

# Primjena komercijalnih proteaza u procesu hidrolize proteina u otpadu ljuski kozica

---

**Pinčić, Marta**

**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:149:054980>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Marta Pinčić**

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Marta Pinčić**

**Primjena komercijalnih proteaza u procesu hidrolize proteina u otpadu ljski  
kozica**

**ZAVRŠNI RAD**

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof.dr.sc. Ana Vrsalović Presečki
2. izv. prof.dr.sc. Vanja Kosar
3. doc.dr.sc. Anita Šalić

Zagreb, rujan 2022.

*Srdačno zahvaljujem prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na posvećenom vremenu, razumijevanju, prenesenom znanju i strpljenju tijekom čitavog procesa izrade završnog rada.*

*Osobite zahvale dugujem svojoj obitelji, prijateljima i svim ljudima koji su na bilo kakav način bili podrška u mom dosadašnjem obrazovanju.*

# **Primjena komercijalnih proteaza u procesu hidrolize proteina u otpadu ljuski kozica**

## **SAŽETAK**

Enzimi su biološki katalizatori koji u posebno definiranim uvjetima ubrzavaju biokemijske reakcije u živim organizmima. Upravo u tu skupinu organskih makromolekula ubrajamo i proteaze. Prilikom izrade ovog rada, u eksperimentalnom dijelu su korištene tri komercijalne proteaze: Alkalaza, Novozyme 37071 i Novo-Pro D. Proteaze su korištene s ciljem hidrolize proteina u otpadu ljuski kozica. Provedbom te reakcije uklanjaju se proteini što predstavlja jedan od koraka koji bi omogućio izdvajanje preostalih korisnih spojeva koji u prirodi često dolaze zajedno. Ovaj način izdvajanja ima brojne prednosti u usporedbi s drugim poznatim metodama. Rezultati ukazuju na to da su enzimi bili vrlo efikasni u provođenju proteolitičke reakcije te se osobito iskazao biokatalizator Novo-Pro D.

**Ključne riječi:** enzimi, proteaze, hidroliza proteina, otpad ljuski kozica, hitin, kitosan

## **Application of commercial proteases in protein hydrolysis from shrimp waste**

### **ABSTRACT**

Enzymes are biological catalysts that accelerate biochemical reactions in organisms under specifically required conditions. Proteases also belong to the group of organic macromolecules called enzymes. Three commercial proteases were used in the experimental work in the laboratory: Alcalase, Novozyme 37071 and Novo-Pro D. The proteases were used to hydrolyze proteins found in shrimp waste. Protein hydrolysis removes the proteins, which is one of the steps that would allow the extraction of the remaining beneficial compounds that often occur together in nature. This type of extraction has many advantages over other methods that can be used. The results show that the proteases used for the experiments were very efficient in performing the proteolytic reaction, with Novo-Pro D being the most efficient.

**Key words:** enzymes, proteases, protein hydrolysis, shrimp waste, chitin, chitosan

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. Enzimi.....	3
2.1.1. Enzimi i povijest njihove uporabe.....	3
2.1.2. Nazivlje, podjela i struktura enzima .....	4
2.1.3. Teorije o djelovanju biokatalizatora.....	5
2.1.4. Prednosti i nedostaci biokatalizatora.....	7
2.1.5. Stabilnost biokatalizatora .....	8
2.1.6. Primjena i dobivanje enzima .....	9
2.1.7. Proteaze.....	10
2.2. Hitin.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	14
3.1. Aparatura.....	14
3.2. Analitičke metode.....	17
3.2.1. Postupak određivanja volumne aktivnosti proteaza .....	17
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom .....	18
3.3. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru .....	18
3.3.1. Ekstrakcija proteina iz krutih uzoraka .....	19
3.3.2. Operacijska stabilnost enzima.....	19
3.4. Obrada podataka .....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1. Određivanje aktivnosti proteaza.....	21
4.2. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru .....	21
4.2.1. Operacijska stabilnost enzima .....	23
5. ZAKLJUČAK .....	27
6. LITERATURA .....	28
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA .....	31
8. PRILOZI.....	33
9. ŽIVOTOPIS.....	35

## 1. UVOD

U današnje vrijeme vrlo je važno smanjiti količinu otpada koja nastaje te u središte razmišljanja postaviti ideju koja uzima u obzir da, tvari koje bi možda završile kao otpad, možemo promatrati kao sirovinu za nastanak novih proizvoda. Ovo načelo nalazi se u osnovi kružnog gospodarstva i zadovoljava pojam održivog razvoja. U tom pogledu, kao potencijalno korisne sirovine mogu se promatrati i ljuštore kozica koje čine nejestivi dio hrane. Primjerice, velike količine ove vrste otpada generiraju se u industriji koja se bavi preradom kozica pri čemu zaostaju razni dijelovi ljuštore.<sup>1</sup> Naime, ova vrsta otpada ne smije se odlagati u biootpad te završava u miješanom komunalnom otpadu. Razlog tomu jesu specifičnosti u sastavu ove vrste otpada. U otpadu ljuski kozica, u njihovom sastavu možemo pronaći spojeve poput hitina, proteina, lipida, minerala i drugih.<sup>2</sup>

Uslijed povećane količine otpada nastalog od ljuski kozica koja se generira u industriji koja se bavi tom proizvodnjom, potrebno je smisliti i unaprijediti metode koje će efikasno i sigurno za ljude i okoliš ekstrahirati korisne spojeve koji se nalaze u tom otpadu. Primjetno je da spojevi koji su u sastavu tog otpada, poput hitina i kitosana, imaju vrlo rasprostranjenu i raznoliku upotrebu u brojnim granama ljudske djelatnosti, kao i druge primjene značajne za ljudski život i okoliš. U ovom radu ispitana je učinkovitost tri komercijalne proteaze u deproteinizaciji uzoraka ljuski kozica čiji se mehanizam funkcioniranja zasniva na reakciji cijepanja peptidne veze prisutne u proteinima uz prisustvo vode. Jedan od izazova u komercijalnoj primjeni enzima, pa tako i proteaza, je postizanje visoke stabilnosti biokatalizatora kako bi se ostvarila što veća volumna produktivnost provođenjem željene reakcije. Sve reakcije provedene tijekom eksperimentalnog dijela ovog rada izvršene su pri temperaturi od 40 °C te pri pH vrijednosti 8.

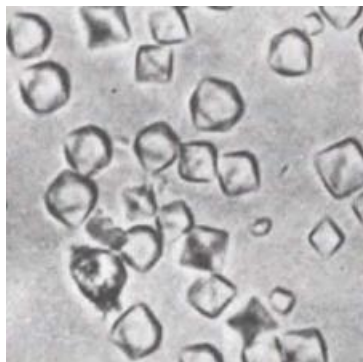


## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Enzimi

#### 2.1.1. Enzimi i povijest njihove uporabe

Enzimi su organske makromolekule koje se sastoje od linearnih lanaca više stotina aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Njihova funkcija je ubrzavanje reakcija u organizmima u točno definiranim uvjetima te mogu ubrzavati reakcije čak i više od  $10^{18}$  puta. Nazivaju se još i biokatalizatorima. Poznavanje i korištenje enzima zapravo seže u daleku povijest te je vezano uz prehrambene navike i potrebe ljudi. U tim ranim primjenama, korištene su žive stanice mikroorganizama koje su sadržavale enzime ili su pak korištene nečiste smjese enzima, a radi se o razdoblju oko 6 000 godina prije Krista poradi proizvodnje raznih prehrambenih proizvoda poput piva i kruha.<sup>3</sup> Tijekom 18. i 19. stoljeća znanstvenici su primijetili i proučavali enzimske reakcije tijekom probave mesa i reakcije nastanka šećera iz desktrina. 1894. Jōkichi Takamine patentirao je postupak proizvodnje dijastatskih enzima koji biokataliziraju proces pretvorbe škroba u šećer. 1897. godine Eduard Buchner otkrio je proučavanjem procesa fermentacije da za biokemijske procese nisu nužno potrebne žive stanice, već da se oni mogu odvijati pomoću enzima koji se formiraju u stanici. Za to je otkriće dobio Nobelovu nagradu za kemiju. 1926. godine James B. Sumner, također Nobelovac, proučavao je enzim naziva ureaza, koji je izolirao u čistom kristaliziranom obliku, a za koji je utvrdio da je po kemijskom sastavu i svojoj strukturi protein (*Slika 2.1.*).

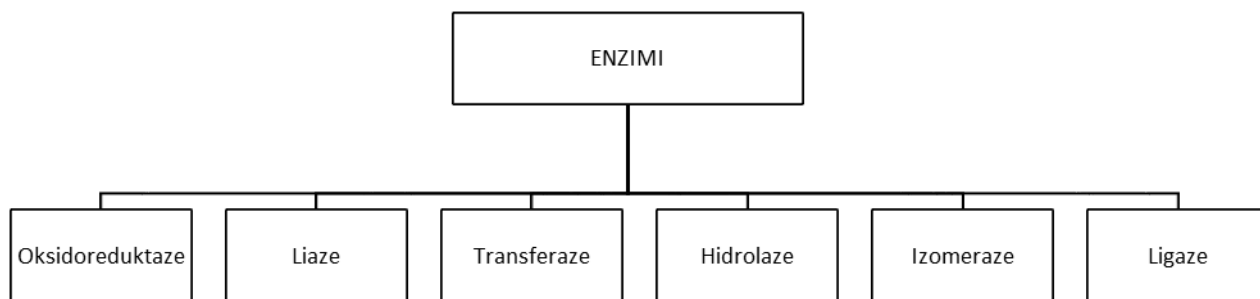


*Slika 2.1.* Dio fotomikrografa koji prikazuje kristale ureaze.<sup>4</sup>

Razvojem molekularne biologije i otkrićem strukture DNA 1953. te napretkom tehnologije omogućen je veliki pomak u daljnjim istraživanjima vezanim uz biokatalizatore. Posljednja tri desetljeća istraživanja otkrila su moć i potencijal korištenja biokatalizatora te primjene u industrijskim procesima zbog koristi dobivenih primjenom genetičkog inženjerstva.<sup>5</sup>

