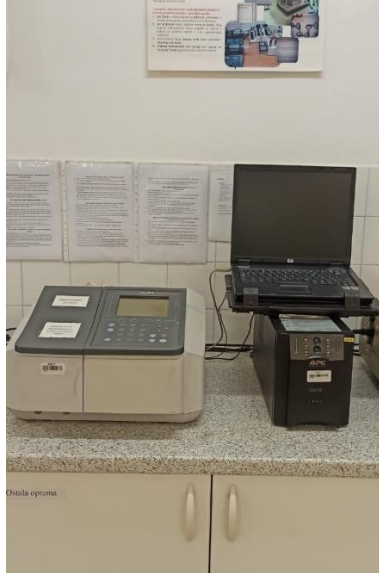
Pročišćivanje proteina vršili smo pomoću *Ni Sepharose excel HisTRap excel* kolone, prikazane na slici 3.4.



Slika 3.4. Kolona s niklom i nitrilotriocetnom kiselinom

3.1.5. Spektrofotometar

Za mjerenje koncentracije proteina koristili smo spektrofotometar UV 1800 240 V proizvođača *Shimadzu* prikazan na slici 3.5.



Slika 3.5. Spektrofotometar

3.1.6. Zetasizer

Za mjerenje veličina čestica proteina korišten je *Malvern Zetasizer ultra* koji je prikazan na slici 3.6.



Slika 3.6. Zetasizer

3.1.7. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracije analita određivane su na HPLC-u. Korišten je uređaj proizvođača *Shimadzu* modela *LC-40* koji je prikazan na slici 3.7. Korišten je foto-diodni detektor (PDA-Photodiode Array Detector) na valnoj duljini od 215 nm.



Slika 3.7. Kapljevinska kromatografija visokog učinka

3.2. Priprema i pročišćivanje proteina

3.2.1. Priprema proteina

Stanice *Escherichia coli* transformirane su genom *neuB* iz *Neisseria meningitidis*, koji kodira aktivnu N-acetilneuraminat sintazu. 5 μ L otopine glicerola dodano je u 10 mL Luria-Bertani (LB) medija koji sadrži ampicilin. Dobivena starter kultura inkubirana je pri 37°C i 180 okretaja u minuti preko noći. 4 mL te starter kulture dodano je u 400 mL Prozomix modificiranog tributil fosfat medija (TBp) koji sadrži ampicilin te je smjesa inkubirana pri 25°C i 280 okretaja u minuti tijekom 24 sata (slika 3.1.). Medij je prethodno steriliziran u autoklavu pod tlakom od 1 bar i temperaturi 120°C tijekom 20 minuta. Nakon kultivacije otopina je podijeljena u Falcon-epruvete od 50 mL koje su centrifugirane. Dobiveni peleti su resuspendirani u puferu A koji je odgovoran za ravnotežu u koloni koju smo koristili za čišćenje proteina. Resuspendirani peleti su inkubirani na ledu 30 minuta. Pufer A sastojao se od smjese 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (NaPi), 50 mM NaCl, 30 mM imidazola čiji je pH 7.4. Resuspendirane stanice su razbijene ultrazvukom (slika 3.3.). Kako se tijekom ultrazvučnog razbijanja stanica povećava temperatura u posudi, ono se provodi

na ledu tako da se 20 sekundi provodi, zatim 20 sekundi pauzira tijekom 20 minuta. Ostaci stanica su uklonjeni centrifugiranjem pri 14000 okretaja u minuti tijekom 30 min. Centrifugiranjem je na dnu dobiven ostatak koji se sastoji od odvojenih staničnih stijenki i većih dijelova, u gorenjem dijelu je dobiven lizat koji sadrži ciljani protein. Lizat je profiltriran kroz filtar veličine pora 0.45 μm kako bi se uklonili nepoželjne stanice i veće dijelove koji su možda zaostali.

3.2.2. Pročišćivanje proteina

Kolona s niklom i nitrilotriocetnom kiselinom (Ni-NTA) se koristi za afinitetno pročišćavanje His-označenih proteina. His-označeni proteini sadrže šest ili više histidinskih ostataka, koji nisu nabijeni, pa stoga ne utječu na strukturu ili funkciju proteina. Ni-NTA kolona je vrsta imobilizirane metalne afinitetne kromatografije (IMAC), koja se sastoji od smole napunjene ionima nikla ili kobalta. Podloga se sastoji od agaroze u zrcima, derivatizirane nitrilotriocetne kiseline i dvovalentnih iona nikla. Pročišćivanje se temelji na afinitetu histidinskih ostataka za imobilizirane metalne ione, u ovom slučaju Ni^{2+} ione. Metalni ion je imobiliziran na kromatografskoj matrici preko kelatnog liganda kojeg stvara nitrilotriocetna kiselina. [18]

Prvo su napravljene otopine pufera pomoću kojih se ispiru kolona. To su otopine pufera A i pufera B. Pufer B se sastoji od jednakih koncentracija NaPi i NaCl kao otopina pufera A te imidazola koncentracije 500 mM. Ciljani protein koji sadrži histidin stvara vezu s niklom koji je imobiliziran na agarozu. Imidazol zahvaljujući prstenu oponaša bočni lanac histidinskog ostatka, stoga su naš protein i imidazol u kompeticijskom odnosu. Ciljani protein se bolje veže sa niklom od imidazola, jer ima veću koncentraciju histidina. Najprije je kolona isprana ultračistom vodom (UČV) (15 mL) i uravnotežena s otopinom pufera A. Nakon toga u kolonu je dodan lizat s ciljanim proteinom koji se vezao za nikal. Zatim je kolona isprana puferom A koncentracije imidazola 100 mM, zatim 200 mM, zatim 400 mM i naposljetku s otopinom pufera B koja sadrži 500 mM imidazola. Tijekom ispiranja kolone sakupljane su frakcije od 1 mL otopine koja je protekla iz kolone. Kada je završeno ispiranje kolona je isprana s 10 mL ultračiste vode (UČV) i nakon toga je napunjena s 20% etanolom i skladištena pri 4°C.

Ispiranjem kolone uklonjeni su nevezani proteini iz lizata i ostao je samo pročišćen ciljani protein. Povećanjem koncentracije imidazola s vremenom imidazol se bolje vezao za nikal, a ciljani protein se odvojio i isprao zajedno s otopinom.

Dobivene frakcije ispiranjem kroz Ni-NTA kolonu su spojene i razrijeđene na 50 mL dodavanjem 50 mM NaPi pH 7.4. Zatim su spojene frakcije koncentrirane pomoću centrifugalne ultrafiltracijske epruvete. Spojene frakcije su analizirane elektroforezom kako bi se utvrdila uspješnost pročišćavanja.

SDS-PAGE je vrsta elektroforeze u poliakrilamidnom gelu, koja razdvaja mješavine proteina na temelju različite molekulske mase. SDS (sodium dodecyl sulfate) predstavlja natrijev dodecilsulfat koji denaturira protein te uklanja sekundarne, tercijarne i kvartarne strukture proteina. Razdvajanje se temelji na razlici u brzini putovanja molekula različite veličine pod djelovanjem istosmjerne struje. [11]

Za elektroforezu su najprije pripremljene otopine za gelove. Pripremljen je 1,5 M tris pufer pH 8,8 i 0.5 M tris pufer pH 6,8. Također je pripremljena 30%-tna otopina akrilamida koja polimerizira i stvara matricu i 10% otopina amonijeva peroksidisulfata (APS) koja inducira polimerizaciju. Za pripremu gela za odvajanje je dodano 3.35 mL vode, 2.5 mL 1.5 M tris pufera pH 8,8, 4 mL 30%-tne otopine akrilamida, 0.1 mL SDS-a, 0.05 mL 10%-tne otopine APS-a i 0.005 mL TEMED-a. Za pripremu gela za slaganje pomiješano je 3.05 mL vode, 1.25 mL 0.5 M tris pufera pH 6,8, 0.66 mL 30%-tne otopine akrilamida, 0.1 mL SDS-a, 0.05 mL 10%-tne otopine APS-a i 0.005 mL TEMED-a. Pufer za uzorak se sastoji od 0.5 M tris pufera pH 6,8, 10% otopine SDS-a, 10% otopine bromfenolplavo, glicerola i vode.

