

Karakterizacija sirovog ekstrakta enzima endo-1,4-ksilanaza proizvedenog fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima

Bajo, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:164737>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Bajo

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Bajo

KARAKTERIZACIJA SIROVOG EKSTRAKTA ENZIMA *endo*-1,4-KSILANAZA
PROIZVEDENOG FERMENTACIJOM *Trametes versicolor* NA ČVRSTIM NOSAČIMA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Bruno Zelić
2. dr. sc. Anita Šalić
3. doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, rujan 2021.

Veliku zahvalnost prije svega dugujem mentoru prof. dr. sc. Bruni Zeliću na vodstvu, izdvojenom vremenu i mnoštvu savjeta pri izradi ovog rada. Također se najiskrenije želim zahvaliti dr. sc. Aniti Šalić i Tei Sokač, mag. ing. oecoing. za neposredno vodstvo, razumijevanje, mnogobrojna objašnjenja i odgovore na sve nejasnoće s kojim sam se susrela.

Hvala mojoj obitelji, dečku i prijateljima na stalnoj podršci, razumijevanju i ljubavi koji moj život čine bogatijim i ljepšim.

Na kraju, najveću zahvalu za sve što sam postigla dosada dugujem svojim roditeljima koji su moj najveći oslonac u životu i koji su uvijek tu za mene!

SAŽETAK

Ksilanaze su biokatalizatori koji pripadaju velikoj skupini enzima koje nazivamo hidrolazama. Vrlo su značajne u industrijskoj primjeni, a njihova upotreba je danas u sve većem porastu. Njihov značaj prepoznat je u industriji celuloze i papira u postupcima izbjeljivanja celulozne mase što rezultira smanjenom upotrebom opasnih kemikalija. Osim u industriji papira, ksilanaze su važne i u prehrambenoj, kemijskoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji. Prisutnost ksilanaza u reakcijskom mediju, kao i ostalih enzima kao katalizatora, omogućuje odvijanje (bio)kemijskih reakcija u blagim uvjetima, a uz to su sami enzimi obnovljivi i biorazgradivi. Zbog tih prednosti se može reći da su enzimi, a ujedno i ksilanaze ekološki prihvatljivi, pogotovo u usporedbi s kemijskim katalizatorima koje sve češće zamjenjuju i čiju upotrebu smanjuju. Izvor ksilanaza mogu biti gljive, bakterije, kvasci te razne životinje poput puževa, rakova i kukaca, pri čemu su glavni komercijalni izvor ksilanaza nitaste gljive. Najčešće se ksilanaze proizvode iz mikroorganizama submerznom fermentacijom, ali se sve češće kao tehnika proizvodnje enzima koristi i fermentacija na čvrstim nosačima. Proizvodnjom ksilanaza iz različitih izvora, različitim procesima i pri različitim uvjetima dobivaju se ksilanaze različitih svojstava i aktivnosti. Kako bi se odredila svojstva enzima i posljedično omogućila njegova industrijska upotreba, potrebno je provesti karakterizaciju enzima. Na aktivnost enzima utječu mnogi čimbenici kao što su temperatura, pH-vrijednost, vrsta supstrata korištena pri uzgoju mikroorganizama iz kojih se enzim dobiva, kemijsko djelovanje prisutnih tvari itd.

Cilj ovog rada bio je karakterizirati sirovi ekstrakt enzima *endo*-1,4-ksilanaza proizvedenog fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima. Kako je jedno od najvažnijih svojstava enzima njegova aktivnost, upravo je određivanje aktivnosti enzima *endo*-1,4-ksilanaze bio početni korak u njegovoj karakterizaciji. Osim toga određeni su temperaturni i pH optimum, temperaturna stabilnost te utjecaji određenih metalnih iona, organskih otapala, reagensa i supstrata na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza.

Ključne riječi: *Trametes versicolor*, fermentacija na čvrstim nosačima, *endo*-1,4-ksilanaza, aktivnost enzima, karakterizacija

SUMMARY

Xylanases are biocatalysts that belong to a large group of enzymes commonly known as hydrolases. Their application in industry is significant and is rapidly growing. Their significance was recognized in the pulp and paper industry in the process of biobleaching of kraft pulp which reduces the use of toxic chemicals. Moreover, xylanases are also important in the chemical, textile, pharmaceutical, and food industries. The presence of xylanases in the reaction medium, like that of other enzymes, allows (bio)chemical reactions to take place under mild conditions. They are also renewable and biodegradable. Due to these advantages, it could be said that enzymes, as well as xylanases, are environmentally friendly, especially when compared to chemical catalysts that they more and more replace or reduce the use of. Sources of xylanases are fungi, bacteria, yeasts, and a variety of animals such as snails, crabs, and bugs from which the main commercial source of xylanases are filamentous fungi. The most common production process of xylanases is submerged fermentation, although solid-state fermentation is also being used widely. Xylanases are produced from different sources, with different processes, and under different conditions, resulting with different properties and activities. In order to determine the properties of an enzyme and consequently its use in industry, it is necessary to conduct the characterization of the enzyme. Many factors affect the enzyme activity such as temperature, pH value, type of substrate used for cultivation of microorganisms from which enzymes are obtained, chemical effect of present substances, and so on.

The aim of this work was to characterize the crude extract of *endo*-1,4-xylanase enzyme produced by solid-state fermentation of *Trametes versicolor*. Since one of the most important properties of enzymes is their activity, estimation of activity of the *endo*-1,4-xylanase enzyme was the first step of its characterization. Besides this, temperature and pH optimum, temperature stability, and the effects of certain metal ions, organic solvents, reagents, and substrate on the activity of *endo*-1,4-xylanase are determined in this work.

Key words: *Trametes versicolor*, solid-state fermentation, *endo*-1,4-xylanase, enzyme activity, characterization

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. Enzimi | 3 |
| 2.2. Enzimski kinetika | 6 |
| 2.3. Aktivnost enzima..... | 8 |
| 2.4. Enzim ksilanaza..... | 9 |
| 2.5. Proizvodnja enzima fermentacijom na čvrstim nosačima..... | 11 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 13 |
| 3.1. Materijali | 13 |
| 3.1.1. Kemikalije..... | 13 |
| 3.1.2. Aparatura..... | 14 |
| 3.2. Metode..... | 14 |
| 3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ksiloze..... | 14 |
| 3.2.2. Mjerenje aktivnosti enzima ksilanaza | 16 |
| 3.2.3. Linearizirani Bradfordov test za određivanje koncentracije proteina..... | 18 |
| 3.2.4. Ispitivanje temperaturne stabilnosti i utjecaja temperature na aktivnost enzima ksilanaza | 19 |
| 3.2.5. Ispitivanje utjecaja pH-vrijednosti na aktivnost enzima ksilanaza | 19 |
| 3.2.6. Ispitivanje utjecaja metalnih iona na aktivnost enzima ksilanaza | 20 |
| 3.2.7. Ispitivanje utjecaja organskih otapala na aktivnost enzima ksilanaza..... | 21 |
| 3.2.8. Ispitivanje utjecaja različitih reagensa na aktivnost enzima ksilanaza | 21 |
| 3.2.9. Ispitivanje utjecaja različitih supstrata na aktivnost enzima ksilanaza | 22 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 23 |
| 4.1. Aktivnost enzima <i>endo</i> -1,4-ksilanaza porijeklom iz <i>Trametes versicolor</i> | 23 |
| 4.2. Utjecaj temperature na aktivnost enzima <i>endo</i> -1,4-ksilanaza porijeklom iz <i>Trametes versicolor</i> i temperaturna stabilnost | 24 |
| 4.3. Utjecaj pH-vrijednosti na aktivnost enzima <i>endo</i> -1,4-ksilanaza porijeklom iz <i>Trametes versicolor</i> | 26 |
| 4.4. Utjecaj metalnih iona na aktivnost enzima <i>endo</i> -1,4-ksilanaza porijeklom iz <i>Trametes versicolor</i> | 27 |
| 4.5. Utjecaj organskih otapala na aktivnost enzima <i>endo</i> -1,4-ksilanaza porijeklom iz <i>Trametes versicolor</i> | 28 |

| | |
|--|----|
| 4.6. Utjecaj različitih reagensa na aktivnost enzima <i>endo</i> -1,4-ksilanaza porijeklom iz <i>Trametes versicolor</i> | 30 |
| 4.7. Utjecaj različitih supstrata na aktivnost enzima <i>endo</i> -1,4-ksilanaza iz <i>Trametes versicolor</i> | 30 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 33 |
| 6. LITERATURA | 34 |
| 7. PRILOZI..... | 36 |
| ŽIVOTOPIS..... | |

1. UVOD

Enzimi, odnosno biokatalizatori su proteinske molekule koje proizvode živi organizmi, a mogu biti aktivni i izvan žive stanice. Od iznimne su važnosti jer ubrzavaju kemijske reakcije koje bi se bez njih odvijale znatno sporije ili zahtijevale ekstremne uvjete koji su nespojivi s opstankom živih organizama.¹ Ističu se zbog svojih brojnih prednosti, a neke od njih su to što djeluju pri blagim reakcijskim uvjetima pri kojima funkcioniraju živi organizmi, obnovljivi su i biorazgradivi, a reakcije ubrzavaju milijun ili više puta. Jedna od njihovih glavnih karakteristika je aktivnost koja se definira kao brzina reakcije pretvorbe supstrata u produkt koja se može pripisati katalitičkom djelovanju enzima.² Na aktivnost enzima utječu mnogi čimbenici poput temperature, pH-vrijednosti, prirode supstrata, kemijskog djelovanja prisutnih tvari itd.

Ksilanaze su enzimi koji kataliziraju razgradnju ksilana, jednog od najzastupljenijih polisaharida koji čine hemicelulozu. Ksilanaze su pronašle svoju važnu ulogu u mnogim industrijskim granama poput industrije celuloze i papira te prehrambene, kemijske, farmaceutske i tekstilne industrije.³ Izvor ksilanaza su većinom mikroorganizmi, ali se ksilanaze mogu pronaći i u morskim algama, praživotinjama, rakovima, insektima, puževima i sjemenu kopnenih biljaka.⁴ Međutim, njihov najznačajniji izvor su nitaste gljive jer izlučuju ksilanazu u medij na kojem se uzgajaju te se na taj način ostvaruje značajnija proizvodnja enzima. Dva osnovna procesa proizvodnje enzima mikrobnog podrijetla, pa tako i ksilanaze, su submerzna fermentacija i fermentacija na čvrstim nosačima. Za proizvodnju ksilanaze se najčešće koristi submerzna fermentacija, ali je proizvodnja ksilanaza fermentacijom na čvrstim nosačima u porastu zbog brojnih prednosti.⁴ Fermentacija na čvrstim nosačima je proces koji uključuje rast mikroorganizama na vlažnim čvrstim česticama između kojih je raspoređena kontinuirana plinska faza i minimalna količina vode.⁵ Neke od brojnih prednosti fermentacije na čvrstim nosačima su ekološka učinkovitost, jer se tijekom procesa kao supstrat najčešće troši čvrsti agroindustrijski otpad, manja količina otpadne vode koja tijekom proizvodnje nastaje te povećana proizvodnja željenih produkata u kraćem vremenu.

Svojstva enzima, kao što su aktivnost, procesni uvjeti pri kojima je aktivnost maksimalna i specifičnost prema različitim supstratima ovise o načinu i uvjetima proizvodnje te o izvorima iz kojih su enzimi dobiveni. Kako bi se enzim na najbolji mogući način koristio u industrijskoj proizvodnji, potrebno je poznavati njegova svojstva. Zbog toga je nužno provesti karakterizaciju enzima.

U ovom radu karakteriziran je sirovi ekstrakt enzima *endo*-1,4-ksilanaza proizvedene fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima. Prvi korak u karakterizaciji bio je određivanje aktivnosti enzima. Nakon toga ispitan je utjecaj temperature i pH-vrijednosti na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza te su određene vrijednosti temperature i pH pri kojima je aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza najveća. Osim toga, ispitano je kako prisutnost određenih tvari (metalnih iona, organskih otapala i određenih reagensa) utječe na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza. Također, određena je aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza za različite supstrate. Dobiveni rezultati mogli bi poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja povezana s poboljšanjem svojstava enzima *endo*-1,4-ksilanaza te razvojem procesa u kojima se ovaj enzim može koristiti kao katalizator.