### 2.1.2. Nazivlje, podjela i struktura enzima

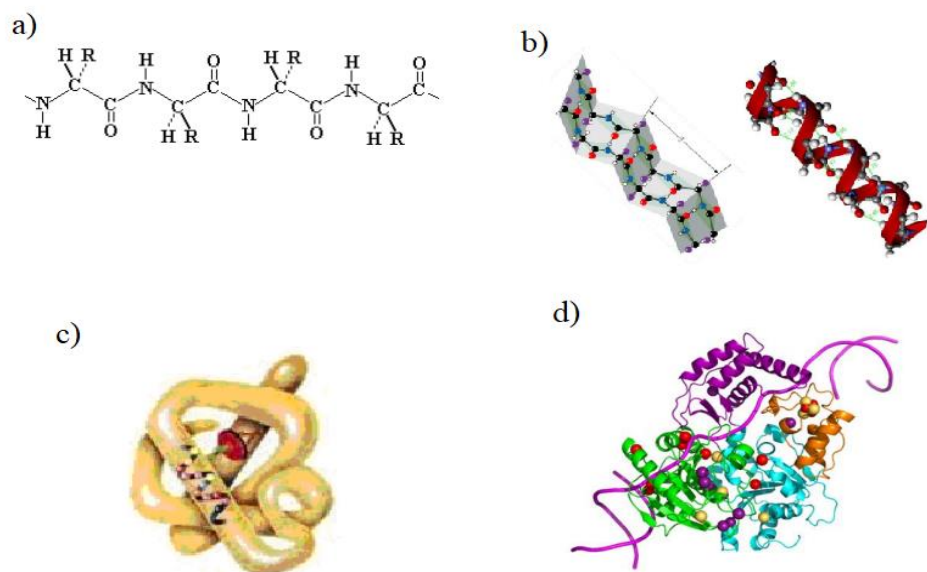
Enzimi se prema glavnoj podjeli svrstavaju u šest skupina na temelju reakcije koju kataliziraju i to u sljedeće skupine: oksidoreduktaze, liaze, transferaze, hidrolaze, izomeraze i ligaze (*Slika 2.2.*).



*Slika 2.2.* Podjela enzima.<sup>6</sup>

Nadalje, u podjeli je uočljivo i jasno nazivlje enzima koje se temelji također na kataliziranoj reakciji ili na temelju naziva supstrata na koji enzim djeluje. Primjetno je da se korijenu riječi katalizirane reakcije ili supstrata doda nastavak -aza (primjerice hidrolaza – enzim koji katalizira reakciju hidrolize kemijskih veza ili lipaza – enzim koji katalizira reakciju hidrolize lipida).<sup>6</sup> Važna svojstva biokatalizatora proizlaze upravo iz njihove strukture. Poznato je da su proteini (pa tako i enzimi) sastavljeni od dvadeset proteinogenih aminokiselina. Struktura, a posljedično i funkcija enzima, određena je slijedom aminokiselina koji je određen nukleotidnom sekvencom gena koja određuje kodiranje.<sup>7</sup> Nastajanje biokatalizatora uvjetovano je povezivanjem i kondenzacijom aminokiselina te je od iznimne važnosti nastanak peptidne veze koja nastaje kondenzacijom amino i karboksilne skupine. Postoje četiri organizacijska strukturna nivoa kod proteina: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna. Ono što razlikuje ove strukture je način povezivanja aminokiselina u prostoru. Primarnu strukturu čini definirani slijed peptidnih lanaca

koji ujedno i određuje vrstu biokatalizatora (na *Slici 2.3. a*)). Postoje dvije mogućnosti kada se govori o sekundarnoj strukturi: nabrana ili struktura uzvojnice (na *Slici 2.3. b*) prikazana su oba slučaja). Tercijarna struktura je trodimenzionalna struktura koja nastane preklapanjem peptidnih lanaca (na *Slici 2.3. c*)), dok je najkompleksnija struktura kvartarna (na *Slici 2.3. d*)) koju tvori nekoliko podjedinica. Trodimenzionalne strukture stabilizira pet različitih vrsta veza.<sup>8</sup>



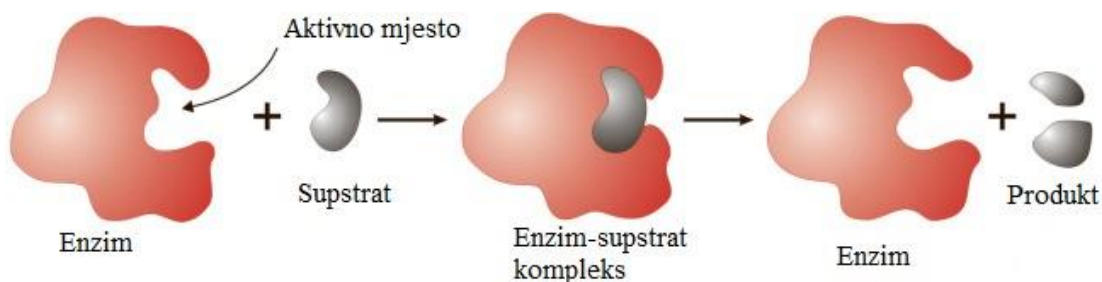
*Slika 2.3.* Prikaz strukture biokatalizatora (prilagođeno iz<sup>3</sup>). a) primarna struktura, b) sekundarna struktura, c) tercijska struktura, d) kvartarna struktura.

### 2.1.3. Teorije o djelovanju biokatalizatora

Teorija koja opisuje reakcijski put biokatalizirane reakcije naziva se teorija biokatalize. Još davne 1888. godine švedski kemičar Svante Arrhenius pretpostavio je postojanje svojevrsnog intermedijera koji nastaje spajanjem enzima i supstrata. Prva teorija koja je opisivala djelovanje enzima je teorija brave i ključa iz 1894. godine nazvana po hipotezi njemačkog kemičara Emila Fischera. Fischer je istraživao probavu šećera kataliziranu enzimima kvasca te je zaključio da postoji njihovo specifično djelovanje na temelju saznanja da je moguća razgradnja samo određenih stereoizomera glukoze.<sup>9</sup> 19 godina nakon tog otkrića iznesena je prva teorija nastanku kompleksa enzim-supstrat koju iznose L. Michaelis i M.L. Menten.<sup>5</sup> Daljnji napredak donijela su

istraživanja Davida Phillipsa o lizozimima koja su ukazala na to kako se supstrat veže za enzim, odnosno na koji to način dolazi do ubrzavanja reakcije.<sup>10</sup> Sve je to vodilo prema nastanku iduće teorije – teorije prilagodbe iz 1958. godine za koju je zaslužan D.E. Koshland. Prema potonjoj teoriji dolazi do konformacijskih promjena prilikom nastanka enzim-supstrat kompleksa.<sup>11</sup> Samo točno određeni supstrat može utjecati na nastanak optimalne konformacijske promjene. Posljednja teorija zove se teorija deformacije i nju je razvio W.P. Jencks. Prema njegovoj teoriji, optimalna kataliza odvija se uslijed destabilizacije i određenog povećanja energije ES kompleksa te uz istovremeno povećanje Gibbsove energije prouzrokovanog određenim procesima.<sup>12</sup>

Sve navedene teorije uključuju nastajanje međukompleksa prilikom vezivanja enzima za supstrat (Slika 2.4.).

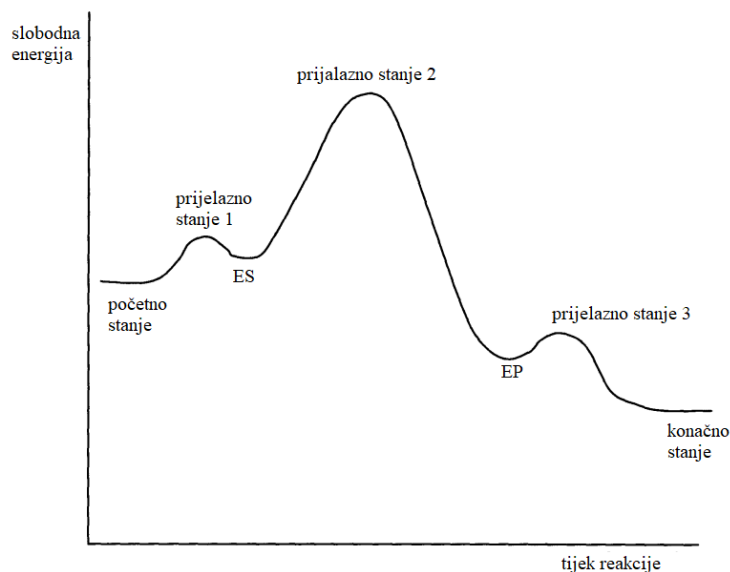


Slika 2.4. Shematski prikaz nastanka kompleksa enzim-supstrat.<sup>13</sup>

Upravo to otkriće dokazao je K.G. Stern na Sveučilištu Yale prilikom eksperimenata provedenih s katalazom.<sup>14</sup> Provedena su i druga istraživanja koja su koristila neke druge spektroskopske metode ili x-zrake, a koja su također potvrdila postojanje enzim-supstrat kompleksa.<sup>3</sup>

No, ono što se pokazalo u osnovi kao vrlo važno za opisivanje i poznavanje biokataliziranih reakcija jesu upravo energetske efekte te je bitno naglasiti da je oslobođena ili utrošena slobodna energija kod kataliziranih reakcija jednaka onoj kod nekataliziranih reakcija, odnosno početno i konačno stanje slobodne energije jednako je u oba slučaja, a samo se put reakcije razlikuje. Enzimi funkcioniraju na principu snižavanja energije aktivacije stvaranjem prijelaznih stanja što ubrzava dostizanje nepromijenjene kemijske ravnoteže. To je omogućeno jer se djelovanjem enzima povećava broj uspješnih sudara upravo snižavanjem te energetske barijere. Ovisnost slobodne energije o tijeku reakcije u slučaju jednog enzima i jednog supstrata prikazana je na

Slici 2.5, te je važno napomenuti da se situacija u određenom stupnju mijenja ukoliko se radi o većem broju enzima i supstrata koji sudjeluju u reakciji.<sup>15</sup>



Slika 2.5. Dijagram slobodne energije za biokataliziranu reakciju (prilagođeno iz<sup>15</sup>).