Nakon što je spojena aparatura i vrhovi stakla stegnuti stezaljkama otopina gela za odvajanje je pomoću pipete dodana između stakalca do oznake. Da se spriječi stvaranje mjehurića iznad gela za odvajanje, dodan je izopropanol. Nakon što je gel polimerizirao uklonjen je sloj izopropanola te je dodan sloj gela za slaganje i češljici te je gel ostavljen da polimerizira. Nakon što je gel polimerizirao, u aparaturu je dodan pufer za elektroforezu. Zatim je pomiješano 950 μ L pufera za uzorak i 50 μ L β -merkaptetanola, miješanje se provelo u digestoru. U Eppendorf epruvetama pomiješano je 100 μ L uzorka proteina i 100 μ L pufera za uzorak s β -merkaptetanolom te je smjesa potom centrifugirana. Potom je u svaku ražicu koja se stvorila češljicima stavljen uzorak proteina, dok je prva ražica je napunjena s markerom. Aparatura je ostavljena priključena na izvor struje sve dok se crta s uzorcima nije spustila do dna i prestala kretati. Pripremljena je otopina za bojanje miješanjem 50 mL metanola, 7 mL 10% octene kiseline,

43 mL vode i dodano je 0.1 g Coomassie Brilliant blue boje. Dobiveni gelovi su natopljeni otopinom za bojenje i stavljeni na tresilicu na 100 okretaja u minuti tijekom 24 sata.

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Praćenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u otopini određena je metodom po Bradfordu. To je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na vezanju Coomassie Brilliant blue boje na proteine, pri čemu dolazi do vezanja anionske boje za amino-skupine proteina što je praćeno promjenom boje. Coomassie Brilliant blue boja prisutna je u tri oblika, crveni, plavi i zeleni. Plavi oblik je onaj koji veže protein i intenzivno apsorbira svjetlost na 594 nm. [14,15]

Za mjerenje koncentracije proteina prvo je napravljena otopina reagensa tako što je pomiješano 100 mg bojila Coomasie Brilliant blue s 50 mL 95% etanola i 100 mL 85% ortofosforne kiseline te je dodano vode do 1 L, nakon toga otopina je filtrirana kroz filter veličine pora 0.45 μm .

Kako bi odredili nepoznate koncentracije potrebno je napraviti baždarni pravac. Najprije je napravljeno 10 mL otopine albumina iz goveđeg seruma (BSA-Bovine Serum Albumin) koncentracije 0.1 mg/mL. U 27 plastičnih kiveta je dodana destilirana voda i za svaku je određena absorbancija pri valnoj duljini od 450 nm i 595 nm. Nakon toga je u kivete dodana određena količina destilirane vode i BSA tako da koncentracije BSA budu 0 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L i 20 mg/L. Ista količina je dodana u tri kivete i izračunate su srednje vrijednosti, s tim da su u zadnjih devet kiveta dodani uzorci. U svaku kivetu potom je dodano po 500 μL reagensa, nakon čega su kivete homogenizirane i inkubirane 10 minuta. Na kraju je izmjerena absorbancija. Iz apsorbancije je putem baždarnih pravaca (Prilog, Slike 8.1.-8.3.) izračunata koncentracija proteina.

3.3.2. Određivanje koncentracije analita kapljevinskom kromatografijom visokog učinka

Pripremljene su otopine ManNAc-a, Neu5Ac-a i PEP-a koncentracija 50 mM i volumena 200 μL . Zatim je pripremljeno pet razrjeđenja uzoraka ManNAc-a, Neu5Ac-a i PEP-a tako da su im koncentracije iznosile 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM i 50 mM. Kao pufer korištena je tris-

octena kiselina (0.15 M, pH 8.3). Nakon pripreme uzorci su stavljeni u bočice i analizirani na HPLC-u.

Analiza uzoraka je provedena na koloni Phenomenex Synergi™ 4 µm Fusion-RP 80 Å, 250 x 4.6 mm i valnoj duljini od 215 nm. Mobilna faza sastavljena je od A: 0.095 v/v TFA u ACN/UČV 80/20 i B: 0.1% v/v TFA u UČV. Analiza je provedena gradijentnom metodom mijenjanjem koncentracije mobilne faze A od 10% do 34% u 8 minuta, od 34% do 37% u 3 minute, zatim održavanje na 37% 5 minuta, te od 37% do 50% u 4 minute, od 50% do 100% u 3 minute, održavanje na 100% tijekom 2 minute i smanjivanje od 100% do 10% u 4 minute. Promjena mobilne faze B ide od 90% na početku do 66% tijekom 8 minuta, zatim od 66% do 63% u 3 minute, ostaje sa 63% tijekom 5 minuta, zatim od 63% do 50% u 4 minute, od 50% do 0% u 3 minute, s 0% ostaje tijekom 2 minute i od 0% do 90% tijekom 4 minute. Protok je iznosio 0.8 mL/min. Prije analize uzorci su derivatizirani na sljedeći način: 10 µL uzorka pomiješano je s 50 µL otopine za derivatizaciju (130 mM BnONH₂ u piridinu, metanolu i vodi u omjeru 33:15:2) tijekom jednog sata na 50°C i 900 okretaja u minuti. Nakon toga uzorci su pomiješani s 500 µL metanola, nakon čega su centrifugirani na 14000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta. Gornji dio uzorka je analiziran na HPLC-u. Dobiveni baždarni pravci nalaze se u prilogu na slikama 8.11.-8.13.

Tablica 3.1. Sastav otopina ManNAc-a, Neu5Ac-a i PEP-a

	ManNAc	Neu5Ac	PEP
<i>c</i> / mM	50	50	50
<i>V</i> (otopine) / µL	200	200	200
<i>m</i> / g	0.0023	0.0031	0.0037
<i>V</i> (pufera) / µL	200	200	200

Retencijska vremena za MaNAc, Neu5Ac i PEP iznosila su 12.45, 11.70 i 3.48 minuta. Dobiveni kromatogrami se nalaze u prilogu (slika 8.7. kromatogram za ManNAc, slika 8.8. kromatogram za Neu5Ac, slika 8.9. kromatogram za PEP i slika 8.10. kromatogram pomiješanih uzoraka MaNAc-a, Neu5Ac-a i PEP-a).

3.3.3. Mjerenje specifične aktivnosti enzima

Aktivnost enzima određena je metodom početnih reakcijskih brzina putem praćenja koncentracije nastalog produkta, tj. Neu5Ac. Reakcija je provedena pri temperaturi 37 °C i 900 okretaja u minuti. Početne koncentracije ManNAc-a i PEP-a su iznosile 5 mM, uz 1 mM Mn²⁺. Prvo je uzet nulti uzorak za analizu, nakon toga je dodano 50 µL otopine enzima koncentracije 0.25 mg/mL. U određenim vremenskim intervalima su uzimani uzorci od 10 µL za analizu. Analiza uzoraka u HPLC-u i derivatizacijska metoda opisane su u 3.3.2. djelu. Iz dobivenih površina i baždarnog pravca izračunata je koncentracija produkta. U prilogu se nalaze dobiveni grafovi ovisnosti koncentracije produkta o vremenu (slika 8.4., 8.5. i 8.6.) iz koje je izračunata aktivnost enzima.

Kako bi izračunali specifičnu aktivnost (*S.A.*) enzima prvo smo izračunali volumnu aktivnost (*V.A.*) prema jednadžbi 4.1., a potom specifičnu aktivnost korištenjem jednadžbe 4.2..

$$V.A. = \frac{dc}{dt} \cdot \frac{V}{\gamma(\text{enzima})} \quad (4.1.)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_{enzim}} \quad (4.2.)$$

U gore napisanim jednadžbama *V* predstavlja ukupni volumen uzorka, γ_{enzim} je masena koncentracija enzima u uzorku i $\frac{dc}{dt}$ predstavlja promjenu koncentracije u vremenu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu praćena je stabilnost enzima sintaze N-acetilneuraminske kiseline. Enzim je bio skladišten u NaPi puferu (150 mM, pH 7.6) pri temperaturi 4°C. Stabilnost je praćena mjerenjem koncentracije proteina metodom po Bradfordu, određivanjem specifićne aktivnosti enzima i određivanjem promjene velićine ćestica u uzorku enzima kroz 16 dana.. Enzim je prvo pripremljen i proćišćen kao što je opisano u eksperimentalnom dijelu.

4.1. Elektroforeza

Kako bi utvrdili uspješnost proćišćavanja proteina, provedena je elektroforeza. Nakon što su pripremljeni odgovarajući gelovi u dobivene raćice su stavljeni uzorci proteina. Nakon toga je aparatura prikljućena na struju sve dok se crta s uzorcima nije spustila do kraja. Na kraju su dobiveni gelovi obojani pomoću otopine za bojanje.