2. TEORIJSKI DIO

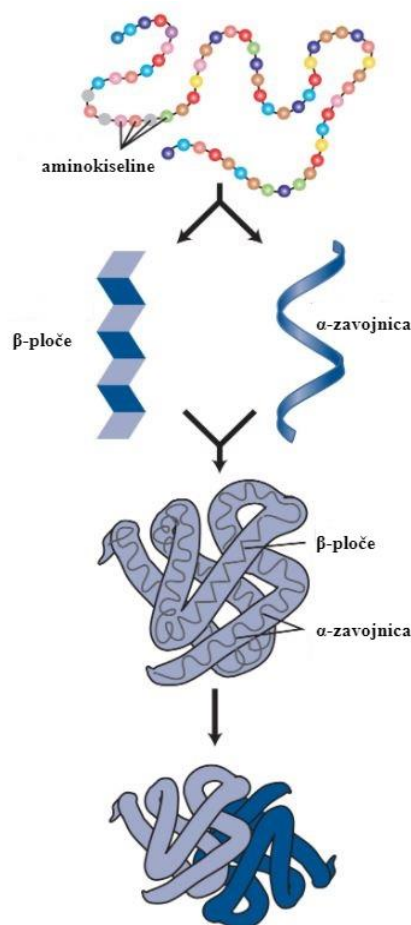
2.1. Enzimi

Enzimi su proteinske molekule koje kataliziraju procese koji se odvijaju u stanicama, a proizvode se izolacijom iz različitih živih organizama koji ih sintetiziraju. Enzimi mogu biti aktivni u i izvan stanice, a s obzirom na mjesto u stanici gdje enzim nastaje, razlikujemo unutarstanične i vanstanične enzime. Enzimi su važni jer ubrzavaju kemijske reakcije koje bi se bez njih odvijale znatno sporije, te zahtijevale veće temperature i jake kisele ili lužnate uvjete koji su nespojivi s opstankom živih organizama. Enzimi iz kemijskih reakcija izlaze nepromijenjeni, iako tijekom same reakcije, kao i ostale vrste katalizatora, s molekulama reaktanata stvaraju različite prijelazne komplekse.¹

Molekula koja ulazi u enzimski kataliziranu reakciju, odnosno ona na koju enzim djeluje, naziva se supstrat. Svaki enzim ima specifična svojstva, odnosno djeluje na određeni supstrat ili supstrate dajući pri tome odgovarajući produkt ili produkte.¹ Svaki enzim katalizira najčešće samo jednu reakciju što je posljedica specifične strukture proteinske molekule. Naime, na aktivno mjesto enzima može se vezati samo supstrat određene prostorne strukture.² Međutim, postoje enzimi koji bez prisutnosti neproteinske tvari, koja se naziva kofaktor ili koenzim, nemaju katalitičko djelovanje. Koenzimi su male, neproteinske molekule koje se vežu na neaktivni enzim, koji se naziva apoenzim. Tako neaktivni enzim postaje aktivan i naziva se holoenzim.¹ Prema tome, postoje tzv. čisti enzimi, čije je katalitičko djelovanje uvjetovano samo strukturom bjelancevine od koje su isključivo sastavljeni, te složeni enzimi koji osim proteinske komponente sadrže i niskomolekularnu neproteinsku komponentu, koenzim.²

Kao što je rečeno, enzimi su proteini, a proteini su makromolekule koje su izgrađene od aminokiselina međusobno povezanih peptidnom vezom. Proteine dijelimo na fibrilne, koji nisu topljivi u vodi, i globularne koji su topljivi u vodi. Svi enzimi su globularni proteini.¹ Postoji nekoliko struktura proteina, a to su: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna. Primarna struktura predstavlja povezanost aminokiselina peptidnim vezama u proteinu, a sekundarna oblik koji aminokiseline zauzimaju u prostoru. To znači da aminokiseline nisu u proteinima povezane samo u duge lančane molekule, već da su ti polipeptidni lanci poredani i paralelno te međusobno mrežasto povezani.⁶ Najčešći oblici sekundarne strukture su α -helix (oblik zavojnice) i β -sheet (oblik ploče). Tercijarna struktura proteina je njegova trodimenzionalna struktura odnosno način na koji su oblici sekundarne strukture povezani u prostoru.⁶ Mnogi proteini se sastoje od jednog polipeptidnog lanca i posjeduju samo tri razine

strukture, ali neki se proteini sastoje od višestrukih polipeptidnih lanaca koji, kada se spoje, daju kvartarnu strukturu proteina.⁷ Pojednostavljeni prikaz strukture proteina dan je na Slici 1.



Slika 1. Struktura proteina⁸

Za katalitičko djelovanje enzima odgovorno je aktivno mjesto, a to je dio enzima na koji se veže supstrat. Pojavu da svaki enzim može djelovati samo na određeni supstrat ili na grupu srodnih supstrata ili katalizirati samo određenu reakciju tog supstrata nazivamo specifičnost enzima. Ona se pripisuje podudarnosti prostorne strukture enzima i supstrata koja je nužna kako bi se enzim mogao aktivirati.² Smatra se da prostorna konfiguracija supstrata mora biti takva da mogu postojati barem tri točke interakcije između enzima i supstrata. Skup točaka interakcije između enzima i supstrata naziva se aktivnim područjem enzima.² To povezivanje enzima i supstrata može se opisati pomoću dva modela, a to su model brava-ključ (engl. *lock and key*) te model pobuđene prilagodbe (engl. *induced-fit*). Prema modelu brava-ključ specifičnost enzima, odnosno komplementarnost strukturnih značajki enzima i supstrata objašnjava se usporedbom s komplementarnošću ključa i brave. To znači da se supstrat mora savršeno uklapati u aktivno mjesto enzima. Za razliku od tog modela, model pobuđene

prilagodbe uzima u obzir fleksibilnost proteina te govori da vezivanjem supstrata na enzim može doći do konformacijskih promjena. Te promjene, odnosno prilagodbe su preoblikovanja trodimenzionalne strukture što znači da ne dolazi do promjena primarne strukture.¹ Općenito, povezivanjem enzima i supstrata nastaje jedinstveni kompleks enzim-supstrat te se događaju kemijske reakcije. One završavaju odcjepljivanjem nastalih produkata i regeneracijom aktivnog područja enzima.²

Prisutnost određenog enzima, reakciju, koja se bez njegove prisutnosti odvija sporo ili se uopće ne odvija, ubrzava do te mjere da joj brzina postaje mjerljiva. To ubrzanje se ostvaruje jer enzimi smanjuju energiju aktivacije, odnosno minimalnu energiju koju je potrebno dovesti molekulama kako bi međusobno reagirale. Smanjenje energije aktivacije događa se zato što se uz prisutnost enzima pretvorba iz supstrata u produkte ne događa izravno nego preko kompleksa enzim-supstrat. Kompleks enzim-supstrat se nakon kratkog vremena raspada na slobodni enzim i produkt(e) reakcije.

Prema vrsti reakcije koju kataliziraju, enzimi su podijeljeni u šest glavnih grupa kako je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Glavne grupe enzima¹

| Grupa enzima | Vrsta reakcije koja je katalizirana |
|---------------------|--|
| oksidoreduktaze | Redoks reakcije |
| transferaze | Prijenos funkcionalnih skupina ili većih jedinica s jedne molekule na drugu |
| hidrolaze | Hidroliza kemijskih veza |
| liaze | Reakcije eliminacije funkcionalnih skupina uz nastanak dvostruke veze i reakcije adicije na dvostruku vezu |
| izomeraze | Reakcije izomerizacije |
| ligaze | Stvaranje kovalentne veze uz istodobnu hidrolizu pirofosfatne veze u ATP-u |

Uspoređujući enzime s tipičnim homogenim i heterogenim katalizatorima može se reći kako enzimi imaju prednosti, ali i nedostatke. Jedna od najvećih prednosti enzima je što djeluju pri blagim reakcijskim uvjetima pri kojima funkcioniraju živi organizmi. Dakle, za provedbu reakcija kataliziranih enzima nisu potrebne ekstremne vrijednosti temperature, tlaka i pH, a uz

to su enzimi obnovljivi i biorazgradivi. Sve to ih čini i ekološki prihvatljivima. Dodatne prednosti enzima očituju se u tome što povećavaju brzinu reakcije milijun ili više puta, selektivni su te mogu djelovati izvan vodenog reakcijskog medija.⁹ Enzimi mogu biti učinkoviti pri vrlo malim koncentracijama, što znači da veoma male količine enzima mogu djelovati na velike količine supstrata u kratkom vremenu.² Glavni nedostaci enzima naspram klasičnih katalizatora su pojava inhibicije supstratom ili produktom te sklonost deaktivaciji. Inhibicija supstratom može se izbjeći održavanjem niske koncentracije supstrata, a inhibicija produktom nizom slijednih reakcija u kojim je produkt jedne reakcije supstrat za drugu.¹⁰ Osim tih rješenja, enzimi se često imobiliziraju na čvrsti nosač što ih čini stabilnijim te omogućava njihovu ekonomičnu i višekratnu primjenu. Nakon imobilizacije, svojstva enzima mogu se izmijeniti pa tako može doći do promjene pH-optimuma ili supstratne specifičnosti enzima, što omogućuje prilagođavanje svojstava enzima širem spektru različitih supstrata, odnosno razvoj specifičnih katalizatora za provedbu željenih reakcija.²

2.2. Enzimski kinetika

Za razumijevanje mehanizma enzimski kataliziranih reakcija potrebno je definirati brzinu reakcije. Enzimski katalizirane reakcije karakterizira stvaranje kompleksa enzim-supstrat (ES), a ključni čimbenik koji utječe na brzinu ovih reakcija je koncentracija supstrata. Početkom 20. stoljeća M. Michaelis i M. Menten su ideju o stvaranju ES kompleksa pretvorili u teoriju enzimskog djelovanja. Naime, oni su pretpostavili kako je vezanje supstrata i enzima u ES kompleks reverzibilno (Jednadžba 1.). U drugom sporijem koraku se ES kompleks raspada te nastaje produkt reakcije, a enzim se obnavlja (Jednadžba 2.).¹¹



Ukupna brzina reakcije uvijek ovisi o sporijem stupnju, a to je u ovom slučaju druga reakcija. Iz toga proizlazi kako je ukupna brzina reakcije proporcionalna koncentraciji ES kompleksa. Ove jednadžbe (Jednadžba 1. i 2.) vrijede za jednosupstratne reakcije. Tijekom enzimski katalizirane reakcije enzim je prisutan u dva oblika, kao slobodan enzim i kao dio ES kompleksa. Pri malim koncentracijama supstrata enzim je uglavnom prisutan u slobodnom obliku i tada je brzina reakcije proporcionalna koncentraciji supstrata. Najveća brzina reakcije (Jednadžba 3.) se ostvaruje kada su sve molekule enzima dio ES kompleksa. Tada se može reći

da je enzim zasićen i da daljnji porast koncentracije enzima nema utjecaja na brzinu enzimski katalizirane reakcije.¹¹

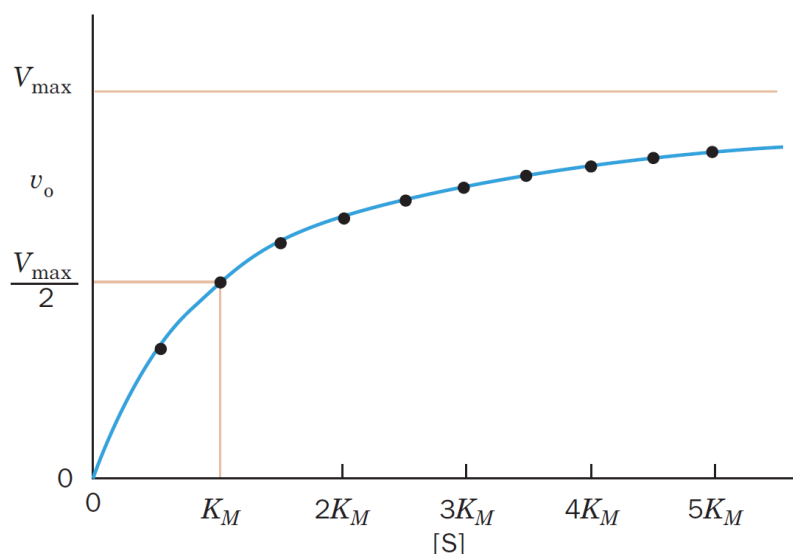
$$V_{max} = k_2 \cdot [E] \quad (3)$$

Dakle, ako je koncentracija enzima konstantna, s povećanjem koncentracije supstrata povećat će se i brzina enzimski katalizirane reakcije do konstantne, maksimalne vrijednosti koja se ostvaruje na koncentraciji zasićenja.² Povezanost koncentracije supstrata s brzinom enzimski katalizirane reakcije može se kvantitativno prikazati Michaelis-Menteničinom jednačbom (Jednačba 4.) gdje su v_0 brzina enzimski katalizirane reakcije, V_{max} maksimalna brzina reakcije, $[S]$ ravnotežna koncentracija supstrata, a K_M Michaelis-Menteničina konstanta.