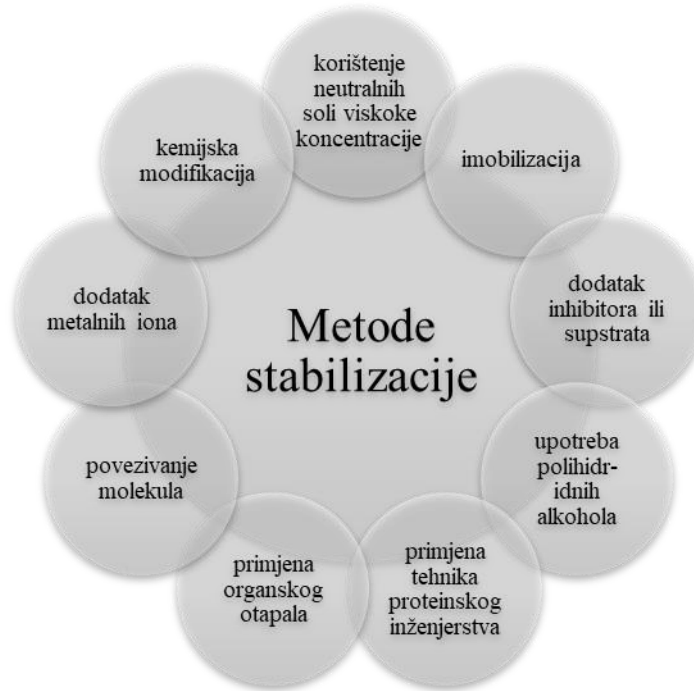
#### 2.1.4. Prednosti i nedostaci biokatalizatora

Jedna od brojnih prednosti kod korištenja enzima je provođenje reakcije u blagim uvjetima. Naime, enzimski katalizirane reakcije ne zahtijevaju visoke temperature, već je za svaki enzim potrebno utvrditi temperaturu koja je optimalna. Primjerice, 37 °C je temperatura koja je optimalna za funkcioniranje enzima prisutnih u ljudskom tijelu. Uzimajući u obzir činjenicu da su enzimi po svom sastavu proteini, važno je napomenuti da već pri 40 °C u ljudskom tijelu dolazi do denaturacije, odnosno smanjene biološke aktivnosti enzima. Uz to, zbog prethodno spomenutih kemijskih veza koje stabiliziraju strukturu proteina, iznimno je važno voditi računa o pH vrijednosti koju zahtijeva određena biokatalizirana reakcija. Osim što su potrebni blaži uvjeti pH vrijednosti, njihova prednost ogleda se i u uobičajeno manjem potrebnom broju stupnjeva u kojem se provodi proces. Značajna prednost u odnosu na kemijske katalizatore je specifičnost, selektivnost i manja potrebna koncentracija biokatalizatora. Jedan od primjera je mogućnost odvijanja reakcije fosforilacije katalizom D-glukoze, a ne L-glukoze.

Navedeno svojstvo enantioselektivnosti ima značajnu primjenu u farmaceutskoj industriji jer omogućava dobivanje točno određenog produkta zahtijevane čistoće.<sup>13</sup> Poneki enzimi s više podjedinica mogu imati i više aktivnih centara poput ATP sintaze što čini još jednu dodatnu prednost.<sup>16</sup> Vrlo bitan razlog koji povećava konkurentnost enzima je da se mogu razgraditi u prisutnosti mikroorganizama te dobivanje iz obnovljivih izvora. Uz te prednosti koje idu u korist okolišu, treba napomenuti da se manjim utroškom vode i sirovina u procesima koji kataliziraju postiže i generiranje manje količine otpada.<sup>3</sup> No, unatoč brojnim razlozima koji idu u korist, postoje i neki nedostaci koji mogu učiniti biokatalizatore nepovoljnima za provedbu željene reakcije. Zbog specifičnosti njihovog sastava koja je opisana u prijašnjim poglavljima, važno je naglasiti da su enzimima potrebni specifični uvjeti kako bi se postigla njihova optimalna učinkovitost. Ukoliko se to ne ostvari, može doći do nepovoljne pojave kao što je inaktivacija. S obzirom na činjenicu da postoje različite vrste enzima, treba napomenuti da neki od njih zahtijevaju postojanje kofaktora, odnosno aktivatora i metala koji su potrebni za funkcioniranje takvog enzima. Poznate su i različite vrste inhibicije koje mogu smanjiti djelovanje u aktivnost enzima.

#### **2.1.5. Stabilnost biokatalizatora**

Stabilnost enzima je jedan od ključnih faktora uvjetuje uporabu biokatalizatora u industriji jer je obzirom na njihovu cijenu nužno proizvesti određenu količinu produkta po jedinici biokatalizatora. Stabilnost se definira kao preostala aktivnost biokatalizatora nakon što je proteklo određeno vrijeme. Postoje dvije vrste stabilnosti: operacijska i stabilnost u uvjetima skladištenja. Operacijska stabilnost odnosi se na stabilnost tijekom neprekinute uporabe biokatalizatora u procesu, a izražava se kao vrijeme potrebno da se aktivnost enzima smanji na 50% početne vrijednosti. Za obje vrste stabilnosti važno je očuvanje trodimenzionalne strukture molekule biokatalizatora koja je uvjetovana slabim vezama. Stabilnost veza ovisi o okolišnim uvjetima, a faktori koji mogu utjecati mogu biti: kemijski, biološki ili fizički. Inaktivacija biokatalizatora događa se kod svih biokatalizatora, stoga se utjecajem na stabilnost može promijeniti vrijeme koje je potrebno za inaktivaciju, odnosno moguće ju je usporediti. Kako bi se ostvarila željena stabilnost biokatalizatora, koriste se raznolike metode (*Slika 2.6.*). Međutim, s tim metodama treba biti vrlo pažljiv jer neke od njih mogu izazvati i neželjeni efekt – pojavu inaktivacije.<sup>8</sup>



Slika 2.6. Grafički prikaz metoda stabilizacije biokatalizatora.<sup>8</sup>

### 2.1.6. Primjena i dobivanje enzima

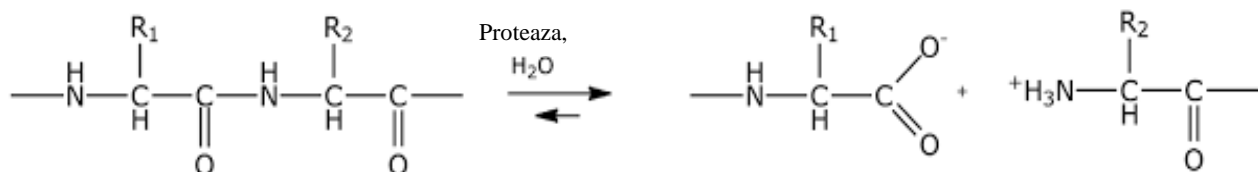
S obzirom na brojne navedene razloge koji idu u korist korištenju enzima, mogu se naći vrlo zanimljive primjene u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, medicini i obradi otpadnih voda, ali i u nekim drugim djelatnostima. Interdisciplinarni pristup implementiran u biotehnologiji koja se sve više razvija, omogućio je da se enzimi efikasno koriste u gore spomenutim područjima. Jedna u nizu zanimljivih primjena je u konzervaciji umjetnina. Naime, konzervatori su uvidjeli prednosti korištenja enzima u tom procesu, posebice hidrolitičkih enzima kao što su amilaze i proteaze.<sup>17</sup> U obradi otpadnih voda također se istražuje primjena takve vrste katalizatora zbog prisutnosti molekula koje je teško ukloniti primjenom konvencionalnih metoda. Otkriveno je da postoji veliki potencijal jer mogu dijelom razgraditi otporne onečišćujuće tvari,<sup>18</sup> Osobitno važna otkrića događaju se u području medicine, a odnose se na liječenje raka. 2018. godine na Sveučilištu u Texasu istraživali su primjenu PEG-KYNase u djelovanju na spoj koji se zove kininurenin. Taj metabolit uzrokuje slabljenje imunološkog sustava, pa je ideja istraživača bila da se djeluje upravo na taj spoj i to inhibicijski. Na taj način

spriječilo bi se negativno djelovanje kininurenina na imunološki sustav, te bi se onda on mogao sam boriti protiv stanica raka.<sup>19</sup> Primjena enzima nije zaobišla ni tekstilnu industriju zbog ostvarenja uštede energije, vode i kemikalija. Na taj način u Kini je LCA analizom potvrđeno da se upotrebom enzima smanjuje ugljični otisak.<sup>20</sup>

Da bi sve te primjene bile moguće, biokatalizatore treba dobiti iz njihovih izvora poput mikroorganizama ili biljnih i životinjskih stanica. Široka primjena uvjetovala je porast potražnje biokatalizatora pa se u moderno vrijeme koristi genetičko inženjerstvo kako bi se poboljšala produktivnost i dobila veća količina.<sup>21</sup>

### 2.1.7. Proteaze

U ovom radu istraživana je primjena komercijalnih proteaza. Drugi nazivi za ovu skupinu enzima su: proteolitički enzimi ili peptidaze. Peptidaze se dijele na egzopeptidaze i endopeptidaze. Komercijalna vrijednost ove skupine biokatalizatora ogleda se u isplativosti koja se izražava prema toni dobivenog produkta i gledajući na taj način, proteaze se smještaju na sami vrh. Također, važna stavka koja ide u prilog komercijalnoj upotrebi je to što nije potrebno pročišćavanje. Česte industrijske primjene ove skupine su u industriji detergenata, kože, prehrambenoj i farmaceutskoj te čine čak 60% svjetske prodaje enzima što uvelike svjedoči o važnosti ove skupine.<sup>21,22,23</sup> Razlog ovakvoj širokoj primjeni može se potražiti u tome što proteaze hidroliziraju peptidnu vezu kojom su povezane kondenzirane aminokiseline u proteinima (*Slika 2.7.*).



*Slika 2.7.* Prikaz reakcije katalizirane proteazom.<sup>24</sup>

Proteaze dakle, pripadaju skupini hidrolaza jer se, kao što je prikazano na prethodnoj slici, njihovim djelovanjem može katalizirati reakcija hidrolize različitih veza uz prisutnost vode. Taj mehanizam omogućen je nakon što se polarizacijom karbonilne veze otvori put prema karbonilnoj grupi uslijed aktivacije nukleofilne grupe i njenog napada.