U prvu raćicu koja je na slici 4.1. oznaćena slovom M je stavljen marker, u drugu raćicu (P) su stavljeni „peleti“ odnosno ostatak centrifugiranja u kojem se nalaze odvojene stanićne stijenke i veći dijelovi, u treću (L) je stavljena otopina lizata, u ćetvrtu (FT) je stavljena otopina nastala ispiranjem Ni-NTA kolone, u petu i šestu (PA1 i PA2) otopina pufera A, u sedmu (PA100) spojene frakcije otopina pufera A s 100 mM imidazolom, u osmu (PA200) otopina s 200 mM imidazolom u devetu (PA400) s 400 mM imidazolom i u desetu (PA500) s 500 mM imidazolom. U otopinama nastalih ispiranjem kolone, otopini peleta i ostataka ne oćekujemo nikakve proteine.



Slika 4.1. Rezultati elektroforeze

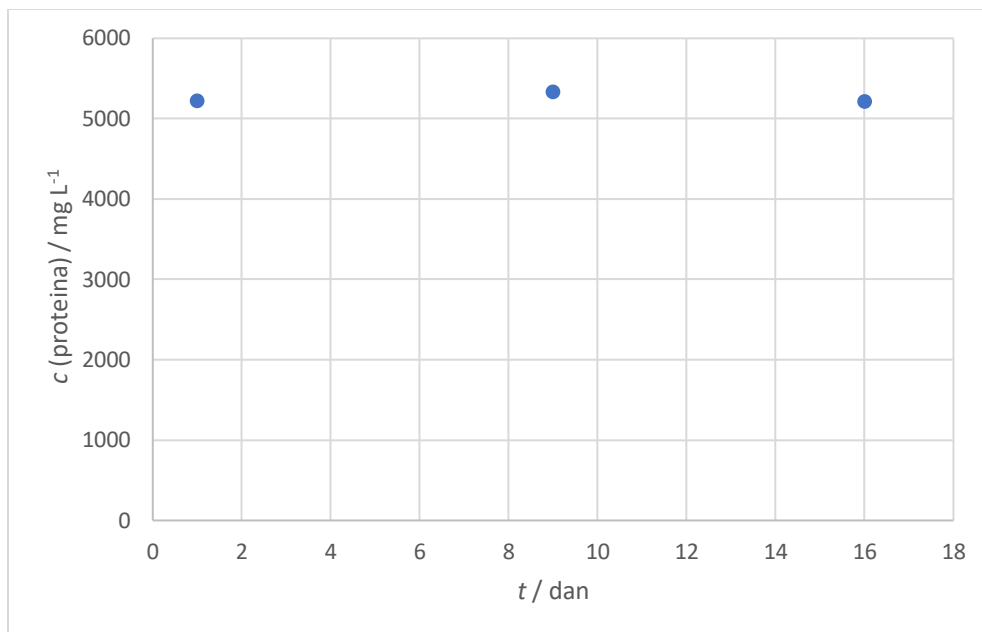
Na slici 4.1. vidimo da nevezani enzim nalazimo u lizatu i puferu A, preko pufera A možemo vidjeti kapacitet kolone za vezanje enzima, odnosno proteina. Zaključujemo da se nije sav enzim mogao vezati na smolu zbog malog kapaciteta kolone koji iznosi 40 mg His-označenog proteina po mL smole. Također vidimo da se najveća koncentracija proteina dobije kada se kolona ispere imidzom koncentracije 400 mM i 500 mM upravo te dvije frakcije su korištene u nastavku eksperimenta.

4.2. Praćenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Apsorbancija je mjerena pri valnim duljinama 450 nm i 595 nm tri puta za svaki uzorak te je izračunata srednja vrijednost. Za mjerenje uzoraka enzima napravljena su razrjeđenja od sto i tisuću puta, te je izmjerena njihova absorbancija. Kako bi odredili koncentraciju proteina u uzorcima, bilo je potrebno napraviti baždarne pravce koji su prikazani u prilogu na slikama 8.1., 8.2. i 8.3.. IZ dobivenih jednadžbi izračunata je koncentracija proteina u uzorcima (tablica 4.1.). Na slici 4.2. prikazana je promjena količine proteina u vremenu. Rezultati pokazuju da je koncentracija proteina praktički nepromijenjena u vremenskom periodu od 16 dana.

Tablica 4.1. Količina proteina u razrijeđenim uzorcima enzima

	09.06.2022.	17.06.2022.	23.06.2022.
	c(proteina)/ mg L ⁻¹	c(proteina)/ mg L ⁻¹	c(proteina)/ mg L ⁻¹
Uzorak enzima razrijeđen 100x	5006.194	5310.474	5234.247
Uzorak enzima razrijeđen 1000x	5439.798	5350.099	5199.978



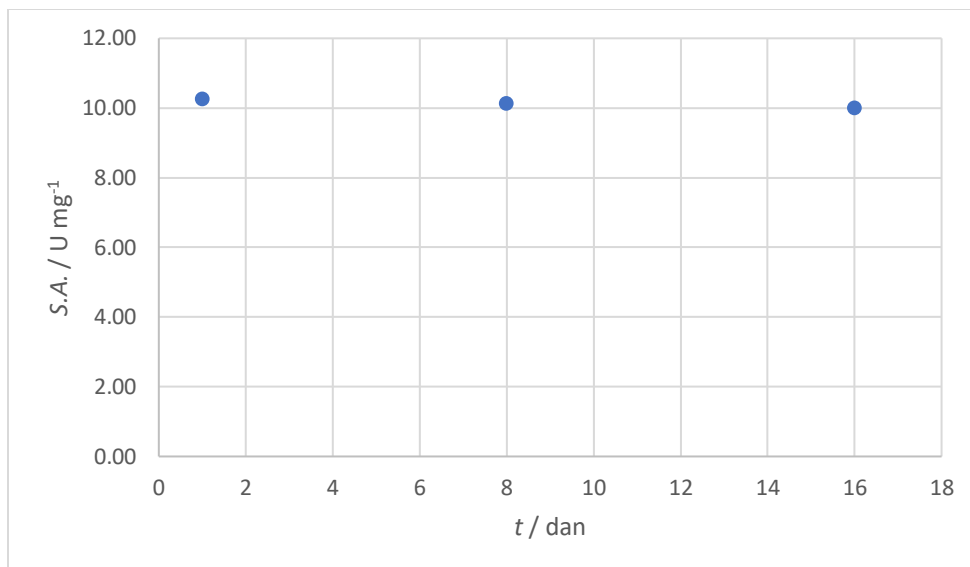
Slika 4.2. Graf promjene srednje vrijednosti koncentracije proteina u uzorku enzima u vremenu

4.3. Praćenje specifične aktivnosti enzima sintaze N-acetilneuraminske kiseline

Kako bi izračunali specifičnu aktivnost (*S.A.*) enzima prvo je izračunata volumna aktivnost (*V.A.*) pomoću podataka iz tablice 4.2. *V* predstavlja ukupni volumen uzorka, *V*_{enzim} je volumen dodanog enzima, γ_{enzima} je masena koncentracija enzima u uzorku i $\frac{dc}{dt}$ predstavlja promjenu koncentracije u vremenu. Volumna i specifična aktivnost izračunate su pomoću jednadžbi 4.1. i 4.2.

Tablica 4.2. Parametri za izračunavanje volumne i specifične aktivnosti enzima

	09.06.2022.	16.06.2022.	23.06.2022.
<i>V</i> / μL	1000	1000	1000
<i>V</i> _{enzima} / μL	50	50	50
γ_{enzima} / mg mL^{-1}	0.0125	0.0125	0.0125
dc/dt	0.1283	0.1266	0.1251
<i>V.A.</i> / U mL^{-1}	2.57	2.53	2.50
<i>S.A.</i> / U mg^{-1}	10.26	10.13	10.01