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

Svi parametri Michaelis-Menteničine jednačbe se mogu jednostavno izračunati ili procijeniti.¹¹ Michaelis-Menteničina konstanta predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici vrijednosti maksimalne brzine reakcije, a što je ona veća to je manji afinitet enzima prema supstratu. Michaelis-Menteničina konstanta ovisi o vrsti enzima i supstrata, a također se mijenja i s temperaturom i pH-vrijednošću.⁹

Michaelis-Menteničina jednačba je osnovna jednačba enzimске kinetike, a grafički prikaz ove jednačbe, odnosno grafički prikaz ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata dan je na Slici 2.



Slika 2. Grafički prikaz ovisnosti početne brzine jednostavne jednosupstratne enzimski katalizirane reakcije o koncentraciji supstrata⁹

Na Slici 2. se može vidjeti kako je pri malim i velikim koncentracijama supstrata ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata linearna. Pri vrlo malim koncentracijama supstrata brzina enzimski katalizirane reakcije može se aproksimirati kinetikom prvog reda, dok se pri vrlo velikim koncentracijama supstrata brzina enzimski katalizirane reakcije može aproksimirati kinetikom nultog reda.⁹

2.3. Aktivnost enzima

Ispitivanja enzima temelje se na određivanju aktivnosti enzima koja predstavlja mjeru sposobnosti enzima da katalizira određeni proces. Aktivnost enzima je količina supstrata na koju je enzim djelovao i pri tome ga razgradio u jedinici vremena. Dakle, aktivnost enzima definira se kao brzina reakcije supstrata koja se može pripisati katalitičkom djelovanju enzima.² Mjerne jedinice kojima se iskazuje aktivnost enzima su jedinica enzimske aktivnosti [U] i katal [kat]. Jedinica enzimske aktivnosti definira se kao količina enzima koja katalizira pretvorbu jednog mikromola supstrata u minuti pod standardiziranim uvjetima. Prema toj je definiciji količina enzima apstraktan, ali koristan pojam te nije mjerljiva fizička veličina. Zbog tih se razloga češće preporučuje jedinica katal koja predstavlja količinu enzima koji pretvara jedan mol supstrata u sekundi.²

Za katalitičko djelovanje enzima zaslužna je njegova složena proteinska struktura te zbog toga svaki utjecaj koji tu strukturu bitno mijenja direktno utječe na aktivnost enzima.² Postoji mnogo čimbenika koji utječu na aktivnost enzima, a najčešći su temperatura, pH-vrijednost, priroda supstrata, kemijsko djelovanje prisutnih tvari itd.

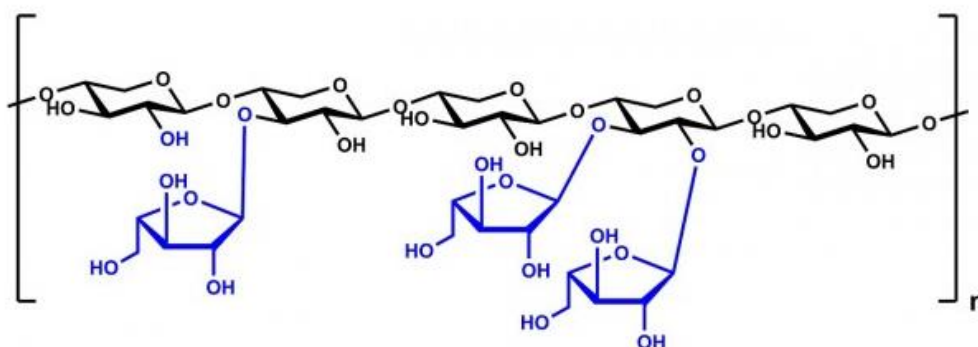
Topljivost enzima, globularnih proteina, raste s temperaturom sve do određene vrijednosti (najčešće oko 50 °C) iznad koje dolazi do promjena tercijarne strukture i naglog smanjenja topljivosti.¹ Kao i kod većine kemijskih reakcija, brzina reakcije raste s porastom temperature i kod enzimski kataliziranih reakcija. Međutim, kod enzimski kataliziranih reakcija brzina raste samo do određene vrijednosti nakon koje naglo pada.²

Na topljivost enzima, a samim tim i njegovu aktivnost utječe i pH-vrijednost. Pri ekstremnim pH-vrijednostima naboj koji nose ionizirani bočni lanci značajno će se razlikovati od onoga pri neutralnim pH-vrijednostima što narušava tercijarnu strukturu te smanjuje topljivost.¹ Za većinu enzima karakteristično je postojanje pH-optimuma pri kojem je aktivnost enzima najveća, a vrlo često je ovaj optimum u neutralnom ili slabo kiselom području. Međutim, kod nekih enzima koji se ponašaju atipično, aktivnost se povećava s povećanjem pH do određene vrijednosti nakon koje aktivnost ostaje konstantna.²

Osim spomenutih utjecaja temperature i pH-vrijednosti, na aktivnost enzima utječu i faktori kao što su vlažnost, djelovanje ionizirajućeg zračenja te kemijsko djelovanje prisutnih tvari. Tvari koje smanjuju aktivnost enzima nazivaju se inhibitori, a to su najčešće neželjene tvari koje se vežu na aktivno mjesto enzima i time onemogućuju vezanje supstrata na enzim.²

2.4. Enzim ksilanaza

Ksilanaze su enzimi koji pripadaju skupini hidrolaza, a djeluju na glikozilne spojeve. Ksilanaze kataliziraju razgradnju ksilana, jednog od najzastupljenijih polisaharida koji čine hemicelulozu. Ksilani su raznolika skupina polisaharida koji se uglavnom sastoje od ksiloze kao glavne monomerne jedinice koje su međusobno povezane β -1,4-glikozidnim vezama.³ Na ksiloze mogu biti vezani supstituenti poput arabinoze, glukuronske kiseline itd., a stupanj polimerizacije, priroda i broj supstituenta ovise o biološkom izvoru ksilana.¹² Na Slici 3. prikazana je struktura arabinoksilana koju čine molekule ksiloze povezane u lanac, a na mnoge su supstituirane molekule arabinoze.

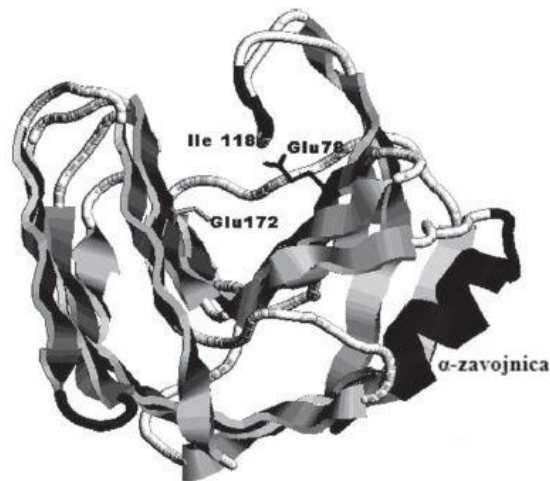


Slika 3. Struktura arabinoksilana¹³

Ksilanaze uglavnom proizvode mikroorganizmi, a mogu se pronaći u morskim algama, praživotinjama, rakovima, insektima, puževima i sjemenu kopnenih biljaka.⁴ Najznačajniji izvor ksilanaza su svakako mikroorganizmi, a posebno su važne nitaste gljive jer izlučuju ksilanazu u medij te na taj način ostvaruju njenu veću proizvodnju. Najznačajnije mezofilne gljive za proizvodnju ksilanaze su one iz rodova *Aspergillus* i *Trichoderma*. Termofilne gljive su važnije u proizvodnji ksilanaze jer proizvode ksilanazu veće stabilnosti, a neki predstavnici ovih gljiva su *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Melanocarpus albomyces*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Thermomyces lanuginosus* i *Thermoascus aurantiacus*.⁴

Enzim ksilanaza je kompaktni globularni protein. Najistaknutija strukturna značajka ovog enzima je duga pukotina koja obuhvaća cijelu molekulu i sadrži aktivno mjesto.¹² Ta

pukotina se nalazi između dvije β -ploče koje su izgrađene od antiparalelnih β -niti i jedne kratke α -zavojnice. Ukupni oblik molekule može se usporediti s poluzatvorenom desnom rukom.¹⁴ Na Slici 4. je prikazana struktura enzima ksilanaza na kojoj se može prepoznati taj karakterističan oblik.



Slika 4. Struktura enzima ksilanaza¹⁴

Za potpunu razgradnju ksilana, zbog njegove heterogenosti i složene kemijske prirode, potrebno je nekoliko hidrolaza različitih specifičnosti i načina djelovanja.³ Najvažniji enzimi odgovorni za hidrolizu ksilana su *endo*-1,4- β -ksilanaza i β -ksilozidaza. Enzim *endo*-1,4- β -ksilanaza cijepa glikozidne veze glavnog lanca ksilana što smanjuje stupanj polimerizacije ksilana. Veze koje će hidrolizirati ovise o prirodi molekule supstrata, odnosno o duljini lanca, stupnju grananja i prisutnosti supstituenata.⁴ Depolimerizacijom nastaju ksilooligosaharidi i ksiloza.¹⁴ Generalno, *endo*-1,4- β -ksilanaze iz različitih izvora pokazuju maksimalnu aktivnost u temperaturnom području od 40 °C do 80 °C i području pH-vrijednosti od 4,0 do 6,5.⁴

Uporaba ksilanaza u industriji je značajna te se sve više povećava. Istaknutu ulogu imaju u industriji celuloze i papira. U toj industrijskoj grani se najčešće primjenjuju za izbjeljivanje, što smanjuje korištenje klora i drugih kemikalija te je ujedno ekološki prihvatljivija metoda.³ Ksilanaze imaju važnu ulogu i u prehrambenoj industriji gdje se koriste kao aditivi u hrani za perad, za poboljšanje hranjivih svojstava stočne hrane, za ekstrakciju kave, biljnih ulja i škroba te za poboljšanje kvalitete pekarskih proizvoda i lakše rukovanje tijestom. U kombinaciji s pektinazama i celulazama koriste se za bistenje voćnih sokova.³ Također su važnu primjenu ksilanaze pronašle u kemijskoj i farmaceutskoj industriji, a neki od primjera primjene su proizvodnja etanola, ksilitola, furfurala i ksilooligosaharida (prebiotika) te priprema celofana.