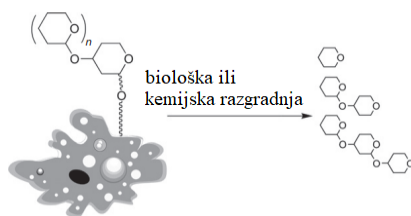
Osim u industriji i bioreaktorima, proteaze se pojavljuju i u prirodi. Za peptidaze koje se pojavljuju u prirodi, karakteristična je pojava da nastaju iz inaktivnih prekursora zimogena. Njihova aktivacija moguća je djelovanjem okolišnih faktora koji uzrokuju promjene i posljedično nastanak aktivne konformacije.<sup>25</sup>

S obzirom na velike potrebe za proteolitičim enzimom, značajna je uloga proteinskog inženjerstva koje omogućava dobivanje velike količine primjenom metoda poput kloniranja, dodavanja plazmida, djelovanje na represor koji kontrolira inhibiciju ekspresije jednog ili više gena i drugih metoda. U slučaju proteaza, bakterije i gljive pokazale su se kao najbolji izbor za izolaciju i pročišćavanje, a posebice bakterija roda *Bacillus*. Upotrijebljeni mikroorganizam definira i svojstva dobivenih proteaza poput strukture, molarne mase, fizikalnih svojstava i drugih. Temperatura i pH vrijednost su parametri koji variraju ovisno o upotrijebljenom mikroorganizmu, a definiraju maksimalnu aktivnost enzima. Termostabilnost je ključni faktor kod proteaza te se modifikacije mogu postići stvaranjem disulfidnih mostova ili nekim drugim tehnikama koje uključuju potencijalne modifikacije veza između supstrata i enzima te nekih postupaka primjene genetičkog inženjerstva.<sup>26</sup>

Osim što ima vrijednu ulogu u industrijskom svijetu, posljednjih 35 godina provode se istraživanja na području medicine jer je primjerice peptidaza naziva HIV-1 peptidaza zaslužna za replikaciju i napredak bolesti uzorkovane HIV virusom. Razumijevanjem interakcije supstrata i ovog enzima omogućava se primjena inhibitora koji i danas čine terapiju u borbi protiv virusa humane imunodeficijencije.<sup>27,28</sup>

## **2.2. Hitin**

Hitin je biopolimer koji se nalazi u ljušturama školjkaša i čini jedan od najzastupljenijih biopolimera u prirodi nakon celuloze. U prirodi većinom dolazi kao biokonjugat te je stoga potrebno često višestupnjevito izdvajanje i pročišćavanje koje je moguće provoditi biološkim ili kemijskim putem (*Slika 2.8.*).<sup>29</sup>



Slika 2.8. Shematski prikaz izdvajanja hitina (prilagođeno iz <sup>29</sup>).

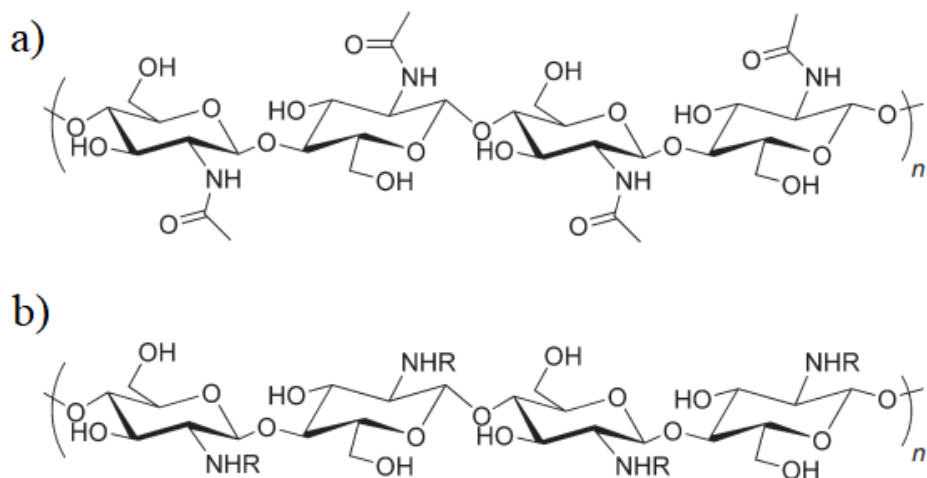
Ekstrakcija hitina zahtijeva provođenje deproteinizacije i demineralizacije upravo zbog činjenice da se hitin u prirodi pojavljuje zajedno s drugim spojevima, kao što je to slučaj u sastavu otpada ljuštura školjkaša. (Tablica 1.) Sastav je podložan varijabilnim udjelima ovisno o vrsti školjkaša.<sup>30</sup>

Tablica 2.1. Varijabilni sastav ljuštura školjkaša.

SPOJ	UDIO
Proteini	30-40%
Kalcijev karbonat	30-50%
Hitin	20-30%

Hitin je strukturno sličan celulozi i svrstavamo ga u polisaharide. Sačinjavaju ga monomerne jedinice  $\beta(1,4)$ -N-acetilglukozamina koje se ponavljaju i stvaraju njegovu linearnu strukturu. Uz hitin, važan je i derivat naziva kitosan koji također ima široku primjenu i komercijalnu važnost (Slika 2.9.).

Kitosan se na komercijalan način dobiva djelomičnom deacetilacijom hitina te ima visoku viskoznost. Specifičan je po tome što kao polielektrolit ima slobodnu amino skupinu koja se u kiselim uvjetima može protonirati čime mu se povećava topljivost u odnosu na hitin.<sup>29</sup>



Slika 2.9. Prikaz monomernih podjedinica a) hitina, b) kitosana (adaptirano iz <sup>29</sup>).

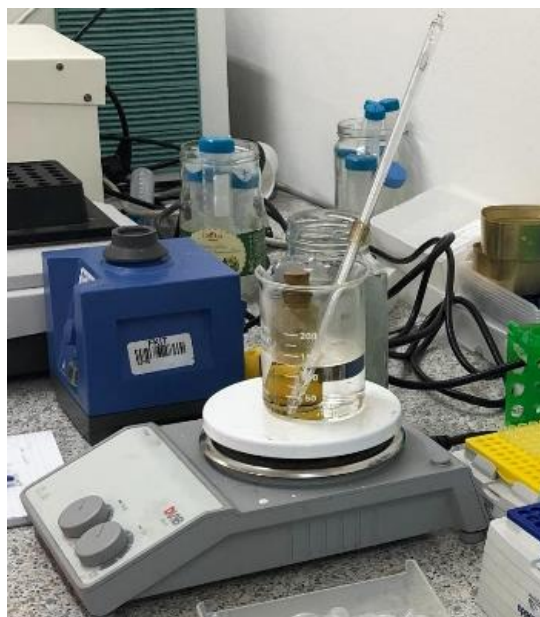
Svojstva ovih polisaharida su biorazgradivost, biokompatibilnost, netoksičnost i antibakterijski učinak, ali i brojna druga. Imaju široku primjenu zahvaljujući svojim svojstvima poput primjene u kozmetici, biotehnologiji, agrikulturi, biomedicini, prehrambenoj, tekstilnoj te industriji papira. Svoju primjenu su pronašli čak i u obradi otpadnih voda gdje mogu biti korišteni za adsorpciju teških metala pa čak i obavljati bitne zadaće u teškim uvjetima poput visoke pH vrijednosti i jakih organskih otapala. Važnost ovih polimera je uistinu vidljiva i značajna stoga treba provoditi daljnja istraživanja kako bi se što efikasnije, jeftinije i prihvatljivije za okoliš mogla provesti njihova ekstrakcija. Primjena bioloških metoda nosi prednosti sa sobom jer bi nakon izdvajanja hitina preostala frakcija bogata proteinima koja bi se mogla sigurno koristiti jer ne bi bio zaostalih potencijalno štetnih nusprodukata koji zaostaju korištenjem kemijskih metoda. <sup>29,30,31</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog rada provodio se u nekoliko dijelova. Prvi korak bio je određivanje volumne aktivnosti tri korištene proteaze, zatim je uslijedila hidroliza proteina i određivanje njihove koncentracije što je zahtijevalo i izradu baždarnog pravca. Posljednji korak uključivao je ispitivanje preostale aktivnosti proteaza nakon hidrolize.

#### 3.1. Aparatura

Na *Slici 3.1.* prikazana je miješalica koja je korištena u svrhu otapanja kazeina. U čaši je napravljena vodena kupelj koja se zagrijavala pomoću grijača koji je dio miješalice do temperature od 75 °C. U čašu je postavljen i termometar kako bi se povremeno kontrolirala temperatura vodene kupelji.



*Slika 3.1.* Miješalica s magnetom *DLAB*.

Za preciznu odvagu otpada kozica korištena je analitička vaga proizvođača *Shimadzu* (Slika 3.2.).



*Slika 3.2. Analitička vaga Shimadzu AUW 120.*

Kako bi se uzorci inkubirali na definiranim temperaturama potrebnim za provođenje analitičkih metoda korištenih u ovom radu, upotrebljavana je tresilica (Slika 3.3.).



*Slika 3.3. Tresilica Thermo Scientific™.*

Za odvajanje taloga i supernatanta korištena je centrifuga rotorom za male kivete kako bi mogli stati šaržni reaktori malog volumena (*Slika 3.4. a) i b)*)



*Slika 3.4. a) Centrifuga Hettich Universal 320R i b) rotor.*

Za mjerenja apsorbancije korištena su dva spektrofotometra prikazana na *Slici 3.5. a) i b)*.



*Slika 3.5. Spektrofotometar Shimadzu a) UV-1601 i b) UV-1800.*

## 3.2. Analitičke metode

### 3.2.1. Postupak određivanja volumne aktivnosti proteaza

Aktivnost proteaza se određivala u reakciji hidrolize kazeina pri čemu kao produkt nastaje tirozin. Prvi korak u određivanju volumne aktivnosti proteaza je izrađivanje baždarnog pravca za tirozin. Baždarni pravac za tirozin nalazi se u poglavlju *Prilozi (Slika 8.1.)*. Prethodno je pripravljena 1%-tna otopina kazeina koja se zagrijavala na miješalici u vodenoj kupelji pri temperaturi od 75 °C. Zatim je priređeno zadano razrjeđenje enzima. Aktivnost enzima se određivala u šaržnom reaktoru na tresilici na 40°C i 1100 o/min. Reakcija je započela u trenutku kada je pomiješano 900 µL kazeina s 900 µL razrijeđenog enzima u šaržnom reaktoru. U prethodno pripremljenim epruvetama se već nalazila trikloroocetna kiselina (TCA) za zaustavljanje reakcije. Iz reaktora je uziman uzorak od 150 µL i stavljan u epruvete s prethodno stavljenom TCA čiji je volumen iznosio 150 µL. Uslijedilo je inkubiranje dobivenih uzoraka u trajanju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Metoda u sljedećem koraku zahtijeva centrifugiranje uzoraka u centrifugi na 14 000 o/min, 4 °C tijekom 5 minuta. Dok je trajalo centrifugiranje, u druge epruvete dodalo se 680 µL 0,5 M otopine natrijevog karbonata. U to se nakon centrifugiranja stavlja 160 µL supernatanta te u posljednjem koraku 80 µL 2 M Folin reagensa. Nakon dodatka Folin reagensa, svaka epruveta stavlja se na inkubaciju na tresilicu pri već prije definiranim uvjetima (40 °C, 1100 o/min). Inkubacija je trajala 25 minuta.. Nakon što je proteklo vrijeme inkubacije, apsorbancija je mjerena na spektrofotometru pri valnoj duljini od 660 nm. Iz promjene apsorbancije u vremenu određivala se volumna aktivnost enzima prema jednadžbi:

$$A_v = \frac{V_r}{\epsilon_{660} \cdot d \cdot V_{enzim}} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (1)$$

$V_r$  predstavlja ukupni volumen reaktora izražen u mL. Oznaka  $\epsilon_{660}$  je ekstincijski koeficijent pri valnoj duljini od 660 nm izražen u  $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ , a njegova vrijednost je jednaka vrijednosti nagiba baždarnog pravca za tirozin (*Prilozi, Slika 8.1.*). Oznaka  $d$  jest promjer kivete koji iznosi 1 cm, a volumen dodanog enzima označen je s  $V_{enzim}$  i izražen je u mL. Vrijednost omjera  $\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$

predstavlja promjenu apsorbancije u vremenu i izražena je u  $\text{min}^{-1}$ . U poglavlju *Prilozi* nalazi se primjer mjerenja aktivnosti proteaze na *Slici 8.2*.