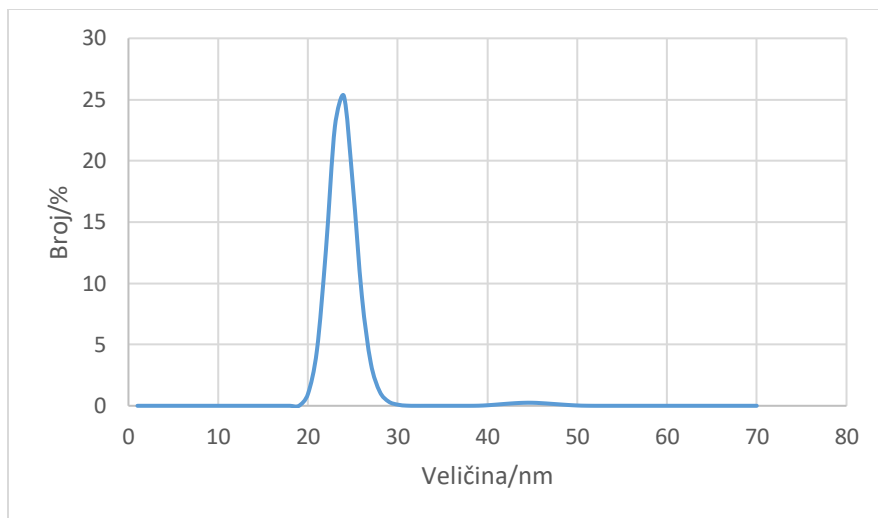


Slika 4.3. Promjena specifične aktivnosti enzima u vremenu

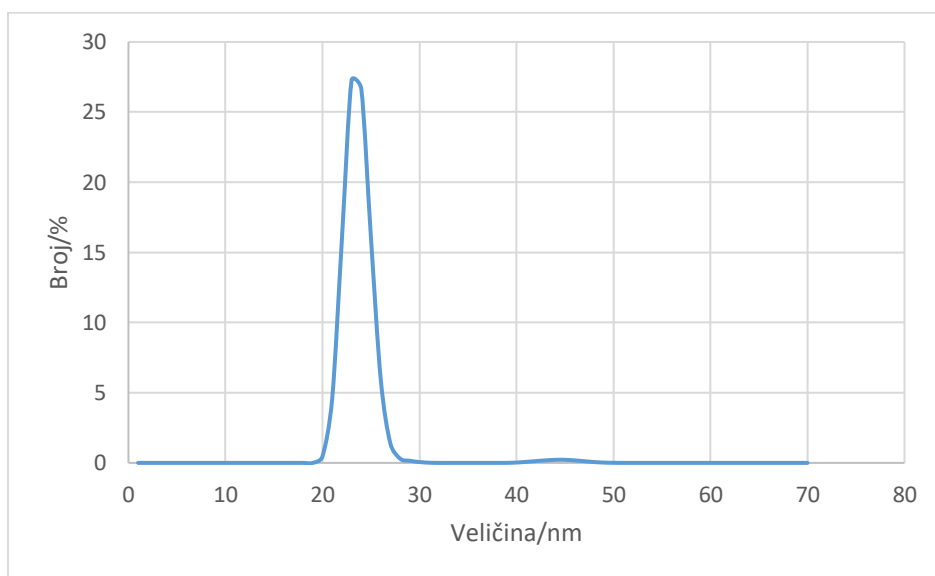
Na slici 4.3. je prikazana promjena specifične aktivnosti enzima u vremenu od 16 dana. Vidljivo je da nema većih promjena u iznosu specifične aktivnosti stoga se može zaključiti da je enzim stabilan u istraživanom vremenskom intervalu.

4.4. Praćenje stabilnosti enzima putem određivanja veličine čestica

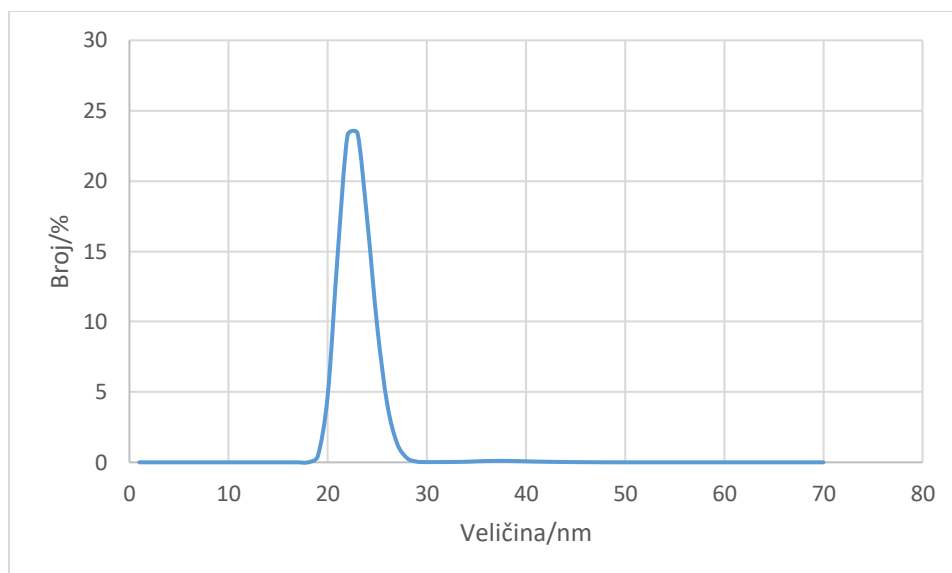
Mjerenja u Zetasizeru (slika 3.6.) temelje se na vaganju čestica i njihovoj raspodjeli, a provode se dinamičkim raspršivanjem svjetlosti. U ovom slučaju izmjerena je volumna veličina, koja se mjeri prema volumenu koji zauzimaju čestice. 1 mg/mL N-acetilneuraminat sintaze je stavljeno u NaPi puffer (150 mM, pH 7.6, 4°C). Svako mjerenje je provedeno tri puta te je uzeta srednja vrijednost. Rezultati su prikazani na slikama 4.4.-4.6.



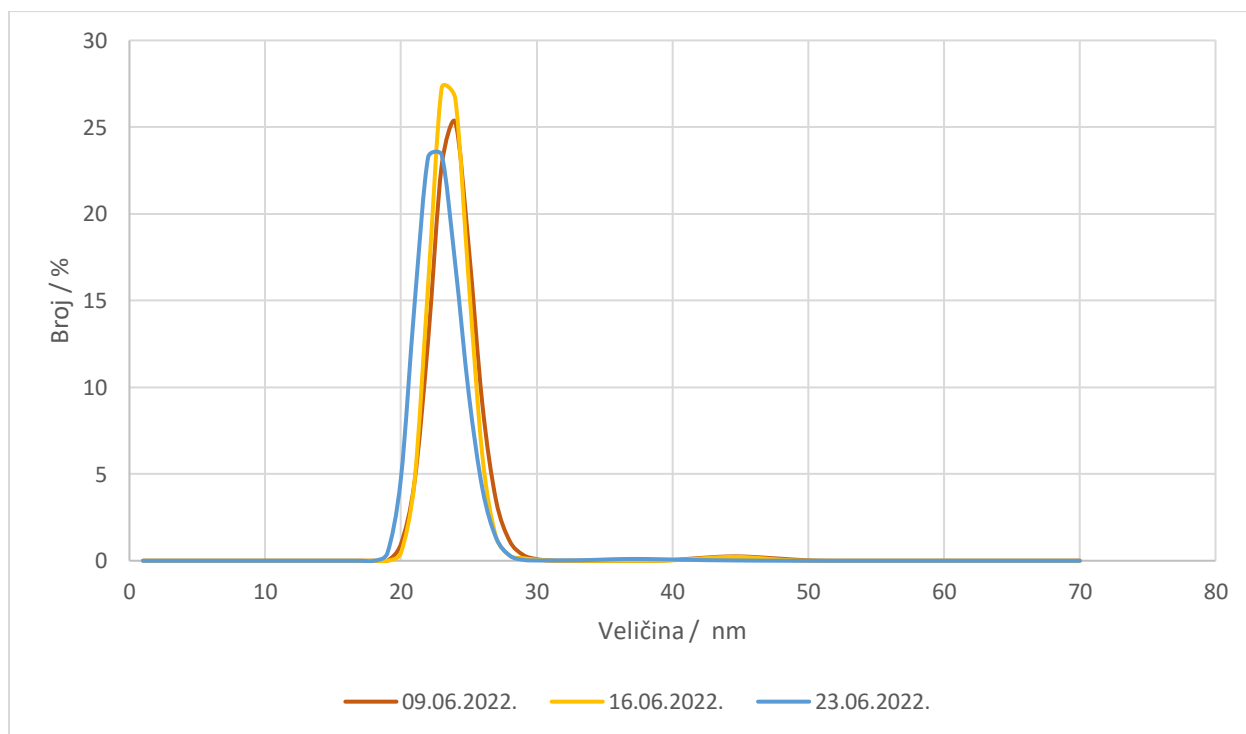
Slika 4.4. Volumna raspodjela enzima N-acetilneuraminat sintaze dobivena na Zetasizeru (09. 06. 2022.)



Slika 4.5. Volumna raspodjela enzima N-acetilneuraminat sintaze dobivena na Zetasizeru (16. 06. 2022.)



Slika 4.6. Volumna raspodjela enzima N-acetilneuraminat sintaze dobivena na Zetasizeru (23. 06. 2022.)



Slika 4.7. Volumna raspodjela enzima N-acetilneuraminat sintaze prilikom mjerenja 09.06.2022., 16.06.2022. i 23.06.2022.