2.5. Proizvodnja enzima fermentacijom na čvrstim nosačima

Enzimi se mogu dobiti iz tri različita izvora; iz biljaka, životinja i mikroorganizama. U prošlosti se većina industrijskih enzima dobivala iz biljnih i životinjskih izvora, ali već duže vrijeme enzimi mikrobnog podrijetla zamjenjuju enzime iz ostalih izvora. Dva osnovna procesa za proizvodnju enzima mikrobnog podrijetla su submerzna fermentacija (engl. *submerged fermentation, SF*) i fermentacija na čvrstim nosačima (engl. *solid-state fermentation, SSF*). Za proizvodnju ksilanaza se najviše koristi submerzna fermentacija, ali je proizvodnja fermentacijom na čvrstim nosačima povećana zbog brojnih prednosti ove metode.⁴

Fermentacija na čvrstim nosačima je proces koji uključuje rast mikroorganizama na vlažnim čvrstim česticama između kojih je raspoređena kontinuirana plinska faza i minimalna količina vode. Ta minimalna količina vode može tvoriti tanki film na površini čestica ili može biti u obliku kapljica između čestica te predstavlja diskontinuiranu fazu.⁵ Fermentacija na čvrstim nosačima nalikuje prirodnom staništu mikroorganizama zbog čega se pokazala učinkovitom u proizvodnji enzima.¹⁵

Za provedbu fermentacije na čvrstim nosačima potrebno je odabrati prikladan mikroorganizam, prikladan supstrat, optimizirati procesne uvjete te izolirati i pročistiti proizvod, odnosno enzim. Mikroorganizmi koji su generalno najpogodniji za fermentaciju na čvrstim nosačima su gljive jer njihove hife mogu rasti na površini čestica i prodrijeti u međučestični prostor te kolonizirati čvrsti nosač.¹⁵ U fermentaciji na čvrstim nosačima čvrsti materijal može služiti samo kao inertni nosač, ali osim te uloge može biti i izvor nutrijenata.¹⁷ Taj čvrsti materijal obično je prirodnog podrijetla te se sastoji od poljoprivrednih i agroindustrijskih nusproizvoda i ostataka, ali i sintetičkih materijala. Od procesnih uvjeta koje treba odabrati i optimizirati pri provedbi fermentacije na čvrstim nosačima najvažniji su aeracija, temperatura i pH-vrijednost. Aeracija ima višestruku ulogu, pri čemu treba istaknuti oksigenaciju, uklanjanje CO₂, odvođenje topline, vodene pare i nastalih hlapivih spojeva. Brzina aeracije ovisi o poroznosti medija, a zbog male toplinske vodljivosti čvrstog materijala, najvažnija uloga joj je odvođenje topline nastale tijekom fermentacije na čvrstim nosačima.¹⁶

Općenito, proces proizvodnje enzima fermentacijom na čvrstim nosačima se sastoji od nekoliko osnovnih koraka. Supstrat se navlaži i sterilizira nakon čega se provodi inokulacija, odnosno cijepljenje odabranim mikroorganizmom ili mikroorganizmima. Nakon toga se mikroorganizmi inkubiraju određeni broj dana uz kontrolu procesnih uvjeta.¹⁸ Iz dobivenog produkta – mikroorganizma, potrebno je separirati i izolirati enzim. Stabilnost proizvedenog

enzima pri različitim pH-vrijednostima i temperaturama te supstratna specifičnost ovise o uvjetima njegove proizvodnje.¹⁶

Procesi fermentacije na čvrstim nosačima imaju brojne prednosti, ekološki su učinkoviti jer se u ovim procesima u pravilu kao supstrat koristi čvrsti agroindustrijski otpad, a tijekom procesa nastaje manje otpadne vode. Osim toga, fermentacija na čvrstim nosačima zahtijeva manji volumen potrebne kapljevine za dobivanje produkata, koristi se jeftin supstrat, mali su proizvodni troškovi i rizik od oštećenja opreme.¹⁷ Fermentacijom na čvrstim nosačima se dobiva više željenog produkta u kraćem vremenu, a također se pokazalo kako velik broj enzima proizveden fermentacijom na čvrstim nosačima odlikuju bolja primjenska svojstva u odnosu na enzime proizvedene submerznom fermentacijom.¹⁶

Kao i svaki realni proces, tako i fermentacija na čvrstim nosačima ima i svoje nedostatke, a to su problemi povezani s uvećanjem procesa te poteškoće pri kontroli procesnih uvjeta kao što su pH-vrijednost, temperatura, koncentracija kisika i količina vlage. Osim toga, velik nedostatak je i cijena proizvodne opreme potrebne za provedbu fermentacije na čvrstim nosačima.¹⁶

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu provedeni su ispitivanjaje temperaturene stabilnosti, utjecaja temperature, pH-vrijednosti, metalnih iona, organskih otapala, te različitih reagensa i supstrata na aktivnost enzima ksilanaza.

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Acetonitril, Fisher Chemical, SAD
- Arabinogalaktan, Farmacia, Hrvatska
- Arabinoksilan, Megazyme, Irska
- Bakrov(II) klorid dihidrat, Acros Organics, SAD
- Bradford reagens, FKIT, Hrvatska
- Cinkov klorid, Acros Organics, SAD
- Citratna kiselina, VWR-Chemicals, Njemačka
- D(+)- ksiloza, VWR-Chemicals, Njemačka
- 3,5- dinitrosalicilna kiselina, Fluka, SAD
- Etanol, Kefo, Hrvatska
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), Fluka, SAD
- Goveđi serumski albumin (BSA), Sigma, Njemačka
- Heksan, Lachner, Češka
- Kalcijev klorid dihidrat, Riedel-de Haën, Njemačka
- Kalijev bromat, Kemika, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat, Lachner, Češka
- Kalijev hidrogenfosfat, VWR-Chemicals, Njemačka
- Kalijev klorid, Kemika, Hrvatska
- Kalij natrij tartarat tetrahidrat, Kemika, Hrvatska
- Kloroform, VWR-Chemicals, Njemačka
- Ksilan iz bukve, Sigma- Aldrich, SAD
- Ksilan iz jezgre kukuruza, TCI, Japan
- L-cistein hidroklorid, Alfa Aesar, SAD
- Magnezijev karbonat, Kemika, Hrvatska
- Magnezijev sulfat, Acros Organics, SAD

- Manganov(II) sulfat monohidrat, Sigma- Aldrich, SAD
- Metanol, Carlo Erba Reagents, Francuska
- Natrijev citrat, T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- Natrijev dodecil-sulfat (SDS), VWR-Chemicals, Njemačka
- Natrijev hidroksid, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Natrijev klorid, Lachner, Češka
- Škrob iz kukuruza, Nutrigold, Nizozemska
- Tapioka, Nutrigold, Nizozemska
- Toluen, VWR-Chemicals, Njemačka
- TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol), VWR-Chemicals, Njemačka
- Željezov(II) sulfat heptahidrat, Acros Organics, SAD

3.1.2. Aparatura

- Grijača ploča, Gorenje, Slovenija
- Magnetska miješalica Rotamix S-10, Tehnica, Slovenija
- pH metar Lab 860, Schott Instruments, Njemačka
- Spektrofotometar UV-1800, Shimadzu, Japan
- Termostat, Dri- Block DB 100/2, Techne, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Tresilica, Thermo scientific, SAD
- Vodena kupelj Thermomix 1460, Braun, Njemačka

3.2. Metode

3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ksiloze

Mjerenje aktivnosti enzima *endo*-1,4-ksilanaza se temelji na spektrofotometrijskom određivanju koncentracije šećera ksiloze koji nastaje jer enzim ksilanaza djeluje na supstrat ksilan razgrađujući ga do ksiloze. Zbog toga je prije određivanja aktivnosti potrebno napraviti baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksiloze. Postupak izrade baždarnog dijagrama potrebno je provesti pri istim uvjetima pri kojim će se provoditi određivanje aktivnosti enzima. Stoga je prije svega potrebno pripremiti 1%-tnu otopinu arabinoksilana u natrij-citratnom puferu ($c = 0,05$ mol/L, pH = 5,3) i DNS reagens u kojem je koncentracija 3,5-dinitrosalicilne kiseline $c = 0,096$ mol/L. Pufer je pripremljen otapanjem 955 mg natrijevog citrata i 336 mg citratne kiseline u 100 mL destilirane vode, a pH-vrijednost mu je podešena dodatkom 1 mol/L otopine NaOH. 1%-tna otopina ksilana pripremljena je tako što je 1 g arabinoksilana otopljen

u 80 mL natrij-citratnog pufera na 60 °C uz lagano miješanje. Nakon toga je otopina zagrijana do vrenja te postepeno ohlađena na temperaturu 25 °C uz miješanje na magnetskoj miješalici. Nastala otopina je dopunjena u odmjernoj tikvici do 100 mL natrij-citratnim puferom te je čuvana na 4 °C do tjedan dana. DNS reagens je reagens koji se koristi za detekciju reducirajućih šećera kao što je ksiloza. Pripremljen je na način da je 3,200 g NaOH otopljeno u 160 mL destilirane vode ($c = 0,5 \text{ mol/L}$). U ovako pripremljenoj vodenoj otopini NaOH postupno je otopljeno 4,36 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline uz miješanje i zagrijavanje na 70 °C. Nakon što je 3,5-dinitrosalicilna kiselina otopljena, u otopinu je potrebno dodati 60 g kalij natrij tartarata tetrahidrata i miješati dok se ne otopi. Nakon toga smjesa se hladi na 25 °C te nadopuni u odmjernoj tikvici do 200 mL s destiliranom vodom. Na ovaj način je dobiven DNS reagens koji se čuva na temperaturi 4 °C. Pri ovoj temperaturi dolazi do kristalizacije komponenata DNS reagensa (Slika 5.), stoga je reagens potrebno prije korištenja zagrijati na temperaturu 25 °C u vodenoj kupelji do nastanka otopine.



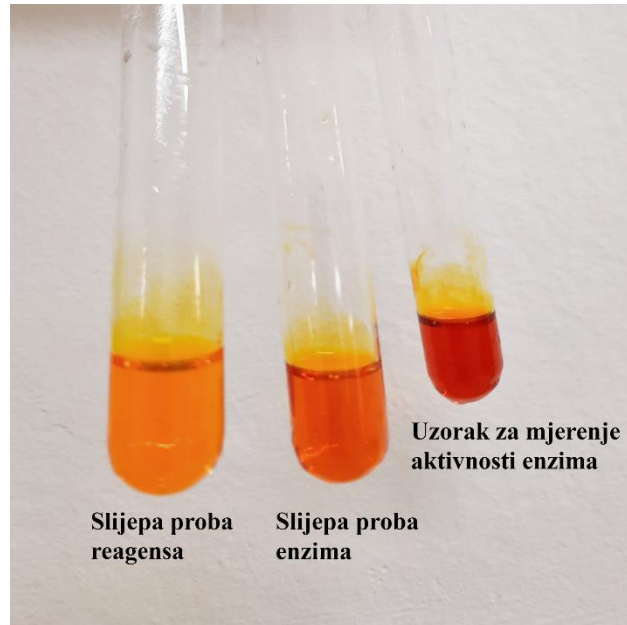
Slika 5. Kristali nastali u DNS reagensu tijekom čuvanja na temperaturi 4 °C

Za izradu baždarnog pravca potrebno je još pripremiti otopinu ksiloze početne koncentracije 0,01 mol/L tako da se 0,15 g ksiloze otopi u 100 mL prethodno pripremljenog natrij-citratnog pufera ($c = 0,05 \text{ M}$ i pH-vrijednosti 5,3). Iz te početne otopine razrjeđivanjem su pripremljene standardne otopine ksiloze koncentracija 0,5 $\mu\text{mol/mL}$, 1 $\mu\text{mol/mL}$, 2 $\mu\text{mol/mL}$, 3,33 $\mu\text{mol/mL}$ i 5 $\mu\text{mol/mL}$. U epruvetu se potom otpipetira 0,9 mL 1%-tne otopine arabinoksilana i 0,1 mL standarda ksiloze te lagano miješa i grije 5 minuta na 50 °C. Nakon

toga se u epruvetu dodaje 1,5 mL DNS reagensa te se smjesa miješa, termostatira pri temperaturi vrenja 5 minuta i hladi u hladnoj vodi na temperaturu 25 °C. Tako pripremljenom uzorku apsorbancija se mjeri na spektrofotometru pri valnoj duljini od $\lambda = 540$ nm. Postupak se ponavlja za sve pripremljene standardne otopine ksiloze. Mjerenje je na isti način potrebno provesti i za slijepu probu s tim da se u epruvetu umjesto 0,1 mL otopine ksiloze doda 0,1 mL otopine ksilana. Od vrijednosti izmjerenih apsorbancija pripremljenih standardnih otopina potrebno je oduzeti vrijednost apsorbancije slijepe probe. Dobiveni baždarni dijagram nalazi se u Prilogu 1.