### **3.2.2. Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom**

Koncentracija proteina je određivana primjenom Bradfordove metode. Bradfordov reagens priređen je na sljedeći način: 100 mg bojila Commassie blue se otopi u smjesi 50 mL 95% etanola i 100 mL 85% ortofosforne kiseline te se do volumena 1 L dodaje ultra čista voda. Dobivena smjesa se potom višestruko filtrira kroz 0,45  $\mu\text{m}$  šprica filter do smeđe boje. Pripremljeni reagens se pohranjuje u staklenu bocu omotanu folijom u hladnjak na 4 °C. Mjerenje se provodi u plastičnim kivetama za spektrofotometar. Sadržaj kiveta čini 500  $\mu\text{L}$  uzorka kojem se doda 500  $\mu\text{L}$  Bradfordovog reagensa, nakon čega slijedi inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Po završetku inkubacije se provodi mjerenje za spektrofotometru na dvije različite valne duljine, 450 nm i 595 nm. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije proteina je izrađen korištenjem bovine serum albumina (BSA) u rasponu koncentracija 1 – 20 mg/L (*Prilozi, Slika 8.3*).

### **3.3. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru**

Hidroliza proteina odvijala se u kotlastim reaktorima volumena  $V_{\text{reaktor}} = 200 \mu\text{L}$  s tri enzima (Alkalaza, Novo-Pro D i Novozyme) pri 40 °C. Koncentracija enzima je bila podešena na 0,5 U / 10 mg otpada kotica. U šaržni reaktor dodani su definirani volumeni 50 mM Tris-HCl pufera pH 8, 20 mg odvage otpada kozica i reakcija je pokrenuta dodatkom definiranog volumena 10 puta razrijeđenog proteolitičkog enzima. Reaktori su stavljeni na tresilicu koja je bila podešena na 40 °C i 1100 o/min te je za svaki enzim reakcija praćena svakih 15, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta. Nakon je prošlo definirano vrijeme za pojedini reaktor, reakcija se zaustavila centrifugiranjem na uvjetima od 4 °C pri 14 000 o/min tijekom 5 minuta. Zatim je uslijedilo odvajanje supernatanta i taloga. U supernatantu je određena aktivnost proteaze po načinu opisanom u *Poglavljju 3.2.1*, ali tako da se uzorak razrijedi 50 puta. Preostali talog ispirao se korištenjem 50 mM Tris-HCl pufera, točnije dodavanjem 1 mL i miješanjem, a zatim centrifugiranjem. Ispiranje se provodilo dva puta. Isprani talog je sačuvan i u njemu je



određivana koncentracija proteina metodom predviđenom za analizu proteina u krutim uzorcima koja je opisana u poglavlju.

### 3.3.1. Ekstrakcija proteina iz krutih uzoraka

Provedbom hidrolize proteina zaostali su talozi iz kojih je trebalo ekstrahirati proteine. Ekstrakcija se provodila dodatkom 366  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode, 10%-tne otopine NaCl te 60  $\mu\text{L}$  NaOH u isprani talog. Epruvete su zatim stavljene na tresilicu podešenu na 40  $^{\circ}\text{C}$ , 1100 o/min u vremenu od jednog sata. Nakon protekle inkubacije, uzorci su centrifugirani tijekom 5 minuta pri 4  $^{\circ}\text{C}$  i 14 000 o/min. Koncentracija proteina određena je u supernatantu Bradford metodom.

### 3.3.2. Operacijska stabilnost enzima

Operacijska stabilnost enzima procjenjivala se iz izmjerenih aktivnosti enzima tijekom provedbe procesa u reaktoru. Kako bi se opisala inaktivacija enzima, korištena su tri modela inaktivacije: kinetika 1. i 2. reda te troparametarski model. Ovi modeli prikazuju ovisnost određenih parametara i omogućuju procjenu stabilnosti korištenih enzima. Tri spomenuta modela ukazuju na pad aktivnosti koji se događao tijekom vremena od 120 minuta u kojima je reakcija praćena.

Kinetika prvog reda prikazana je sljedećom jednačbom:

$$dA = -k_d A \quad (2)$$

Kinetika drugog reda opisuje se sljedećom jednačbom:

$$dA = -k_d A^2 \quad (3)$$

Troparametarski model dan je sljedećim izrazom:

$$A = A_0 [(\alpha e^{-k_{d1}t}) + (1 - \alpha)e^{-k_{d2}t}] \quad (4)$$

pri čemu je  $A$  aktivnost enzima ovisna o početnoj vrijednosti aktivnosti enzima ( $A_0$ ),  $\alpha$  je udio izoenzima, dok su  $k_{d1}$  i  $k_{d2}$  inaktivacijske konstante.

### 3.4. Obrada podataka

Obrada podataka provedena je u programskom paketu *Scientist* koji omogućava procjenu parametara modela na temelju dobivenih eksperimentalnih rezultata te pretpostavljenih modela. Jedna od upotrijebljenih metoda je metoda najmanjih kvadrata koja se temelji na principu dobivanja najpogodnijih vrijednosti nagiba  $a$  i odsjeka pravca  $b$ . U općem slučaju nije moguće pronaći pravac koji prolazi kroz sve dobivene točke, već je potrebno pronaći onaj koji prolazi najbliže svim dobivenim točkama, a taj je uvjet moguće ostvariti ukoliko je suma kvadrata udaljenosti točaka od pravca što manja. Dobiveni pravac naziva se regresijski pravac i daje linearnu korelaciju između skupa podataka.<sup>32</sup> Druga korištena metoda je simpleks metoda koja pripada numeričkim metodama pomoću koje je moguće odrediti postoji li rješenje ili se može pronaći najbolje rješenje i to provedbom određenog broja iteracija ukoliko je to potrebno. Upotrebom te metode provodi se linearno optimiranje i vrši se u nekoliko koraka. Svodi se na princip odabira mogućeg osnovnog rješenja čija se optimalnost ispituje i ukoliko to nije ostvareno, provode se slijedeće iteracije do postizanja najoptimalnijeg osnovnog rješenja.<sup>33</sup> U programu *Scientist* rješavanje diferencijalnih jednadžbi odvija se pomoću numeričkih metoda poput Runge-Kutta IV, Eulerove metode i drugih. Kako bi se provela statistička analiza dobivenih rezultata, korišten je kriterij standardne devijacije ( $R^2$ ) koji se često koristi.

Kriterij  $MSC$ , još je jedan od kriterija upotrijebljenih u statističkoj analizi, izražen je slijedećom jednadžbom:

$$MSC = \ln \left( \frac{\sum_{i=1}^n w_i (Y_{exp,i} - \overline{Y_{exp}})^2}{\sum_{i=1}^n w_i (Y_{exp,i} - Y_{rač,i})^2} \right) - \frac{2 \cdot p}{n} \quad (5)$$

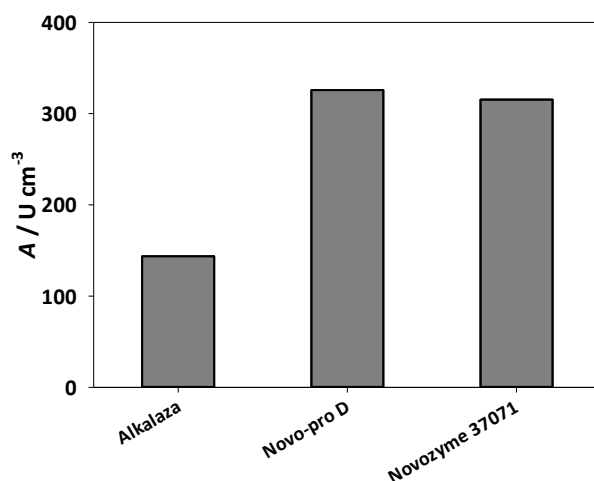
U navedenoj jednadžbi,  $w_i$  se odnosi na parametre za uzorke podataka,  $Y_{exp,i}$  su eksperimentalno dobiveni podatci, dok je  $\overline{Y_{exp}}$  oznaka za aritmetičku sredinu tih vrijednosti. U drugom članu,  $n$  je ukupan broj podataka, dok je  $2p$  ukupan broj procijenjenih parametara.<sup>34</sup>

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj rada je bio odrediti mogućnost upotrebe tri komercijalne proteaze proizvođača Novozyme (Alkalaza, Novo-Pro D i Novozyme 37071) u procesu deproteinizacije otpada ljuski kozica. Svi eksperimenti provedeni su pri 40 °C, pri koncentraciji enzima 0,5 U / 10 mg otpada kozica. Kao prvi korak trebalo je odrediti aktivnost enzima u pripravcima dobivenih od proizvođača kako bi se proces mogao pokrenuti s točno određenom koncentracijom biokatalizatora. Potom su se napravili eksperimenti u reaktoru u trajanju od dva sata, pri kojima je određivana koncentracija proteina i aktivnost enzima u definiranim vremenskim intervalima.