Tijekom skladištenja može doći do agregacije proteina što bi se očitalo kao povećanje veličine proteina. Pri usporedbi rezultata mjerenja (slika 4.7.) vidimo samo manje oscilacije u veličini, što ukazuje na stabilnu strukturu enzima u istraživanom vremenskom periodu od 16 dana.

5. ZAKLJUČAK

Stanice *Escherichia coli* transformirane su proteinom *neuB* koji kodira enzim N-acetilneuraminat sintazu. Dobiveni enzim pročišćen je u Ni-NTA koloni, a čistoća je utvrđena elektroforezom. Enzim je skladišten u NaPi puferu (150 mM pH 7.6) pri temperaturi 4°C.

Stabilnost enzima N-acetilneuraminat sintaza praćena je mjerenjem koncentracije proteina, specifične aktivnosti enzima i određivanjem veličine čestica.

Iz dobivenih rezultata vidimo da nema većih oscilacija u promjeni koncentracije proteina, specifičnoj aktivnosti i veličini čestica enzima stoga možemo reći da je enzim stabilan u periodu od 16 dana.

6. POPIS SIMBOLA

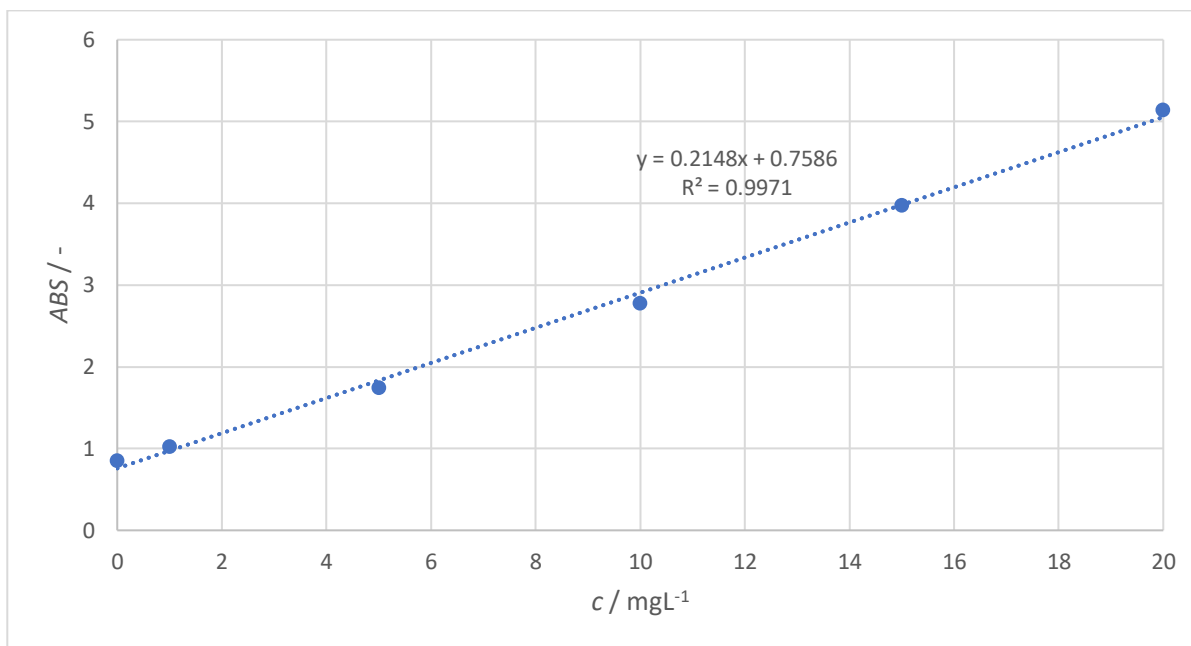
<i>ACN</i>	acetonitril	[-]
<i>APS</i>	perkosidisulfat	[-]
<i>BnONH₂·HCl</i>	O-benzilhidroksilamin hidroklorid	[-]
<i>BSA</i>	albumin iz govedjeg seruma	[-]
<i>ManNAc</i>	N-acetilmanozamin	[-]
<i>Neu5Ac</i>	N-acetilneuraminska kiselina	[-]
<i>Ni-NTA</i>	nikal-nitrilotriocena kiselina	[-]
<i>PEP</i>	fosfoenolpiruvat	[-]
<i>TEMED</i>	tetrametiletildiamin	[-]
<i>UČV</i>	ultračista voda	[-]

7. LITERATURA

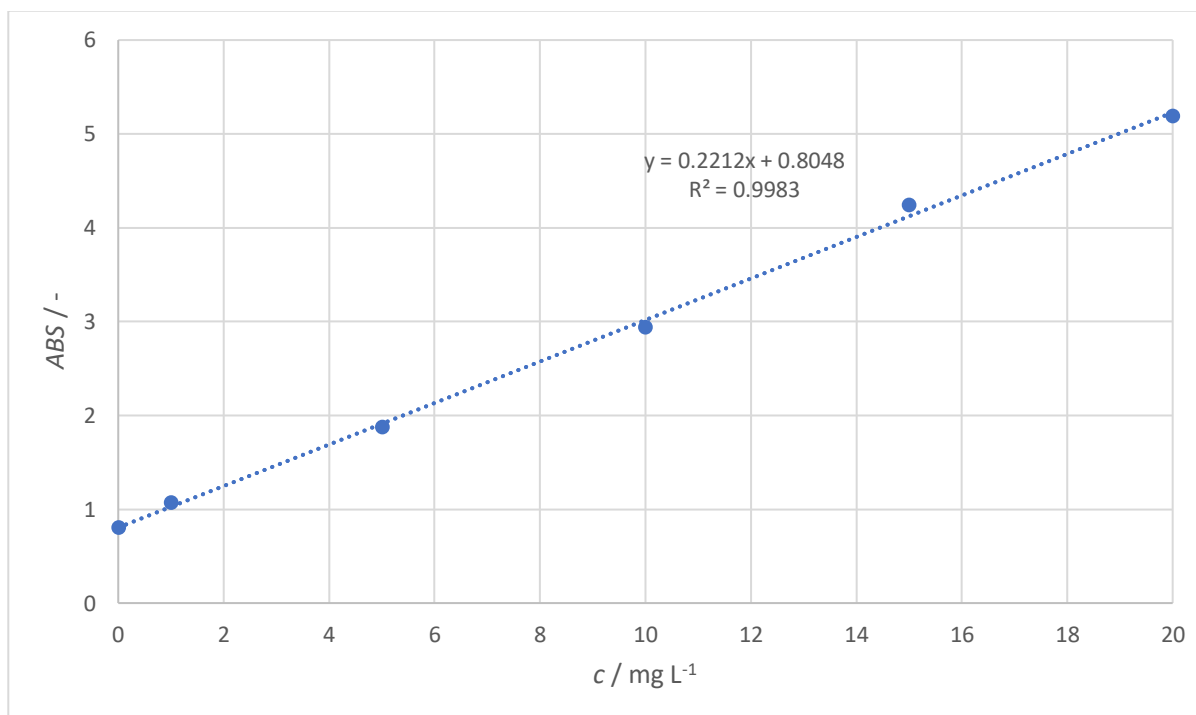
- [1] Wohlgemuth R.: Biocatalysis – Key enabling tools from biocatalytic one-step and multi-step reactions to biocatalytic total synthesis, *New Biotechnology*, 60, 113-123, 2021
- [2] Hollman F., Fernandez-Lafuente R.: Grand Challenges in Biocatalysis, *Frontiers in Catalysis*, 1, 1-3, 2021
- [3] Silberberg S. M., Amateis G. P.: The molecular nature of matter and change with advances topics, 8th edition, str. 673-674,732-733, 2018, McGraw-Hill Education, New York
- [4] Stryer L.: Biokemija, 2. izdanje (hrvatsko), str. 12-13, 16, 25, 1991, Školska knjiga, Zagreb
- [5] W.J.J. van den Tweel, A. Harder, R.M. Buitelaar (Eds.): Stability and Stabilization of Enzymes, str. 111-131, 1993, Elsevier Science B.V.,
- [6] Andrés Illanes: Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, str. 3,116-117, 2008, Springer Science + Business Media B.V., Chile
- [7] Tanner M.E.: The enzymes of sialic acid biosynthesis, *Bioorganic Chemistry*, 33, 216-228, 2005
- [8] Gunawan J., Simard D., Gilbert M., Lovering A., Wakarchuk W. W., Tanner M. E., Strynadka N. C. J.: Structural and Mechanistic Analysis of Sialic acid Synthase NeuB from *Nisseria meningitidis* Complex with Mn^{2+} , Phosphoenolpyruvate and N-Acetylmannosaminol, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 3555-3563, 2005
- [9] Yufei C., Xiaoyang L., Jun G.: Enzyme Catalyst Engineering toward the Integration of Biocatalysis and Chemocatalysis, *Trends in Biotechnology*, 39, 1173-1183, 2021
- [10] Reetz T. M.: Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present and Future, *Journal of the American Chemical Society*, 135, 12480-12496, 2013
- [11] Khalid Z. Masoodi, Sameena Maqbool Lone, Rovidha Saba Rasool: Advanced methods in molecular biology and biotechnology, str. 13-20, 2021, Elsevier, London
- [12] Iyer P. V., Ananthanarayan L.: Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment, *Process Biochemistry*, 43, 1019-1032, 2008