3.2.2. Mjerenje aktivnosti enzima ksilanaza

Aktivnost enzima ksilanaza određena je metodom dobivenom interlaboratorijskim testiranjem metoda za istraživanje aktivnosti ksilanaza iz 1992. godine za koje je zaslužan Michael J. Bailey.¹⁹ Mjerenje aktivnosti enzima ksilanaza započinje na način da se u epruvetu otpipetira 0,9 mL otopine supstrata (1%-tna otopina arabinoksilana) i zagrije na 50 °C u vodenoj kupelji. U otopinu se doda 0,1 mL uzorka enzima ksilanaza, a nastala otopina se lagano promiješa i vrati u vodenu kupelj gdje se termostatira 5 minuta na 50 °C. Nakon toga u otopinu se doda 1,5 mL DNS reagensa, nastala otopina se promiješa, inkubira u kupelji na 100 °C tijekom 5 minuta, nakon čega se hladi u hladnoj vodi na temperaturu 25 °C također 5 minuta. Nakon što je reakcijska smjesa ohlađena na temperaturu 25 °C, spektrofotometrijski joj se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini $\lambda = 540$ nm. Kako bi se poništio utjecaj reagensa potrebno je napraviti slijepu probu reagensa (engl. *reagent blank*). Za to je potrebno u epruvetu otpipetirati 0,9 mL otopine supstrata te je termostatirati 5 minuta na 50 °C. Nakon toga se u otopinu dodaje 1,5 mL DNS reagensa i 0,1 mL pufera, inkubira u kupelji na 100 °C tijekom 5 minuta te hladi na 25 °C također 5 minuta. Tako dobivenoj slijepoj probi reagensa se spektrofotometrijski mjeri apsorbancija pri valnoj duljini $\lambda = 540$ nm. Osim ove slijepe probe potrebno je napraviti i slijepu probu enzima (engl. *enzyme blank*). Ona je neophodna kada se enzim ne razrjeđuje ili je razrjeđenje jako malo te kada uzorak sadrži visoku koncentraciju šećera. Za ovu slijepu probu je također potrebno otpipetirati 0,9 mL otopine supstrata te je termostatirati 5 minuta na 50 °C. Nakon toga se ovoj otopini dodaje 1,5 mL DNS reagensa i 0,1 mL enzima, te se otopina inkubira u kupelji na 100 °C tijekom 5 minuta nakon čega se hladi 5 minuta u hladnoj vodi na temperaturu 25 °C. Ovako pripremljenom uzorku slijepe probe enzima se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini $\lambda = 540$ nm. Na Slici 6. je prikazana usporedba boje uzorka za mjerenje aktivnosti, slijepe probe reagensa i slijepe probe enzima prije mjerenja njihove apsorbancije.



Slika 6. Usporedba boje uzorka za mjerenje aktivnosti, slijepe probe reagensa i slijepe probe enzima

Volumna aktivnost enzima ksilanaza (V.A.) je izračunata prema Jednadžbi 5., dok je specifična aktivnost enzima ksilanaza (S.A.) izračunata prema Jednadžbi 6.

$$V.A. = \frac{V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{dA}{dt} \quad (5)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_E} \quad (6)$$

Pri čemu su:

V.A. – volumna aktivnost enzima ksilanaza [U/mL]

V_T – ukupni volumen uzorka [mL]

V_E – volumen enzima ksilanaza dodanog u uzorak [mL]

d – promjer kivete [cm]

ε – molarni ekstincijski koeficijent ksiloze [mL/(μ mol·cm)]

dA/dt – promjena apsorbancije u vremenu [-]

S.A. – specifična aktivnost enzima ksilanaza [U/mg]

γ_E – koncentracija enzima ksilanaza [mg/mL]

3.2.3. Linearizirani Bradfordov test za određivanje koncentracije proteina

Bradfordov test je vrlo brz i jednostavan test za određivanje mikrogramske količine proteina koji se temelji na vezanju boje Commassie Brilliant Blue G-250, sadržane u reagensu, na proteine. Određivanje se provodi spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na $\lambda = 590$ nm. Kod ove metode mjerenja koncentracije proteina dokazano je kako unutarnja nelinearnost ugrožava osjetljivost i točnost metode, ali je pokazano kako je u standardnim uvjetima ispitivanja omjer apsorbancije pri $\lambda = 590$ nm i $\lambda = 450$ nm u pravilu linearno ovisan s koncentracijom proteina. Ova linearizacija Bradfordovog testa povećava točnost i poboljšava osjetljivost ispitivanja oko 10 puta, dopuštajući kvantifikaciju do 50 ng goveđeg serumskog albumina.²⁰ Sam postupak se sastoji od dva dijela, izrade baždarnog dijagrama i određivanja koncentracije proteina, odnosno enzima ksilanaza u uzorku.

Na početku je pripremljeno 1 mL otopine goveđeg serumskog albumina (BSA) koncentracije $\gamma = 1000$ mg/L i određena apsorbancija te otopine pri $\lambda = 280$ nm u kvarcnoj kiveti. Apsorbancija bi približno trebala imati vrijednosti od 0,660. Nakon toga mjeri se apsorbancija 18 plastičnih kiveta (za 6 različitih koncentracija po tri paralelna mjerenja) s 1 mL ultračiste vode pri valnim duljinama $\lambda = 595$ nm i $\lambda = 450$ nm. Potom je potrebno izliti vodu iz kiveta i posušiti ih. Zatim se izvorna otopina BSA koncentracije $\gamma = 1000$ mg/L razrjeđuje 10 puta kako bi se dobila otopina BSA koncentracije $\gamma = 100$ mg/L (1 mL otopine + 9 mL ultračiste vode). Iz te otopine pripremaju se razrjeđenja od 1-20 mg/L za izradu baždarnog pravca na način prikazan u Tablici 2. Otopine za izradu baždarnog pravca se mogu pripremiti direktno u plastične kivete korištenjem odgovarajućih volumena otopine BSA i ultračiste vode prikazanih u Tablici 2.

Tablica 2. Priprema otopina za izradu baždarnog pravca za Bradfordov test

| γ , mg/L | V_{BSA} , μ L | $V_{ultračiste\ vode}$, μ L |
|-----------------|---------------------|----------------------------------|
| 0 | 0 | 500 |
| 1 | 5 | 495 |
| 5 | 25 | 475 |
| 10 | 50 | 450 |
| 15 | 75 | 425 |
| 20 | 100 | 400 |

Nakon toga u svaku kivetu se dodaje 500 μ L Bradford reagensa, a otopina se homogenizira pomoću tresilice koja stvara vrtlog unutar kivete koji miješa i homogenizira otopinu. Nakon 10 minuta izmjeri se apsorbancija dobivenog uzorka pri $\lambda = 595$ nm i $\lambda = 450$ nm. Dobiveni baždarni dijagrama dan je u Prilogu 2. Koncentracija proteina mjeri se na način da se prvo izmjeri apsorbancija 3 plastične kivete u kojima je 1 mL ultračiste vode (slijepa proba) te izlije voda iz kiveta. U kivete, kojima su izmjerene apsorbancije, se ulije po 500 μ L razrijeđenog uzorka i 500 μ L Bradfordovog reagensa te se ovako dobivenim uzorcima spektrofotometrijski mjeri apsorbancija pri valnim duljinama $\lambda = 595$ nm i $\lambda = 450$ nm. Iz izmjerenih apsorbancija se pomoću baždarnog pravca (Prilog 2.) izračuna koncentracija proteina, odnosno enzima ksilanaza.

3.2.4. Ispitivanje temperaturene stabilnosti i utjecaja temperature na aktivnost enzima ksilanaza

Postupak određivanja utjecaja temperature na aktivnost enzima ksilanaza počinje na način da se 0,9 mL 1%-tne otopine arabinoksilana pomiješa se s 0,1 mL enzima ksilanaza, a dobiveni uzorak se lagano homogenizira te termostatira 5 minuta u vodenoj kupelji na ispitivanoj temperaturi. Ispitan je utjecaj sljedećih temperatura na aktivnost enzima ksilanaza: 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C i 70 °C. Nakon toga se u uzorak dodaje 1,5 mL DNS reagensa. Uzorak se ponovno promiješa, inkubira u kupelji na 100 °C tijekom 5 minuta, nakon čega se 5 minuta hladi u hladnoj vodi na temperaturu 25 °C. Nakon što je reakcijska smjesa ohlađena, mjeri se njena apsorbancija pri valnoj duljini $\lambda = 540$ nm.

Za određivanje temperaturene stabilnosti enzima ksilanaza potrebno je 2 mL enzima ksilanaza inkubirati na 50 °C u termostatu. Uzorak enzima ksilanaza uziman je u različitim vremenskim intervalima (0 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h i 24 h) te mu je mjerena aktivnost na način opisan u poglavlju 3.2.2.

3.2.5. Ispitivanje utjecaja pH-vrijednosti na aktivnost enzima ksilanaza

Kako bi se ispitaio utjecaj pH-vrijednosti na aktivnost enzima ksilanaza prvo je bilo potrebno pripremiti puferne određene pH-vrijednosti. Aktivnost enzima ksilanaza ispitana je u rasponu pH-vrijednosti od 3,00 do 9,51. Budući da se radi o širokom intervalu pH-vrijednosti bilo je potrebno pripremiti 3 različita pufera, a to su natrij-citratni pufer, fosfatni pufer i TRIS-HCl pufer čije su pH-vrijednosti prikazane u Tablici 3.

Natrij-citratni pufer je pripremljen na način da je 955 mg natrijevog citrata i 336 mg citratne kiseline otopljeno u 100 mL destilirane vode te mu je pH-vrijednost podešena na 5,3

dotatkom 1 mol/L otopine NaOH, odnosno na vrijednosti 3,00 i 4,00 dodatkom 1 mol/L otopine HCl.

Fosfatni pufer pripremljen je tako što je u 20 mL otopine kalijevog dihidrogenfosfata ($c = 0,05$ mol/L) dodavana otopina kalijevog hidrogenfosfata ($c = 0,05$ mol/L) uz miješanje do postizanja pH-vrijednosti 6,00 i 7,11.

TRIS-HCl pufer koncentracije $c = 0,05$ mol/L je pripremljen na način da je 0,3035 g TRIS-otopljeno u 50 mL vode, a pH-vrijednost rezultirajuće otopine podešena dodatkom 1 mol/L otopine HCl na vrijednost 9,51.

Tablica 3. pH-vrijednost pufera korištenih pri ispitivanju utjecaja pH-vrijednosti na aktivnost enzima ksilanaza

| pH/- | pufer |
|------|-----------------------|
| 3,00 | Natrij-citratni pufer |
| 4,00 | |
| 5,30 | |
| 6,00 | Fosfatni pufer |
| 7,11 | |
| 9,51 | TRIS- HCl pufer |

S ovako pripremljenim puferima priređene su 1%-tne otopine arabinoksilana na način da se 0,05 g arabinoksilana otopilo u 5 mL pufera na temperaturi 60 °C uz lagano miješanje. Nakon toga su otopine zagrijane do vrenja te su se postepeno hladile uz miješanje. S otopinama arabinoksilana pripremljenim na ovaj način je provedeno mjerenje aktivnosti enzima ksilanaza na način opisan u poglavlju 3.2.2.

3.2.6. Ispitivanje utjecaja metalnih iona na aktivnost enzima ksilanaza

Kako bi se odredio utjecaj metalnih iona na aktivnost enzima ksilanaza, prvo su pripremljene vodene otopine soli koncentracije $c = 10$ mmol/L, volumena $V = 2$ mL. Otopine KCl, MgSO₄, CuCl₂ · 2 H₂O, MnSO₄ · H₂O, FeSO₄ · 7 H₂O, CaCl₂ · 2 H₂O, ZnCl₂, MgCO₃, NaCl i KBrO₃ su pripremljene na način kako je prikazano u Tablici 4. Na ovaj način je ispitan utjecaj sljedećih metalnih iona na aktivnost enzima ksilanaza: K⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ i Na⁺.

Tablica 4. Priprema otopina soli korištenih pri ispitivanju utjecaja metalnih iona na aktivnost enzima ksilanaza

| Sol | <i>m</i> , g | <i>V</i> _{ultračista voda} , mL |
|--|--------------|--|
| KCl | 0,0015 | 2 |
| MgSO ₄ | 0,0024 | |
| CuCl ₂ · 2 H ₂ O | 0,0034 | |
| MnSO ₄ · H ₂ O | 0,0038 | |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,0056 | |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 0,0029 | |
| ZnCl ₂ | 0,0027 | |
| MgCO ₃ | 0,0017 | |
| NaCl | 0,0012 | |
| KBrO ₃ | 0,0033 | |

Nakon što su pripremljene otopine soli, svaka otopina je u volumnom omjeru 1:1 pomiješana s enzimom. Dakle, u 1 mL otopina soli doda se po 1 mL enzima ksilanaza te se tako dobiveni uzorak inkubira sat vremena pri temperaturi 25 °C nakon čega je određena aktivnost enzima na način opisan u poglavlju 3.2.2.