### 4.1. Određivanje aktivnosti proteaza

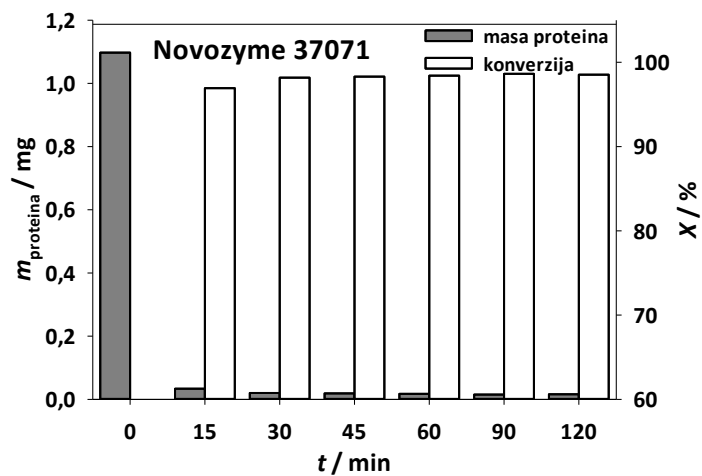
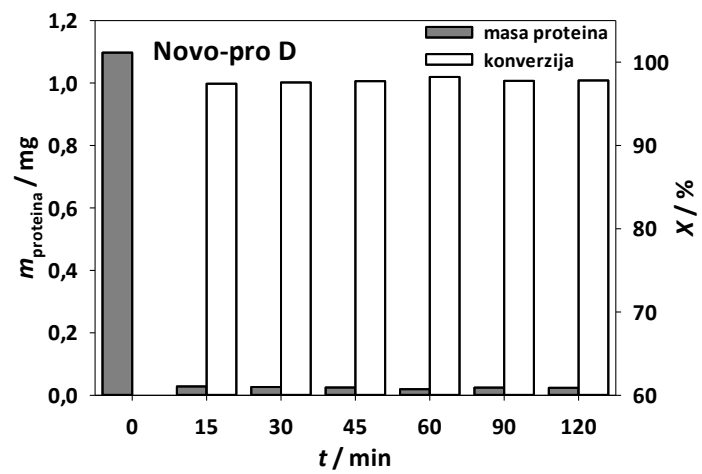
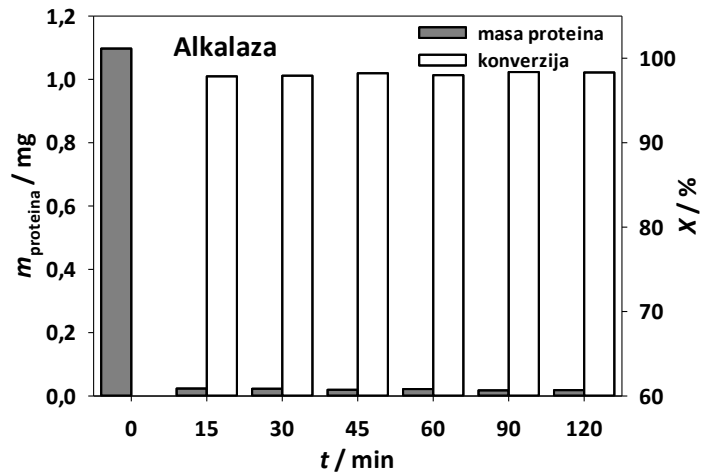
Prema metodi opisanoj u *Poglavlju 3.2.1.* određivana je aktivnost tri proteaze (*Slika 4.1.*). Prema dobivenim rezultatima, najveću aktivnost pokazala je proteaza naziva Novo-Pro D, zatim ponešto manju Novozyme 37071, dok je najmanju aktivnost pokazala Alkalaza.



*Slika 4.1.* Usporedba aktivnosti ispitivanih proteaza ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8).

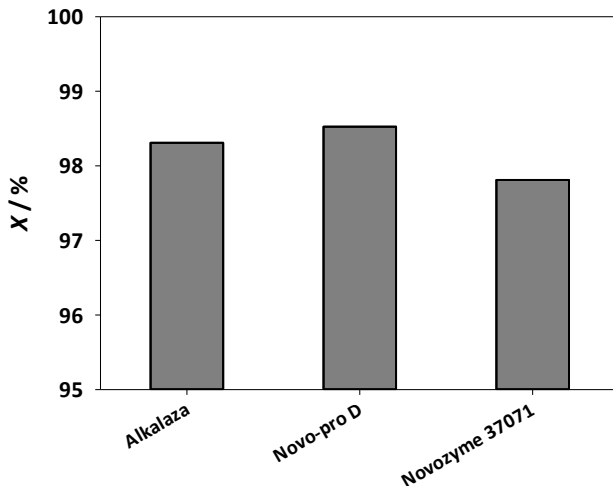
### 4.2. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru

Hidrolize proteina u ostacima kozica provela se u šaržnom reaktoru pri koncentraciji enzima od 0,5 U / 10 mg ostataka kozica. Rezultati su prikazani na *Slici 4.2.* tako da iskazuju masu proteina izraženu u miligramima te konverziju u postotcima.



Slika 4.2. Masa proteina i konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 20\text{ mg}$ ,  $A_{\text{protease}} = 1\text{ U}$ ).

Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su ostvarene visoke vrijednosti konverzije već nakon 15 minuta eksperimenta. Iz navedenog se može zaključiti da su korišteni enzimi izrazito aktivni u hidrolizi proteina u ostacima kozica, te da je moguće i korištenje i manje koncentracije enzima.

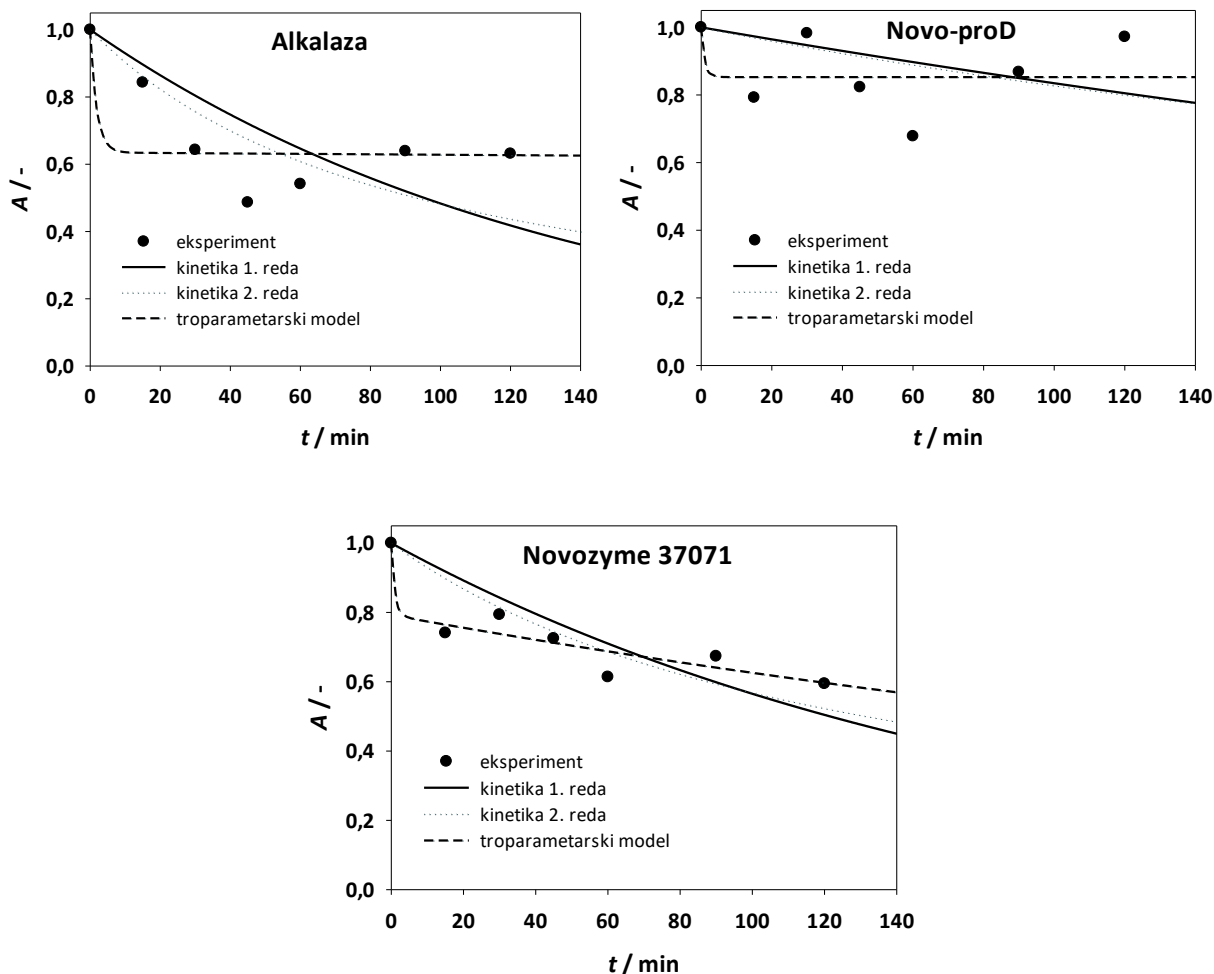


*Slika 4.3.* Usporedba konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 20\text{ mg}$ ,  $A_{\text{proteaze}} = 1\text{ U}$ ).

Analizom i usporedbom dobivenih obrađenih rezultata (*Slika 4.3.*) primjetno je da su kod sve tri proteaze ostvarene konverzije preko 97%, dok su kod Alkalaze i Novo-Pro D postignute konverzije preko 98%. Najveća konverzija postignuta je provedbom reakcije s proteazom Novo-Pro D, dok je najniža vrijednost konverzije postignuta upotrebom Novozyme 37071.

#### 4.2.1. Operacijska stabilnost enzima

Na *Slici 4.4.* prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti prilikom hidrolize proteina u ostacima kozica. Može se primijetiti da aktivnost najviše pada na početku provedbe eksperimenta za sva tri enzima. Kod Alkalaze pada tijekom prvih pola sata nakon čega je aktivnost enzima stabilna. Dosta raspršenosti u mjerjenjima je prikazano prilikom mjerenja aktivnosti za enzim Novo-Pro D. Navedeno je vjerojatno eksperimentalna pogreška, ali se može uočiti da je ovaj enzim poprilično stabilan. Enzim Novozyme 37071 je pokazao veći pad aktivnosti u prvih 15 minuta reakcije nakon čega aktivnost polagano pada.