- [13] Taniguchi N., Honke K., Minoru F., Narimatsu H., Yamaguchi Y., Angata T.: Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, Second edition, , str.1526-1530, 2014, Springer, Japan
- [14] Zor T., Selinger Z.: Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies, Analytical Biochemistry, 236, 302-308,1996
- [15] Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254, 1976
- [16] Hao J., Balagurumorthy P., Sarilla S., Sundaramoorthy M.:Cloning, expression and characterization of sialic acid synthases, Biochemical and biophysical research communications, 338, 1507-1514, 2005
- [17] Saini W., Abdeljalil S., Masmoudi K., Gargouri A.: Biocatalysis: Beautiful creatures, Biochemical and Biophysical Research Communications, 426, 289-293, 2012
- [18] Spriestersbach A., Kubicek J., Schäfer F., Block H., Maertens B.: Purification of His-Tagged Proteins, Methods in Enzymology, 559, 1-15, 2015

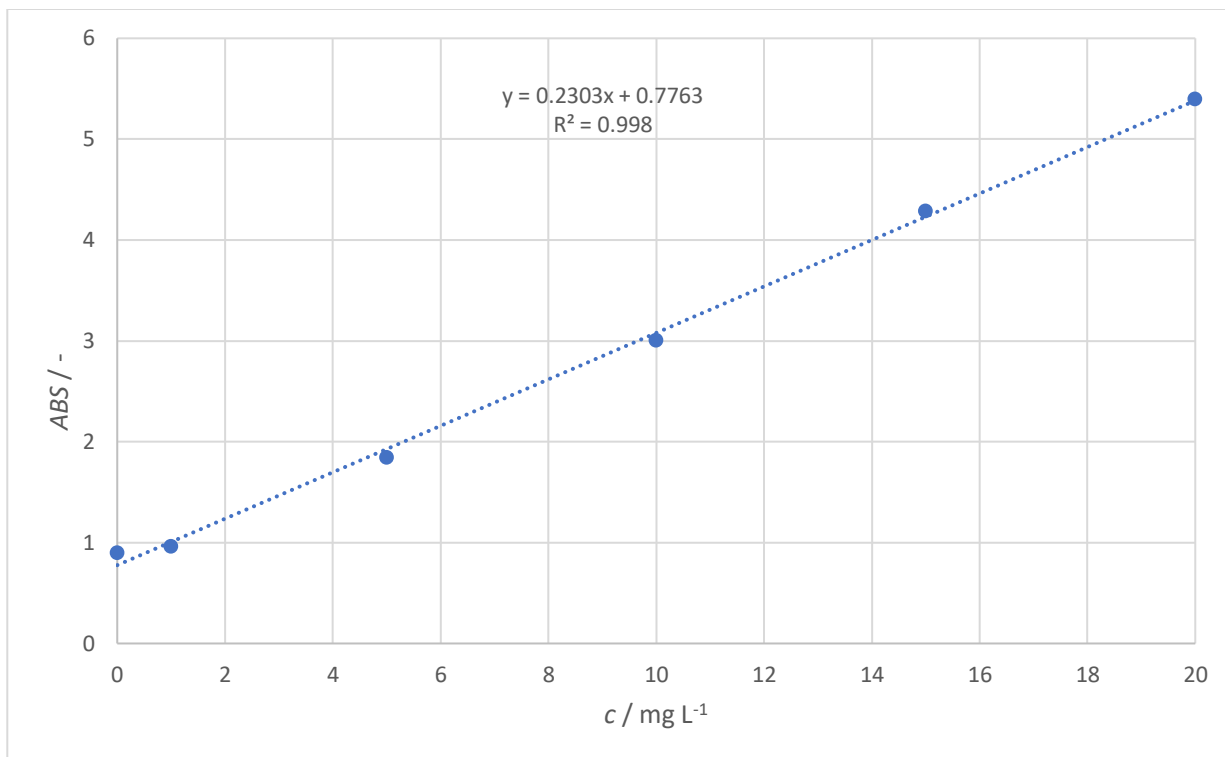
8. PRILOZI



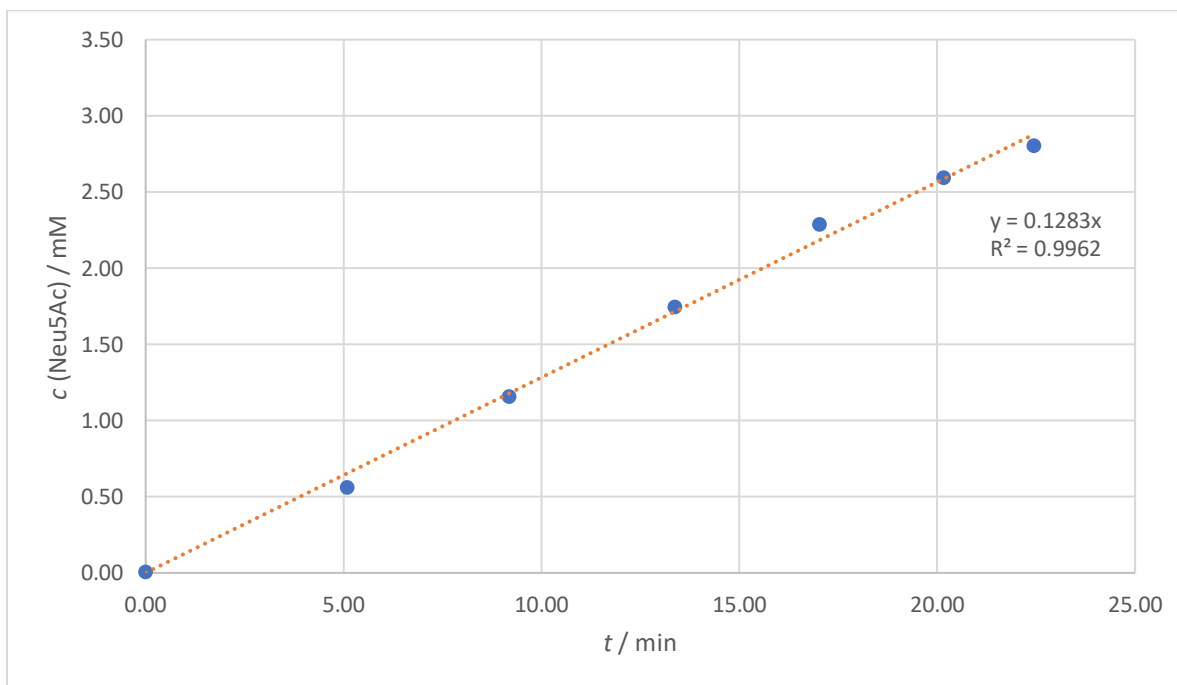
Slika 8.1. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu (09. 06. 2022.)