3.2.7. Ispitivanje utjecaja organskih otapala na aktivnost enzima ksilanaza

Pri ispitivanju utjecaja organskih otapala na aktivnost enzima ksilanaza pomiješani su organsko otapalo i enzim ksilanaza u volumnom omjeru 1:100. Ovo je provedeno na način da je 20 µL organskog otapala pomiješano s 1980 µL enzima ksilanaza. Organska otapala čiji se utjecaj na aktivnost enzima ksilanaza ispitivao su etanol, metanol, toluen, heksan, acetonitril i kloroform. Nakon što su otopine pripremljene, inkubirane su sat vremena pri temperaturi 25 °C, nakon čega je u ovako pripremljenim uzorcima određena aktivnost enzima ksilanaza na način kako je opisano u poglavlju 3.2.2.

3.2.8. Ispitivanje utjecaja različitih reagensa na aktivnost enzima ksilanaza

Reagensi, čiji je utjecaj na aktivnost enzima ksilanaza ispitivan u okviru provedenih istraživanja su natrijev dodecil-sulfat (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate* – SDS), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) i L-cistein HCl. Pripremljene su otopine ovih reagensa koncentracije $c = 10$ mmol/L na način prikazan u Tablici 5.

Tablica 5. Priprema otopina reagensa korištenih pri ispitivanju njihova utjecaja na aktivnost enzima ksilanaza

| Reagens | <i>m</i>, g | <i>V</i>_{ultračista voda}, mL |
|----------------------|--------------------|---|
| SDS | 0,0029 | 1 |
| EDTA | 0,0029 | |
| L-cistein HCl | 0,0016 | |

Nakon što su otopine pripremljene inkubirane su sat vremena pri temperaturi 25 °C, nakon čega je određena aktivnost enzima na način opisan u poglavlju 3.2.2.

3.2.9. Ispitivanje utjecaja različitih supstrata na aktivnost enzima ksilanaza

Kako bi se ispitala aktivnost enzima na različitim supstratima, u prethodnim ispitivanjima korišteni arabinoksilan zamijenjen je ksilanom iz bukve, škrobom iz kukuruza, ksilanom iz kukuruza, arabinogalaktanom te tapiokom. Određivanje aktivnosti enzima ksilanaza za ove supstrate provedeno je na način opisan u poglavlju 3.2.2., uz razliku što je umjesto 0,9 mL 1%-tne otopine arabinoksilana korišteno 0,9 mL 1%-tnih otopina navedenih supstrata. Te otopine pripremljene su na način da je 0,05 g svakog od prethodno navedenih supstrata otopljeno u 5 mL natrij-citratnog pufera na temperaturi 60 °C uz lagano miješanje. Ovako pripremljene otopine su zagrijane do vrenja te postepeno ohlađene na temperaturu 25 °C uz miješanje.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu karakteriziran je sirovi ekstrakt enzima *endo*-1,4-ksilanaza proizveden fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima. Jedno od najvažnijih svojstava enzima je aktivnost enzima koja ovisi o nizu čimbenika kao što su temperatura, pH-vrijednost, prisutnost metalnih iona, prisutnost različitih otapala i reagensa te različite vrste supstrata na koje djeluje enzim. U okviru provedenih istraživanja određena je aktivnost sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaza te kako navedeni čimbenici utječu na nju.

4.1. Aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

Aktivnost enzima ksilanaza određena je metodom dobivenom interlaboratorijskim testiranjem metoda za istraživanje aktivnosti enzima ksilanaza iz 1992. godine za koje je zaslužan Michael J. Bailey¹⁹. Tim testiranjima su određeni i objašnjeni reakcijski uvjeti koji su odabrani pri mjerenju aktivnosti enzima ksilanaza. Kako bi se maksimalno povećala raspoloživost supstrata u enzimskoj reakciji, volumni omjer enzim-supstrat treba biti 1:9, a ne često korišteni 50:50. Reakcijski uvjeti, temperatura 50 °C, pH-vrijednost 5,3 i vrijeme inkubacije od 300 s su odabrani zbog toga što su pogodni za ksilanaze porijeklom iz mezofilnih gljiva. Osim toga, temperatura 50 °C je pogodna za lakšu usporedbu aktivnosti jer je to temperatura koja se često koristi za određivanje aktivnosti nekih drugih enzima kao što su primjerice celulaze i hemicelulaze iz gljiva. Međutim, neke ksilanaze su nestabilne tijekom duljeg inkubiranja na ovoj temperaturi pa je stoga odabrano kratko vrijeme inkubacije od samo 5 minuta. Reakcija koja se odvija tijekom provedbe testa se prekida dodavanjem DNS reagensa, inkubiranjem u kupelji na 100 °C tijekom 5 minuta te hlađenjem na temperaturu 25 °C također 5 minuta.¹⁹ Prikaz rezultata dobivenih mjerenjem aktivnosti i koncentracije enzima *endo*-1,4-ksilanaza proizvedenog fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima dani su u Tablici 6.

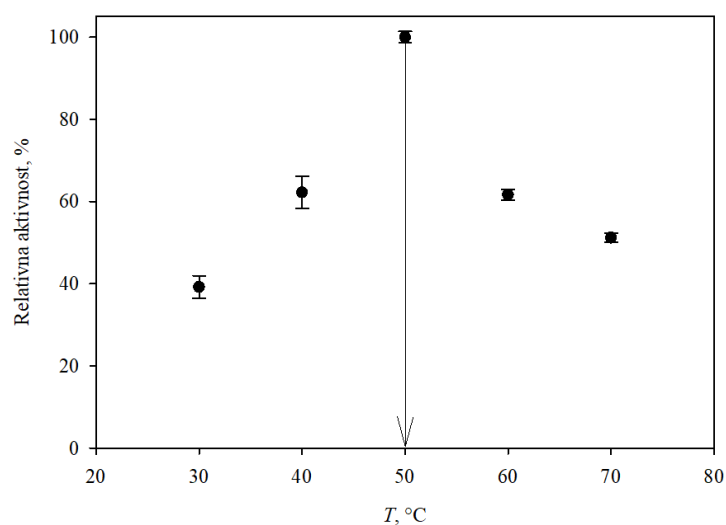
Tablica 6. Aktivnost i koncentracija sirovog enzima *endo*-1,4-ksilanaza proizvedenog fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima

| | |
|-------------------------------|---------------------|
| Volumna aktivnost, U/mL | 45,04 ± 1,37 |
| Koncentracija proteina, mg/mL | 0,028 ± 0,0002 |
| Specifična aktivnost, U/mg | 1613,4 ± 108,0 |

Usporedbom dobivenih rezultata za ispitivani enzim s vrijednostima koji su svojstveni komercijalnim enzimima, primjerice aktivnosti ksilanaza koje se koriste u reakcijama biotransformacija (> 14000 U/ml), može se zaključiti kako enzim ksilanaza dobiven fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima ima malu volumnu aktivnost. Također je koncentracija proteina u sirovom ekstraktu dobivenom fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima mala. Dobiveni rezultati ukazuju kako bi u nastavku istraživanja trebalo poboljšati proces proizvodnje enzima provedbom procesa pri drugim uvjetima ili na drugom supstratu, odnosno *Trametes versicolor* zamijeniti s nekom drugom gljivom koja će dati bolji prinos enzima. S druge strane, ako se na temelju dobivene volumne aktivnosti i koncentracije izračuna specifična aktivnost vidi se da je dobiven enzim visoke specifične aktivnosti posebice u usporedbi s aktivnošću enzima ksilanaza koji se koristi u pekarskoj industriji (> 300 U/g, a često oko 3500 U/g).

4.2. Utjecaj temperature na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor* i temperaturna stabilnost

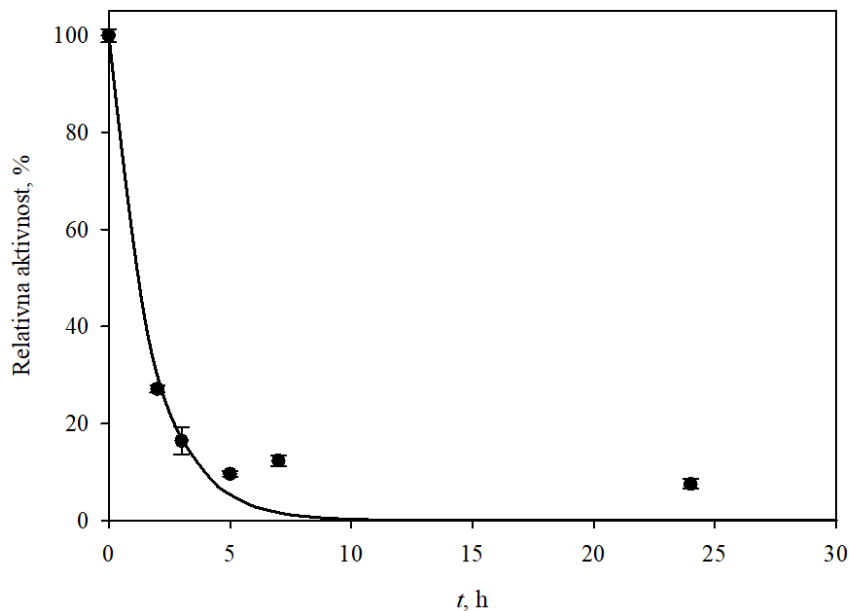
Nakon što je određena aktivnost enzima ksilanaza, ispitan je utjecaj temperature na njegovu aktivnost. Reakcijska smjesa supstrata arabinoksilana i enzima *endo*-1,4-ksilanaza inkubirana je pri temperaturama 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C i 70 °C, a vrijednosti relativne aktivnosti pri tim temperaturama prikazane su na Slici 7. Na slici se može vidjeti kako je maksimalna aktivnost enzima ksilanaza ostvarena pri temperaturi 50 °C. Ovime je potvrđen izbor optimalne temperature koja je korištena u nastavku istraživanja.



Slika 7. Utjecaj temperature na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

Uspoređujući optimalnu temperaturu od 50 °C za aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor* s optimalnim temperaturama koje su određene sličnim istraživanjima za ksilanaze iz drugih izvora može se zaključiti kako je ova optimalna temperatura karakteristična za veliki broj ksilanaza. Najveću aktivnost pri temperaturi 50 °C pokazuju i ksilanaze porijeklom iz mikroorganizama *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus sp.*, *Aspergillus sydowii*, *Chaetomium cellulolyticum*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma harzianum* itd.⁴ Mikroorganizmi koji su sposobni za rast na višim temperaturama proizvode enzime kojima je za najveću aktivnost pogodna veća temperatura i koji su termostabilniji, što ih čini otpornijim i učinkovitijim katalizatorima.²¹ Tako je, na primjer, optimalna temperatura za aktivnost enzima ksilanaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* 70 °C.⁴ Međutim, zbog otežanog uzgoja termofilnih organizama u industrijskom mjerilu, većina enzima se proizvodi iz mezofilnih organizama.²¹

Osim optimalne temperature, određena je i temperaturna stabilnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*. Reakcijska smjesa inkubirana je na temperaturi od 50 °C u natrij-citratnom puferu te je mjerena aktivnost enzima u ovom sustavu nakon 0 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h i 24 h. Dobiveni podatci prikazani su na Slici 8.