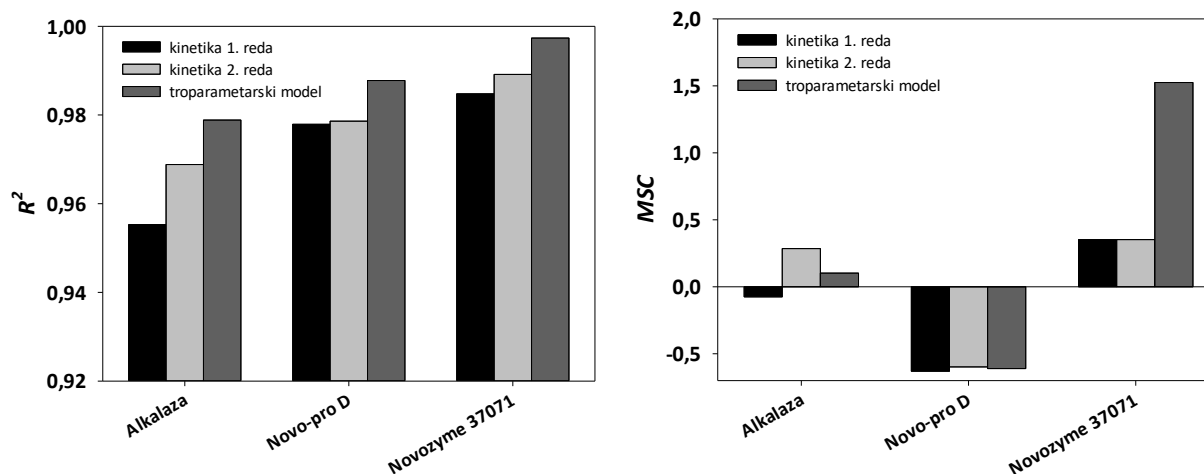
Slika 4.4. Operacijska stabilnost enzima tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 20\text{ mg}$ ,  $A_{\text{proteaze}} = 1\text{ U}$ ).

Tablica 4.1. Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te troparametarskog modela inaktivacije proteaza u reaktoru.

Enzim	Model 1. reda	Model 2. reda	Troparametarski model		
	$k_d/\text{min}^{-1}$	$k_d/\text{min}^{-1}$	$\alpha$	$k_{d1}/\text{min}^{-1}$	$k_{d2}/\text{min}^{-1}$
Alkalaza	$7,27 \cdot 10^{-3}$	$1,07 \cdot 10^{-2}$	0,64	$1,03 \cdot 10^{-4}$	0,54
Novo-Pro D	$1,81 \cdot 10^{-3}$	$2,08 \cdot 10^{-3}$	0,15	1	$2,44 \cdot 10^{-21}$
Novozyme 37071	$5,70 \cdot 10^{-3}$	$7,59 \cdot 10^{-3}$	0,79	$2,36 \cdot 10^{-3}$	1

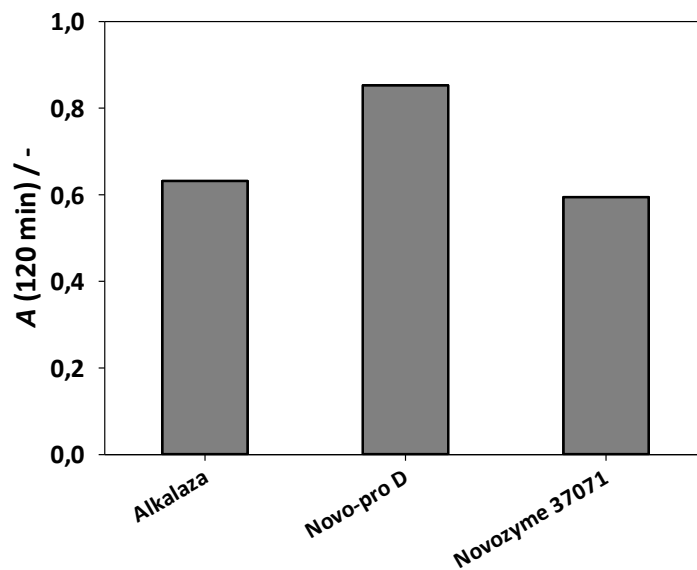
Prikazana inaktivacija enzima opisana je modelima 1. (jedn. 2), 2 reda (jedn. 3), te troparametarskim modelom. U *Tablici 4.1.* prikazani su procijenjeni parametri modela za sva tri enzima. Za model prvog i drugog reda procijenjena je vrijednost konstanti brzine inaktivacije ( $k_d$ ), dok je za troparametarski model određen udio izoenzima koji se označava s  $\alpha$ , te su dodatno procijenjene vrijednosti konstanti inaktivacije ( $k_{d1}$  i  $k_{d2}$ ) za pojedine izoenzime.

Standardna devijacija daje mjeru raspršenosti podataka u određenom skupu podataka.<sup>35</sup> Veća vrijednost tog parametra ukazuje na veće slaganje s modelom. Također, korišten je i već spomenuti parametar *MSC* (*Model Selection Criterion*) koji proizlazi iz statističke metode Akaike informacijskog kriterija predstavljene 1971. godine. *MSC* predstavlja modifikaciju tog kriterija i veća vrijednost označava bolje slaganje s modelom.<sup>36</sup> Prema statističkom parametru standardne devijacije, za sva tri enzima kinetiku reakcije bi najbolje opisivao troparametarski model. Prema *MSC* kriteriju za reakciju kataliziranu Alkalazom, najviše bi odgovarao model kinetike drugog reda, dok bi za Novozyme 37071 prema tom kriteriju najbolji odabir bio troparametarski model. U slučaju enzima Novo Pro-D, dobiju se negativne vrijednosti za sva tri modela što bi upućivalo na to da modeli nisu dobri. No, uspoređujući dobivene rezultate statističke analize s rezultatima prikazanim na *Slici 4.4.*, može se zaključiti da reakcije katalizirane Alkalazom i Novozymeom 37071 najbolje opisuje troparametarski model, dok je za enzim Novo-Pro D najpogodniji odabir kinetika 2. reda.



*Slika 4.5.* Statistička analiza modela inaktivacije proteaza.

Nakon provedene reakcije hidrolize, ispitana je preostala aktivnost biokatalizatora. Na *Slici 4.6.* je vidljivo da je kod sva tri enzima aktivnost smanjena nakon 120 minuta u odnosu na početnu aktivnost te da je kod Novo-Pro D aktivnost najviša i vrijednost joj je iznad 83%, dok je za Alkalazu iznosila nešto iznad 60%. Za Novozyme 37071 aktivnost je najniža u usporedbi s preostala dva enzima te je iznosila 58%. Primjetan je istovjetan redoslijed onome dobivenom za konverziju jer su također najviše vrijednosti ostvarene kod proteaze Novo-Pro D, zatim kod Alkalaze te je na posljednjem mjestu po postotku ostvarene konverzije Novozyme 37071.



*Slika 4.6.* Usporedba preostale aktivnosti enzima nakon hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirane proteazama u kotlastom reaktoru ( $t = 120 \text{ min}$ ,  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 200 \mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 20 \text{ mg}$ ,  $A_{\text{proteaze}} = 1 \text{ U}$ ).



## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata moguće je donijeti sljedeće zaključke:

- 1) Pri definiranim uvjetima od 40 °C, pH vrijednosti 8 Novo-Pro D i Novozyme 37071 pokazale su više vrijednosti volumne aktivnosti u odnosu na Alkalazu.
- 2) Sve tri proteaze postigle su konverziju veću od 90 % već nakon 15 minuta provedene reakcije hidrolize proteina u ostatcima kozica.
- 3) Najviša vrijednost konverzije ostvarila se u reakciji s Novo-Pro D, zatim u reakciji s Alkalazom, dok je najniža vrijednost od upotrijebljena tri biokatalizatora postignuta u reakciji s biokatalizatorom Novozyme 37071.
- 4) Kod rezultata dobivenih prilikom ispitivanja operacijske stabilnosti, vidljiva su raspršenja kod sve tri proteaze. Najmanji pad je ostvaren kod Novo-Pro D, dok je najveći kod biokatalizatora Novozyme 37071. Primjetan je suodnos sličnosti s rezultatima za konverziju. Također, kod niti jednog enzima aktivnost nije pala ispod 50% početne vrijednosti aktivnosti.
- 5) Statističkom analizom i usporedbom grafova dobivenih za operacijsku stabilnost enzima, može se zaključiti da pad aktivnosti kod Alkalaze i Novozyme 37071 najbolje opisuje troparametarski model, dok je za Novo-Pro D najpogodniji model kinetike drugog reda.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da su proteaze bile uspješne u reakciji hidrolize proteina iz otpada ljuski kozica u definiranim uvjetima u kojima je provedena proteolitička reakcija. Iz rezultata je uočljivo, odnosno može se zaključiti da je od upotrijebljene tri komercijalne proteaze najbolji odabir Novo-Pro D uslijed najviše ostvarene konverzije i najveće aktivnosti nakon 120 minuta provedene reakcije hidrolize. Brojne su prednosti korištenja ove metode te je moguće provesti daljnja istraživanja koja mogu dodatno optimizirati sami proces i omogućiti da se metoda koristi komercijalno. Na taj način bi se izbjeglo korištenje određenih otapala koje je nužno koristiti pri kemijskim metodama izdvajanja proteina, tekuća frakcija mogla bi se onda dodatno iskoristavati, a moguće su i uštede energije jer je već u kratkom vremenu postignuta visoka vrijednost konverzije.