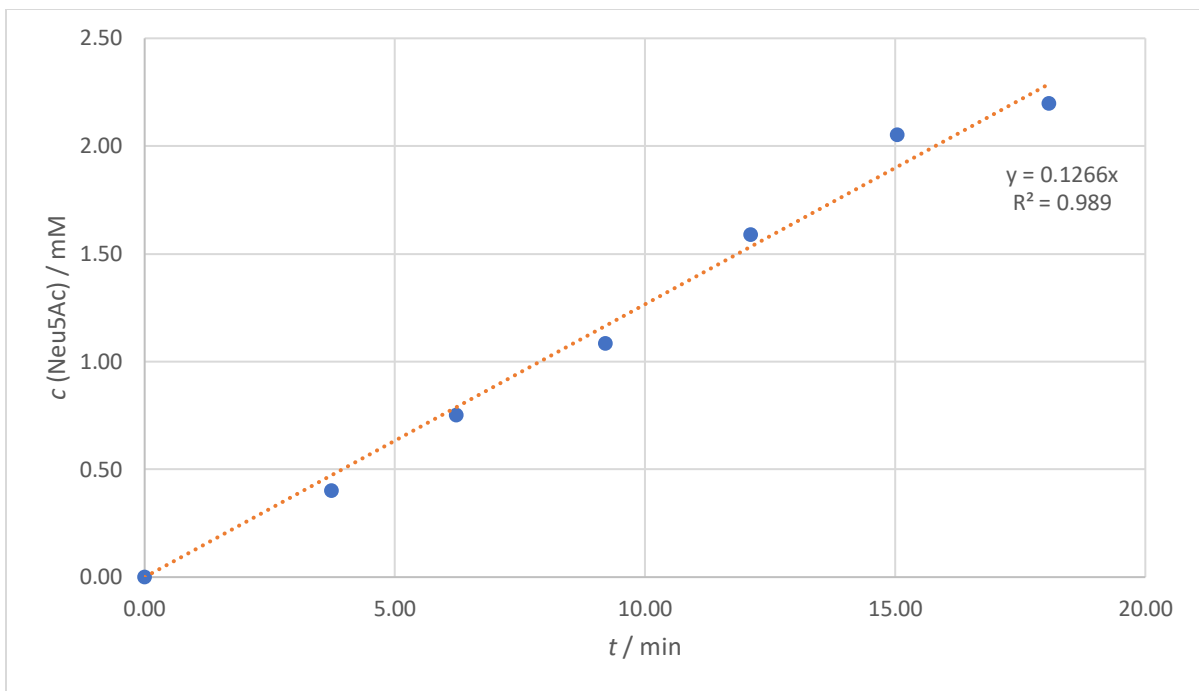
Slika 8.2. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu (17. 06. 2022.)



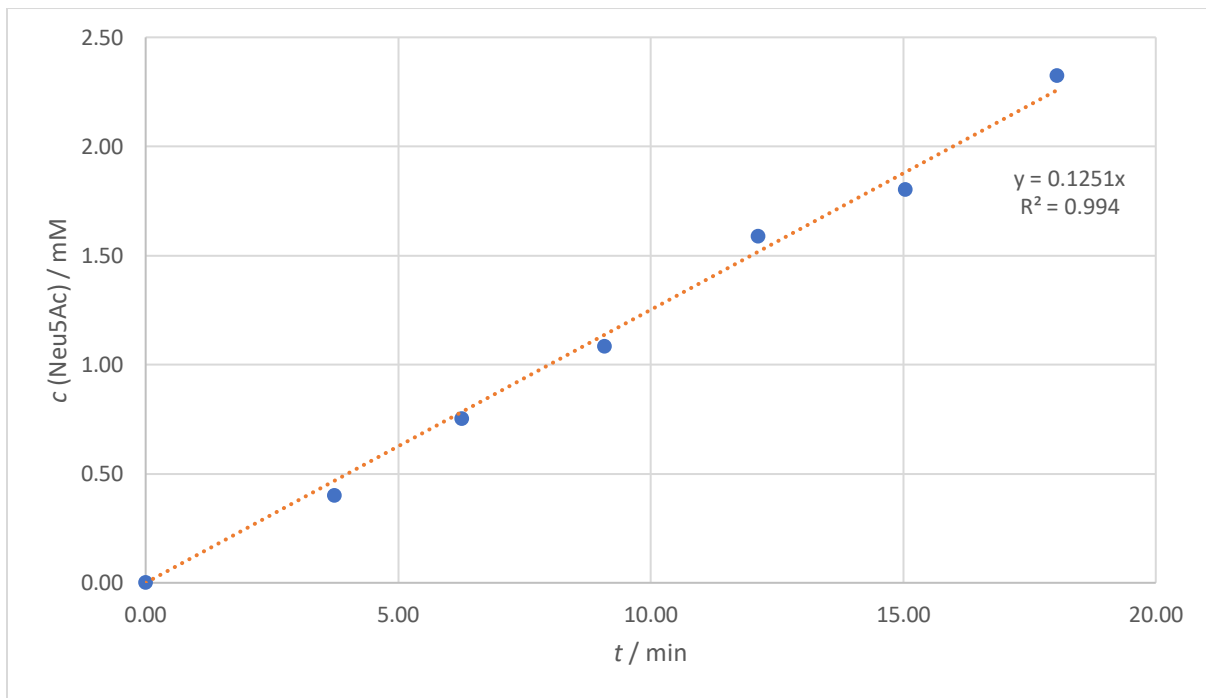
Slika 8.3. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu(23. 06. 2022.)



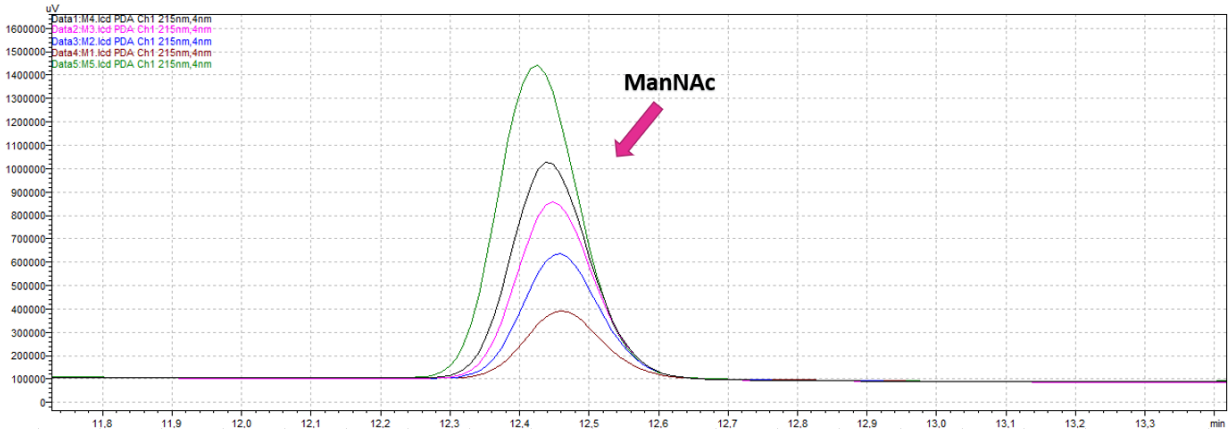
Slika 8.4. Promjena koncentracije nastalog Neu5Ac u vremenu (09. 06. 2022.)



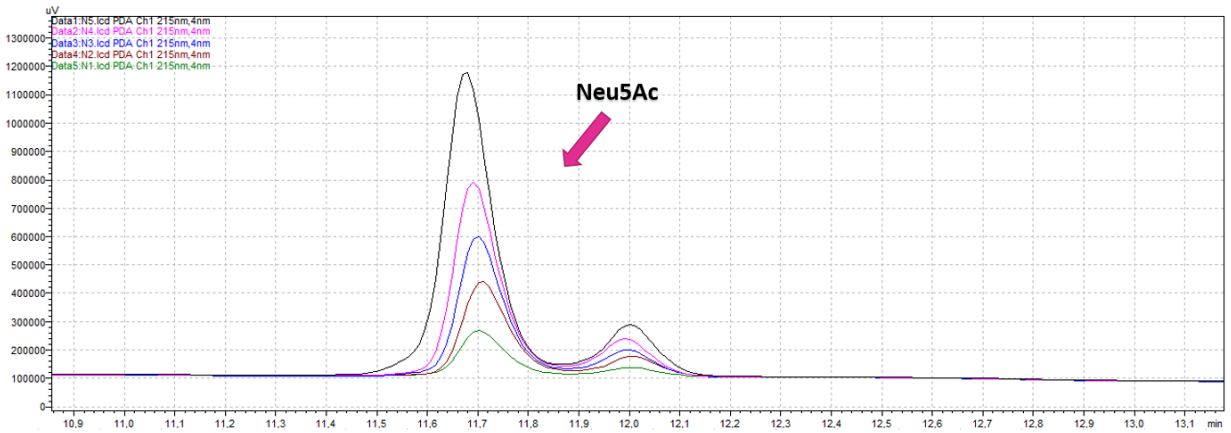
Slika 8.5. Promjena koncentracije nastalog Neu5Ac u vremenu (16. 06. 2022.)