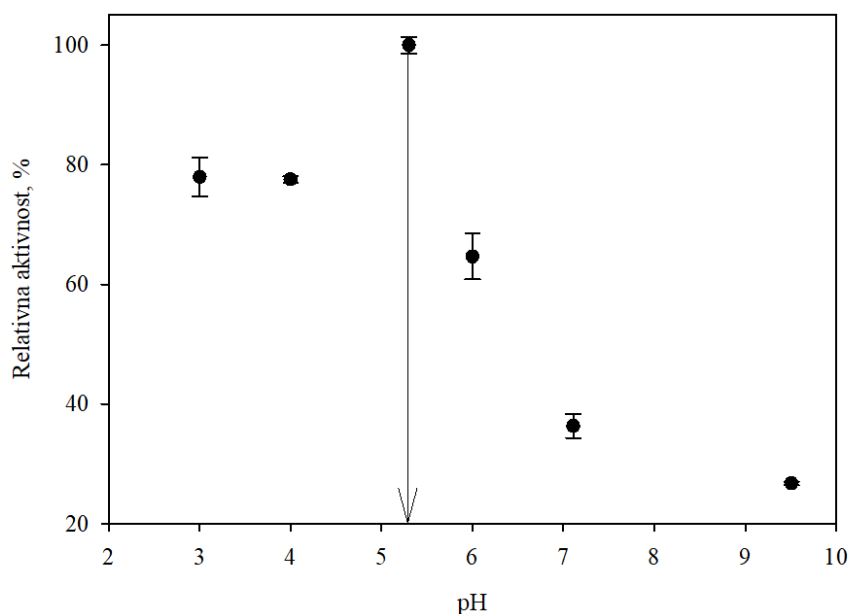


Slika 8. Relativna aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza iz *Trametes versicolor* u ovisnosti o vremenu inkubacije na 50 °C (● eksperimentalni podatci, — model deaktivacije enzima ksilanaza)

Kao što je vidljivo iz podataka prikazanih na Slici 8., aktivnost enzima vrlo brzo opada s vremenom. Osim eksperimentalnih podataka, na Slici 8. je prikazana i krivulja deaktivacije enzima ksilanaza koja je dobivena pomoću programskog paketa Scientist (Prilog 3.). Vidljivo je da deaktivacija enzima ksilanaza slijedi kinetiku prvog reda iz koje je procijenjena konstanta deaktivacije koja iznosi $0,592 \text{ h}^{-1}$. Iz vrijednosti konstante deaktivacije, te iz dobivenih eksperimentalnih rezultata može se zaključiti kako je enzim *endo*-1,4-ksilanaza proizveden fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima vrlo nestabilan. Nakon samo 5 h inkubacije njegova aktivnost manja je od 10 % početne vrijednosti. Vjerojatni razlog deaktivacije enzima *endo*-1,4-ksilanaza je što pri temperaturi $50 \text{ }^\circ\text{C}$ dolazi do promjena u proteinskoj strukturi molekule enzima koja je od iznimne važnosti za njegovo djelovanje. Obzirom kako je stabilnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza ispitivana u puferu, za očekivati je da bi se u stvarnim reakcijskim uvjetima dodatkom različitih supstrata te nastankom produkata ta aktivnost još brže smanjivala. Dobiveni rezultati ukazuju kako enzim *endo*-1,4-ksilanaza proizveden fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima ne bi bio dobar za komercijalnu primjenu uz procesne uvjete i supstrat korišten pri ovom procesu.

4.3. Utjecaj pH-vrijednosti na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

Budući da struktura i topljivost proteinske strukture ovisi o stupnju kiselosti medija u kojem se nalazi protein, svakako je za očekivati da djelovanje enzima uvelike ovisi o pH-vrijednosti sustava u kojem se enzim nalazi. Kako bi se ispitalo utjecaj pH na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*, korištena su tri različita pufera za pripremu otopine supstrata u kojoj se odvijala enzimska reakcija te je u ovim sustavima određena aktivnost enzima. U istraživanju su korišteni natrij-citratni pufer, fosfatni pufer i TRIS-HCl pufer, a aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza je ispitana u području pH-vrijednosti od 3,00 do 9,51. Dobiveni eksperimentalni rezultati prikazani su na Slici 9., a može se vidjeti da je pH-optimum pri kojem je aktivnost ispitivanog enzima maksimalna 5,3. Stoga su pri ovoj pH-vrijednosti provedena i ostala istraživanja utjecaja različitih čimbenika na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*.



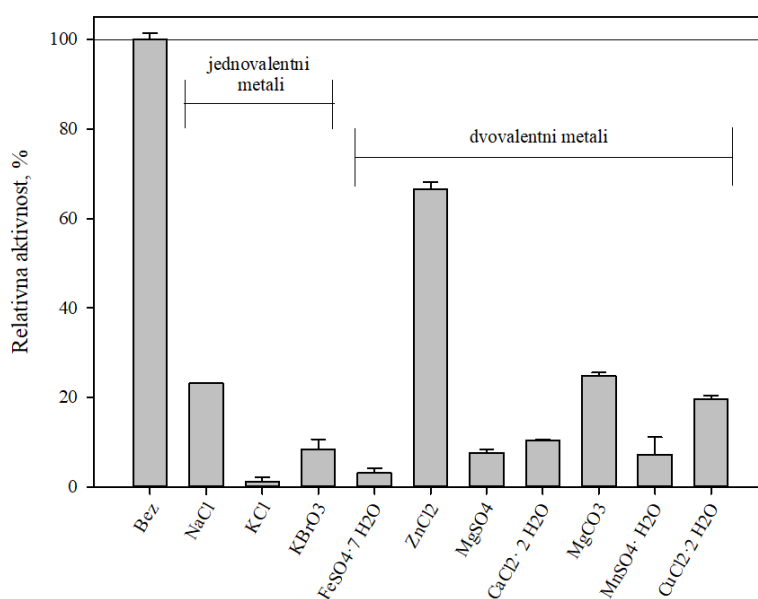
Slika 9. Utjecaj pH-vrijednosti na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

Iz dostupnih podataka može se zaključiti kako na optimalna područja pH-vrijednosti pri kojima je aktivnost različitih enzima ksilanaza maksimalna izrazito utječe mikroorganizam iz kojeg je ksilanaza dobivena. Neke ksilanaze, kao što je ona porijeklom iz *Penicillium sp.* ima maksimalnu aktivnost pri pH-vrijednosti 2. S druge strane, neke ksilanaze kao što je ona porijeklom iz *Neosartorya spinosa* ima maksimalnu aktivnosti pri pH-vrijednosti 9.²² Međutim, većina ksilanaza ima najveću aktivnost u blago kiselim uvjetima, pa tako na primjer ksilanaze porijeklom iz *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus sp.*, *Chaetomium cellulolyticum*, *Trichoderma harzianum* imaju optimalnu pH-vrijednost u području od 5 do 6, kao što je to slučaj kod ispitivane *endo*-1,4-ksilanaze porijeklom iz *Trametes versicolor*.⁴

4.4. Utjecaj metalnih iona na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

Na aktivnost enzima općenito veliki utjecaj mogu imati metalni ioni. U ovom je istraživanju provedena analiza utjecaja nekih jednovalentnih (Na^+ i K^+) i nekih dvovalentnih (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) metalnih kationa na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*. Nakon inkubacije enzima u otopini pripremljenih metalnih iona, određene su aktivnosti enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 10. Iz prikazanih rezultata može se vidjeti kako svi

metalni ioni imaju inhibicijski učinak na ispitivani enzim. Ovo je posljedica toga što se kationi čiji je utjecaj ispitivan vežu na aktivno mjesto enzima pa on stoga ne može djelovati na supstrat kao što je to slučaj u procesu u kojemu nema metalnih iona. Najmanji inhibicijski učinak ima Zn^{2+} ion, a najveći inhibicijski učinak ima K^+ ion čiji je utjecaj ispitan pomoću soli KCl i $KBrO_3$, pri čemu je veći inhibicijski učinak opažen kada su K^+ ioni u uzorak dodani kao KCl. Veliki inhibicijski učinak imaju ioni Fe^{2+} , Mg^{2+} (dodan kao $MgSO_4$), Ca^{2+} i Mn^{2+} . Za ione Na^+ , Mg^{2+} (dodan kao $MgCO_3$) i Cu^{2+} se može reći kako imaju srednji inhibicijski učinak u odnosu na ostale ispitivane ione.

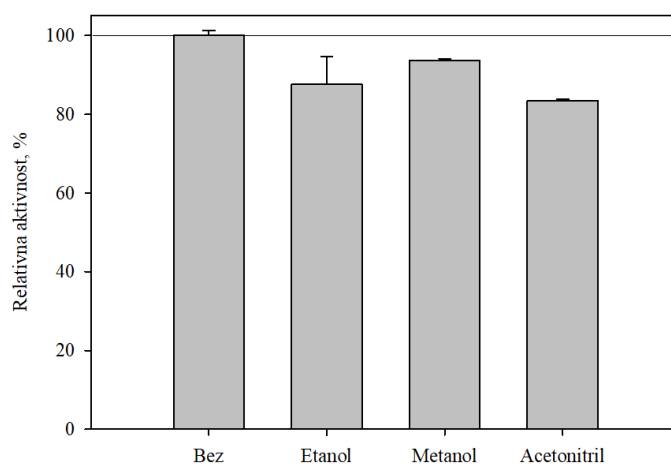


Slika 10. Utjecaj metalnih iona na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

4.5. Utjecaj organskih otapala na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

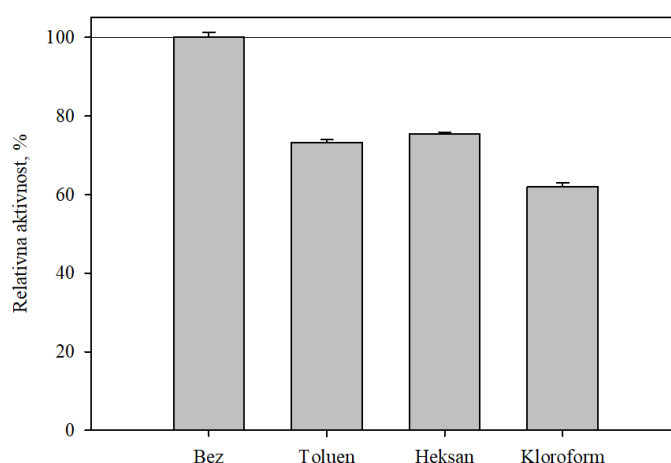
Prilikom određenih dijelova procesa izolacije i pročišćavanja ksilanaza, ponekad se koriste različita organska otapala. Uz to, enzim ksilanaza može se koristiti za proizvodnju bioetanola i nekih drugih organskih otapala. Zbog toga je važno ispitati eventualni utjecaj organskih otapala na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*. Stoga je u okviru provedenih istraživanja ispitan utjecaj tri polarna (etanol, metanol i acetonitril) i tri nepolarna (toluen, heksan i kloroform) organska otapala. Na Slici 11. prikazani su rezultati utjecaja polarnih organskih otapala na aktivnost enzima ksilanaza iz kojih se može

vidjeti kako etanol, metanol i acetonitril imaju blagi inhibicijski učinak na aktivnost ispitanog enzima.



Slika 11. Utjecaj polarnih organskih otapala na aktivnost enzima *endo-1,4-ksilanaza* porijeklom iz *Trametes versicolor*

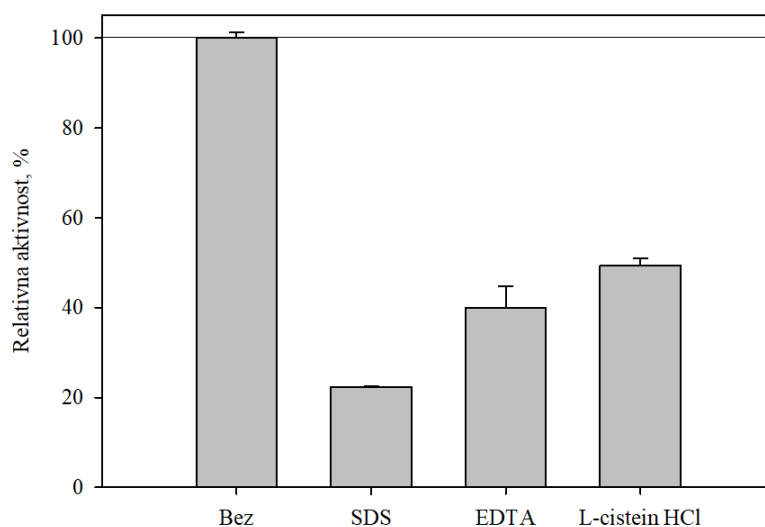
Utjecaj nepolarnih organskih otapala prikazan je na Slici 12. Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako toluen, heksan i kloroform imaju određeni inhibicijski učinak na aktivnost ispitanog enzima. Uspoređujući utjecaj ispitanih polarnih i nepolarnih organskih otapala, može se zaključiti kako nepolarna organska otapala imaju nešto veći inhibicijski učinak na aktivnost ispitanog enzima.