## 6. LITERATURA

1. Senphan, T., & Benjakul, S., Compositions and yield of lipids extracted from hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as affected by prior autolysis. *Food Chemistry*, **134**(2), (2012) 829–835.
2. Nirmal, N. P., Santivarangkna, C., Rajput, M. S., & Benjakul, S., Trends in shrimp processing waste utilization: An industrial prospective. *Trends in Food Science & Technology*, **103** (2020) 20-35.
3. Findrik Blažević, Z., Bioreaktori, Interna skripta za dio kolegija Reaktori i bioreaktori, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2017).
4. Sumner, J. B. The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease. Preliminary Paper. *The Journal of Biological Chemistry*, **69** (1926) 435-441.
5. Bošković, M. i Podhorsky R.: ENZIMI. Tehnička enciklopedija, sv. 5, Zagreb, (1976), str. 334–345.
6. enzimi. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, (2021) (Pristup 27.08.2022.)
7. Bugg, T. D. H. , Enzymes: General Properties, u John Wiley and Sons, Ltd. (ur.). *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley, UK, (2001), str. 1-8.
8. Findrik Blažević, Z., Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2013).
9. Ramberg, Peter J.. "Emil Fischer". *Encyclopedia Britannica*, (11 Srpnja. 2022.), <https://www.britannica.com/biography/Emil-Fischer>. (Pristup 02.09.2022.)
10. Johnson, L. N., & Petsko, G. A. David Phillips (1924—99). *Nature*, **399** (1999) 26–26.
11. Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **44**(2) (1958) 98–104.
12. Jencks, W. P. Binding Energy, Specificity, and Enzymic Catalysis: The Circe Effect. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **43** (2006) 219–410.
13. Blanco, A., , Blanco, G. Enzymes. Blanco, A., , Blanco, G. (ur.) *Medical Biochemistry*, Academic Press, UK, SAD, (2017), str. 153–175.

14. Stern, K.G., On the absorption spectrum of catalase. *J. Biol. Chem.*, **121(2)** (1937) 561-572.
15. Palmer, T., & Bonner, P. L. 6 – An Introduction to Bioenergetics, Catalysis and Kinetics. Palmer, T., & Bonner, P. L. (ur.) *Enzymes, Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*. 2nd Edition, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, (2011), str. 85–104.
16. Boyer, P. D. The Atp Synthase—A Splendid Molecular Machine. *Annual Review of Biochemistry*, **66(1)** (1997), 717–749.
17. Cremonesi, P., & Casoli, A. Enzymes as tools for conservation of works of art. *Journal of Cultural Heritage*, **50** (2021), 73–87.
18. Feng, S., Hao Ngo, H., Guo, W., Woong Chang, S., Duc Nguyen, D., Cheng, D., Varjani S., Lei Z., Liu, Y. Roles and applications of enzymes for resistant pollutants removal in wastewater treatment. *Bioresource Technology*, **335** (2021), 125278.
19. Triplett, T., Garrison, K., Marshall, N., Donkor M., Blazeck J., Lamb C., Qerqez A., Dekker J., Tanno Y., Lu W.C., Karamitros C., Ford K., Tan B., Zhang X., McGovern K., Coma S., Kumada Y., Yamany M., Sentandreu E., Fromm G., Tiziani S., Schreiber T., Manfredi M., Ehrlich L., Stone E., Georgiou G., Reversal of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated cancer immune suppression by systemic kynurenine depletion with a therapeutic enzyme. *Nature Biotechnology* **36** (2018), 758–764.
20. Nielsen, P. H., Kuilderd, H., Zhou, W., Lu, X. 5 - Enzyme biotechnology for sustainable textiles, u Blackburn R.S. (ur.), *Woodhead Publishing Series in Textiles. Sustainable Textiles*, 1st Edition, Woodhead Publishing, Cambridge, (2009), str. 113–138.
21. Pandey, A., Webb, C., Soccol, C. R., & Larroche, C. *Enzyme Technology*, Springer Science, New York, (2006).
22. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A. and Ashraf M. Microbial Proteases Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7** (2019), 110.
23. O.P. Ward, 3.49 - Proteases,u Murray Moo-Young (ur.), *Comprehensive Biotechnology* Second Edition, Academic Press, (2011), str. 571-582.
24. [https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website-document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis\\_brochure\\_Proteases\\_.pdf](https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website-document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Proteases_.pdf) (pristup 03.09.2022.)

25. Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, **587(8)** (2013), 1155–1163.
26. Banerjee, G., & Ray, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **33(2)** (2017) , 119–143.
27. Dunn BM. Anatomy and pathology of HIV-1 peptidase. *Essays Biochem.* **38** (2002), 113-27.
28. Palmeira, V. F., Alviano, D. S., Braga-Silva, L. A., Goulart, F. R. V., Granato, M. Q., Rozental, S., Alviano C.S., Santos A.L.S., Kneipp, L. F. HIV Aspartic Peptidase Inhibitors Modulate Surface Molecules and Enzyme Activities Involved with Physiopathological Events in *Fonsecaea pedrosoi*. *Frontiers in Microbiology*, **8**:918 (2017), 1-12.
29. Song, E.-H., Shang, J., & Ratner, D. M. (2012). Polysaccharides, u *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 1st Ed, Matyaszewski, K., Möller, M. (ur.), Elsevier Science, Amsterdam, (2012), Vol. 9, str. 137–155.
30. Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., & Amrane, A. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods—a review. *Food Technology and Biotechnology*, **51(1)** (2013), 12-25.
31. Rao, M. S., Muñoz, J., & Stevens, W. F. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **54(6)** (2000), 808–813.
32. Begović Kovač E., Jerković M., *Statističke i numeričke metode. Materijali za seminare iz kolegija: Statističke i numeričke metode, Numeričke i statističke metode, Osnove statistike okoliša i numeričke metode*, Zavod za matematiku, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, (2017).
33. simpleks-algoritam. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža*, (2021). (Pristup 11.09.2022.)
34. <https://nirpyresearch.com/akaike-information-criterion-for-model-selection/> (Pristup 11.09.2022.)
35. Woolf, B. Rapid Calculation of Standard Deviations. *Nature*, **164(4165)** (1949), 360–361.
36. McQuarrie, A., Shumway, R., & Tsai, C.-L. The model selection criterion AICu. *Statistics & Probability Letters*, **34(3)** (1997), 285–292.

## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

### Simboli

$A$  – aktivnost biokatalizatora

$A_0$  – početna aktivnost biokatalizatora

$A_{protease}$  – jedinica aktivnosti enzima [U]

$A_v$  – volumna aktivnost [U/mL]

$\alpha$  – udio izoenzima

$d$  – promjer kivete [cm]

$\epsilon_{660}$  - ekstincijski koeficijent tirozina pri valnoj duljini od 660 nm [ $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ]

$k_d$  – konstanta inaktivacije kod modela kinetike 1. i 2. reda [ $\text{min}^{-1}$ ]

$m_{proteina}$  – masa proteina [mg]

$m_{kozica}$  – masa kozica [mg]

pH – mjera kiselosti odnosno lužnatosti vodenih otopina

$R^2$  – standardna devijacija

$T$  – temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]

$t$  – vrijeme [min]

$V_r$  – ukupni volumen reaktora [mL]

$V_{reaktor}$  – volumen reaktora [ $\mu\text{L}$ ]

### Kratice

ABS - apsorbancija

ATP – adenzin trifosfat

BSA – bovine serum albumin

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

ES – enzim-supstrat kompleks

EP – enzim-produkt kompleks

HCl – klorovodična kiselina

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*, virus humane imunodeficijencije

LCA – *Life Cycle Assessment*, procjena životnog ciklusa

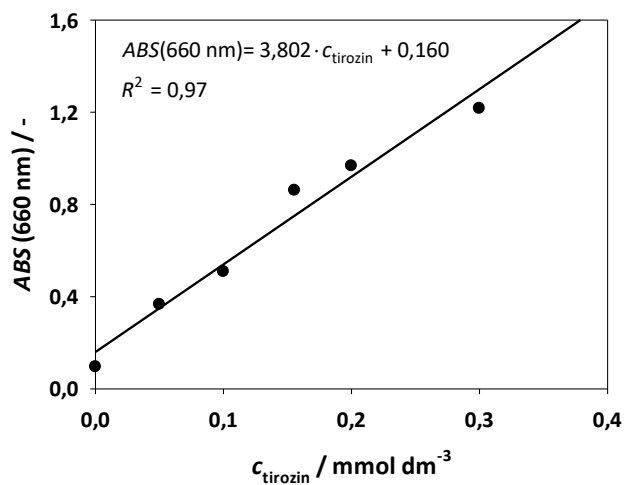
MSC – statistički parametar, *Model Selection Criterion*

NaOH – natrijeva lužina

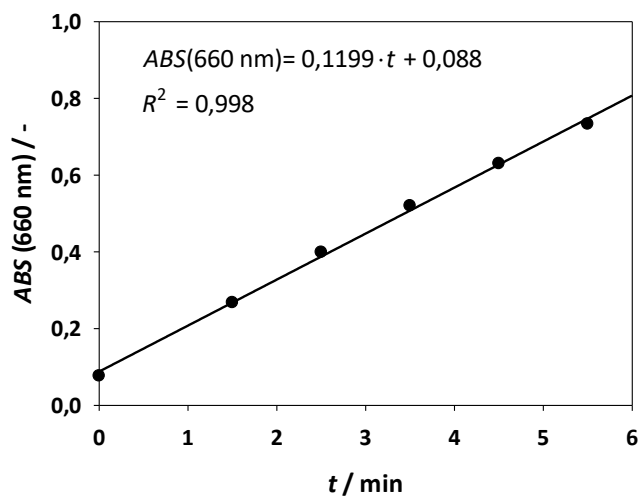
NaCl – natrijev klorid

TCA – trikloroocetna kiselina

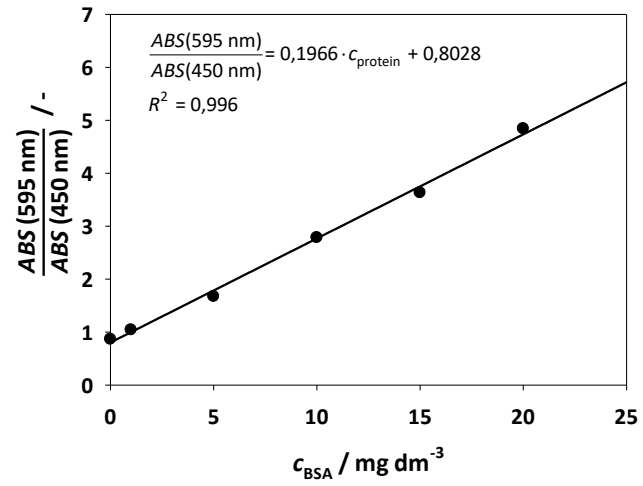
## 8. PRILOZI



Slika 8.1. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije tirozina.



Slika 8.2. Primjer rezultata mjerenja aktivnosti proteaze.



Slika 8.3. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije proteina.



## 9. ŽIVOTOPIS

Marta Pinčić [REDACTED] 2015. godine završava Osnovnu školu Zemunik u mjestu Zemunik Donji te iste godine upisuje prirodoslovno-matematički smjer u Gimnaziji Franje Petrića u Zadru. Nakon završetka srednje škole, 2019. godine upisuje studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.