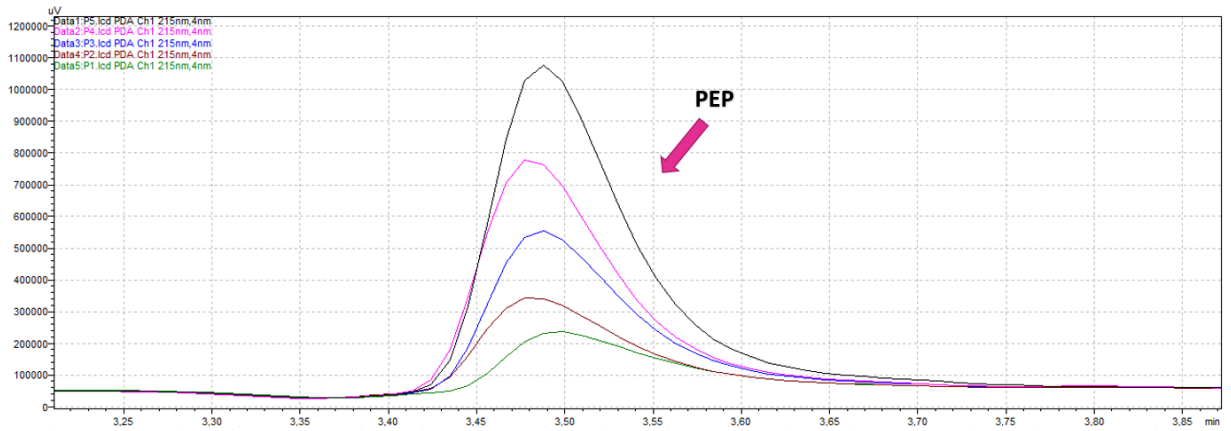
Slika 8.6. Promjena koncentracije nastalog Neu5Ac u vremenu (23. 06. 2022.)



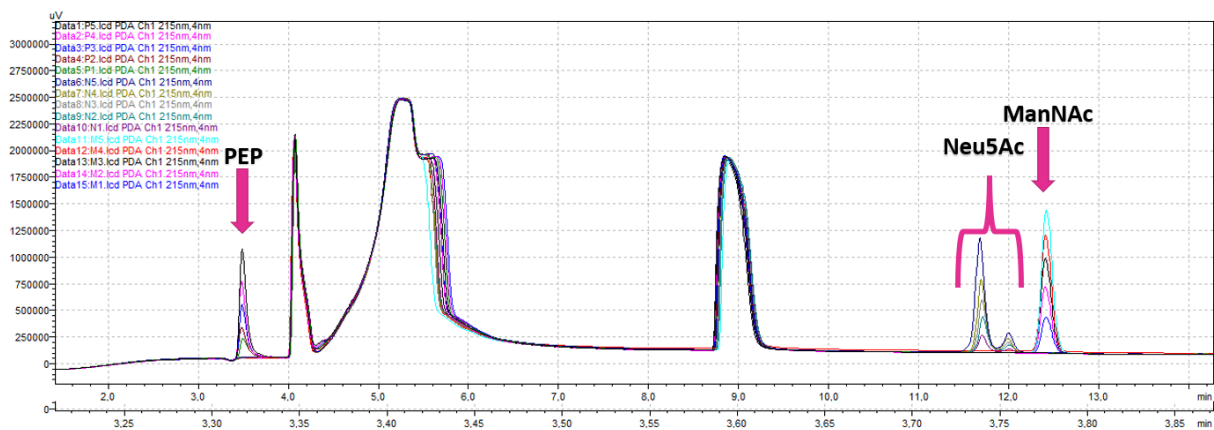
Slika 8.7. Kromatogram ManNAc-a



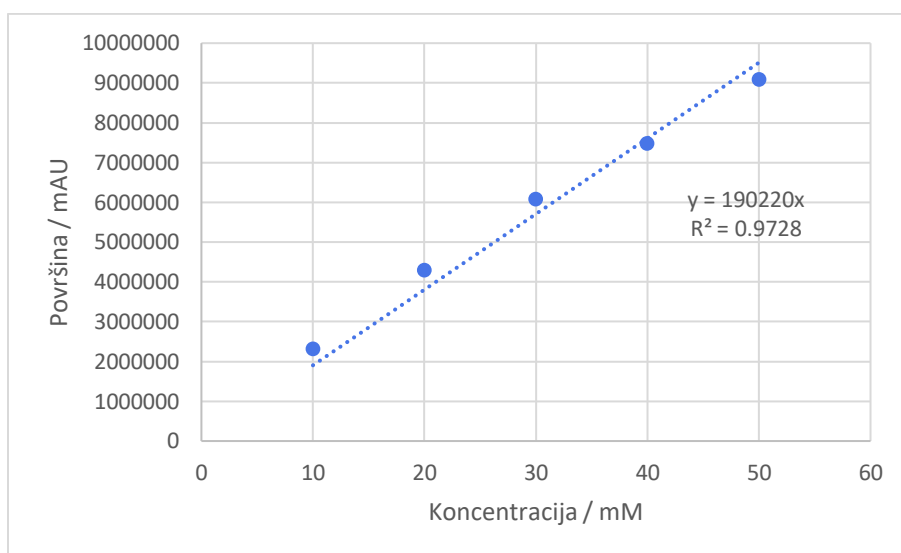
Slika 8.8. Kromatogram Neu5Ac-a



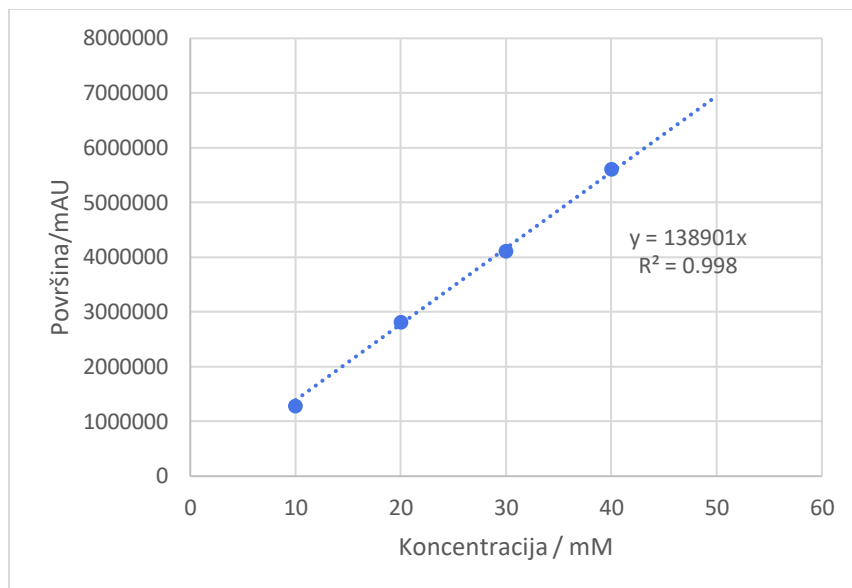
Slika 8.9. Kromatogram PEP-a



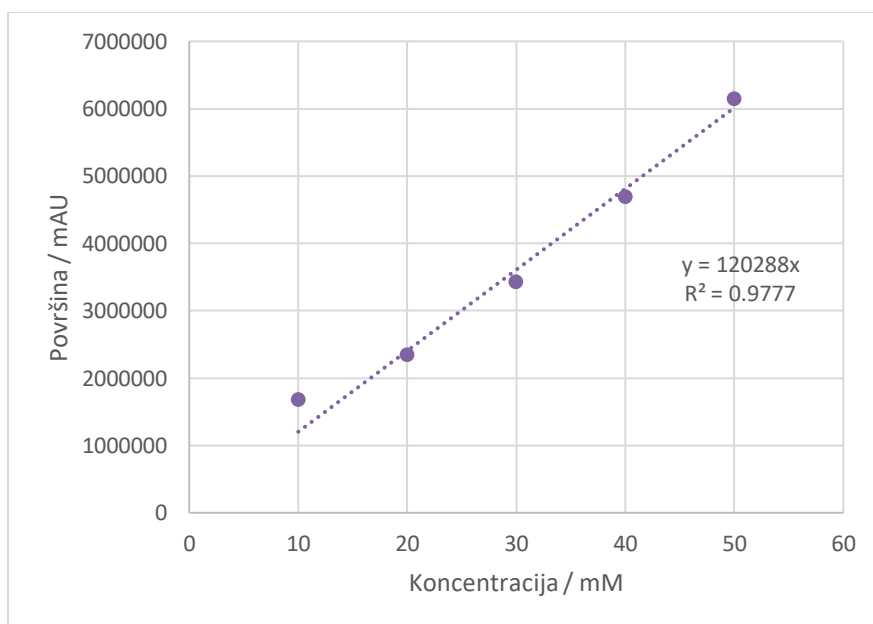
Slika 8.10. Kromatogram pomiješanih uzoraka MaNAc-a, Neu5Ac-a i PEP-a



Slika 8.11. Baždarni pravac za ManNAc dobiven na HPLC-u



Slika 8.12. Baždarni pravac za Neu5Ac dobiven na HPLC-u



Slika 8.13. Baždarni pravac za PEP dobiven na HPLC-u