Slika 12. Utjecaj nepolarnih organskih otapala na aktivnost enzima *endo-1,4-ksilanaza* porijeklom iz *Trametes versicolor*

4.6. Utjecaj različitih reagensa na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

U medijima u kojima se odvijaju enzimske reakcije ponekad su prisutni određeni reagensi, a neki od uobičajenih su EDTA, SDS i L-cistein HCl. Zbog toga je ispitan utjecaj tih reagensa na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*. Na Slici 13. prikazano je kako prisutnost tih reagensa utječe na aktivnost ispitanog enzima. Pokazalo se kako sva tri reagensa smanjuju aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza s tim da je najveći utjecaj pokazao SDS dok su utjecaji EDTA i L-cistein HCl, s obzirom na područje pouzdanosti praktički jednaki.

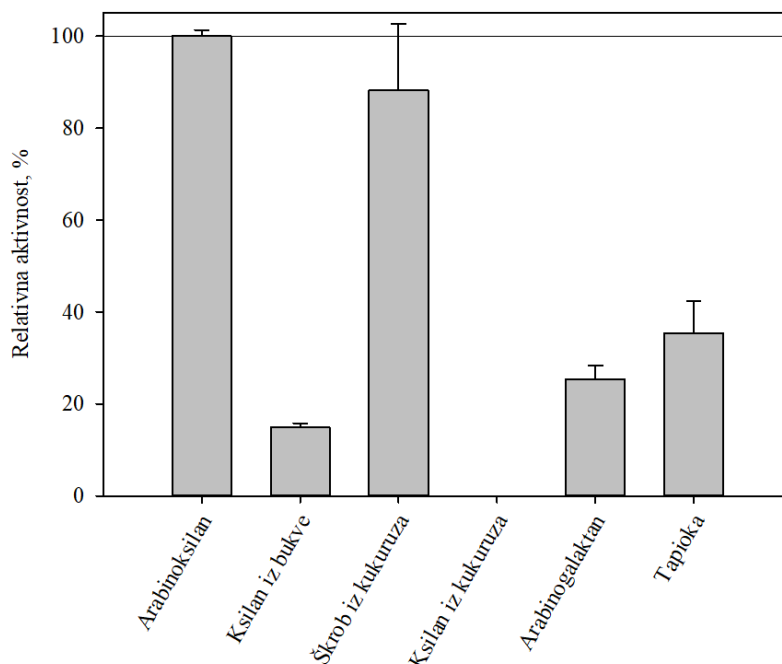


Slika 13. Utjecaj različitih reagensa na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

4.7. Utjecaj različitih supstrata na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza iz *Trametes versicolor*

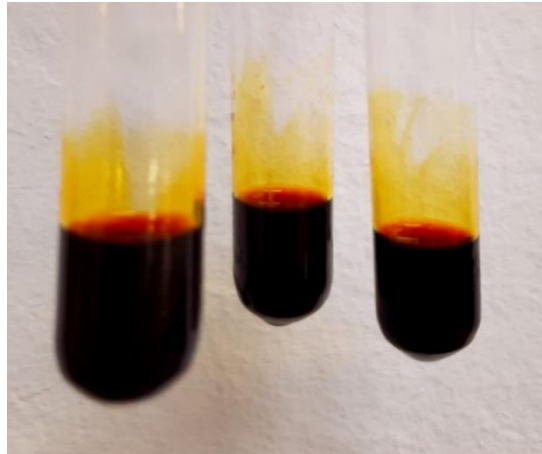
Enzim *endo*-1,4-ksilanaza razgrađuje supstrat ksilan hidrolizirajući β -1,4-glikozidne veze koje povezuju molekule ksiloze u dugi lanac. Međutim, postoji mnogo vrsta ksilana jer na osnovni lanac mogu biti vezani različiti supstituenti, poput arabinoze, glukuronske kiseline itd. Kod ispitivanja utjecaja različitih čimbenika na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor* je u ovom istraživanju kao supstrat korišten arabinoksilan. Osim arabinoksilana, kao potencijalni supstrati korištene su i sljedeće komponente: ksilan iz bukve, škrob iz kukuruza, ksilan iz kukuruza, arabinogalaktan i tapioka. Na Slici 14. prikazani su dobiveni eksperimentalni rezultati iz kojih se može vidjeti kako u odnosu na arabinoksilan

svi ispitivane supstrati pokazuju manju specifičnost prema enzimu *endo*-1,4-ksilanaza. Od tih supstrata, najveću aktivnost enzim *endo*-1,4-ksilanaza pokazuje prema škrobu iz kukuruza, međutim prilikom provedbe eksperimenta i pripreme otopine tog supstrata došlo je do poteškoća povezanih s otapanjem ovog supstrata. Prema ksilanu iz bukve, arabinogalaktanu i tapioki ispitivani enzim *endo*-1,4-ksilanaza pokazuje srednju razinu aktivnosti dok u pokusu provedenom s ksilanom iz kukuruza nije izmjerena aktivnost ovog enzima.



Slika 14. Utjecaj različitih supstrata na aktivnost enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor*

Prilikom određivanja aktivnosti ispitivanog enzima prema ksilanu iz kukuruza, nakon dodatka DNS reagens, smjesa je inkubirana u kupelji na 100 °C tijekom 5 minuta i hladena na temperaturu 25 °C 5 minuta, dobivene su izrazito tamne otopine (Slika 15.). Razlog za nastajanje ovako intenzivnog, tamnog obojenja otopina je u tome što ksilan iz kukuruza sadrži i veliku količinu šećera, koji nakon razgradnje ksilana, reagiraju s DNS reagensom što nepovoljno utječe na test za mjerenje aktivnosti enzima ksilanaza.



Slika 15. Uzorak za mjerenje aktivnosti, slijepa proba enzima i slijepa proba reagensa kada je kao supstrat pri mjerenju aktivnosti enzima ksilanaza korišten ksilan iz kukuruza

Osim toga, treba napomenuti kako enzim ksilanaza ne razgrađuje škrob i tapioku (vrsta škroba) te je razlog lažnog pozitivnog testa, odnosno izmjerene aktivnosti enzima ksilanaza pri radu s uzorcima koji sadrže ove šećere, vjerojatno prisutnost drugih enzima koji su prisutni u podlozi nakon fermentacije *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima. Stoga bi prije daljnjih istraživanja i upotrebe enzima *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor* u biotransformacijama enzim trebalo pročistiti.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenih eksperimenata može se zaključiti sljedeće:

1. Sirovi ekstrakt enzima *endo*-1,4-ksilanaza pokazuje najveću aktivnost pri temperaturi 50 °C, ali se dužom inkubacijom na toj temperaturi enzim deaktivira.
2. pH-vrijednost pri kojoj je aktivnost enzima najveća je 5,3.
3. Ispitani jednovalentni i dvovalentni metalni kationi pokazuju značajan inhibicijski učinak na aktivnost enzima, osim Zn^{2+} -iona koji pokazuje manji inhibicijski učinak.
4. Ispitana polarna organska otapala pokazuju blagi inhibicijski učinak na aktivnost enzima ksilanaza dok analizirana nepolarna otapala pokazuju nešto veći inhibicijski učinak.
5. Ispitani reagensi također pokazuju značajan inhibicijski učinak na aktivnost enzima ksilanaza, s time da SDS pokazuje najveći, a EDTA i L-cistein HCl nešto manji inhibicijski učinak.
6. Enzim *endo*-1,4-ksilanaza porijeklom iz *Trametes versicolor* od svih analiziranih supstrata najbolje razgrađuje arabinoksilan.
7. U uzorku sirovog enzima dobivenog fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima su vjerojatno prisutni i drugi enzimi što je potvrđeno razgradnjom škroba i tapioke koje enzim *endo*-1,4-ksilanaza ne može razgraditi. Stoga bi sirovi ekstrakt dobiven fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima prije daljnjih istraživanja i upotrebe u biotransformacijama trebalo pročistiti.

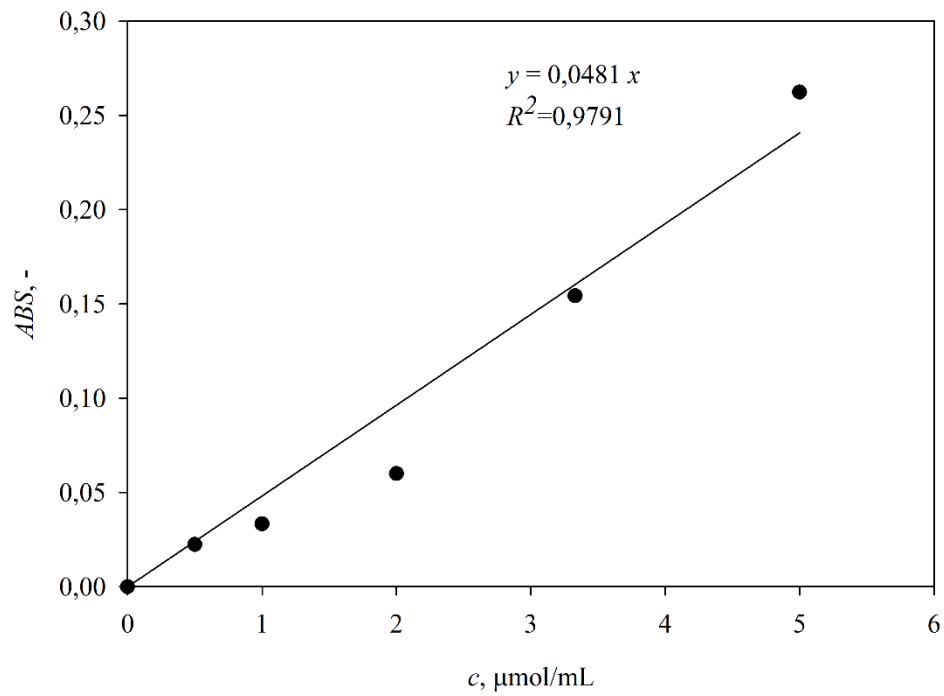
6. LITERATURA

1. Palmer, T., Bonner, P., Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry, Woodhead Publishing, Cambridge, 2007, str. 2. – 4., 14. – 42., 63.
2. Podhorski, R., Viličić, Ž., Hranuelli F., Jakobović Z., Podlesnik V., Tehnička enciklopedija 5. svezak, Zagreb, 1976, str. 334. – 337.
3. Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G., Microbial xylanases and their industrial applications: a review, Applied Microbiology and Biotechnology, 56 (2001) 326–338.
4. Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J., Amorim, D., Xylanases from fungi: properties and industrial applications, Applied Microbiology and Biotechnology, 67 (2005) 577–591.
5. Mitchell, D., Krieger, N., Berovič, M., Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation, Springer, Berlin, 2006, str. 1.– 2.
6. Podhorski, R., Sentić, A., Tehnička enciklopedija 2. svezak, Zagreb, 1966, str. 50. – 54.
7. <https://www.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/orders-of-protein-structure> (pristupljeno 1.5.2021.)
8. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Protein> (pristupljeno 1.5.2021.)
9. Voet, D., Voet, J., Pratt, C., Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, Third Edition, Wiley, New Jersey, SAD, 12 (2008.), str. 366. – 372.
10. Loughlin, W., Biotransformations in organic synthesis, Bioresource Technology, 74 (2000) 49–62.
11. Nelson, D., Cox, M., Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition, W. H. Freeman and Company, New York, 6, 2017, str. 535. – 577.
12. Gruber, K., Klintschar, G., Hayn, M., Schlacher, A., Steiner, W., Kratky, C., Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: High-resolution x-ray structure and modeling studies, Biochemistry 37 (1998) 13475–13485.
13. <https://www.megazyme.com/arabinoxylan-wheat-flour-medium-viscosity> (pristupljeno 15.5.2021.)
14. Subramanian, S., Prema, P., Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application, Critical Reviews in Biotechnology, 22 (2002) 33–64.
15. Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., Molecular and biotechnological aspects of xylanases, FEMS Microbiology Reviews, 23 (1999) 411–456.

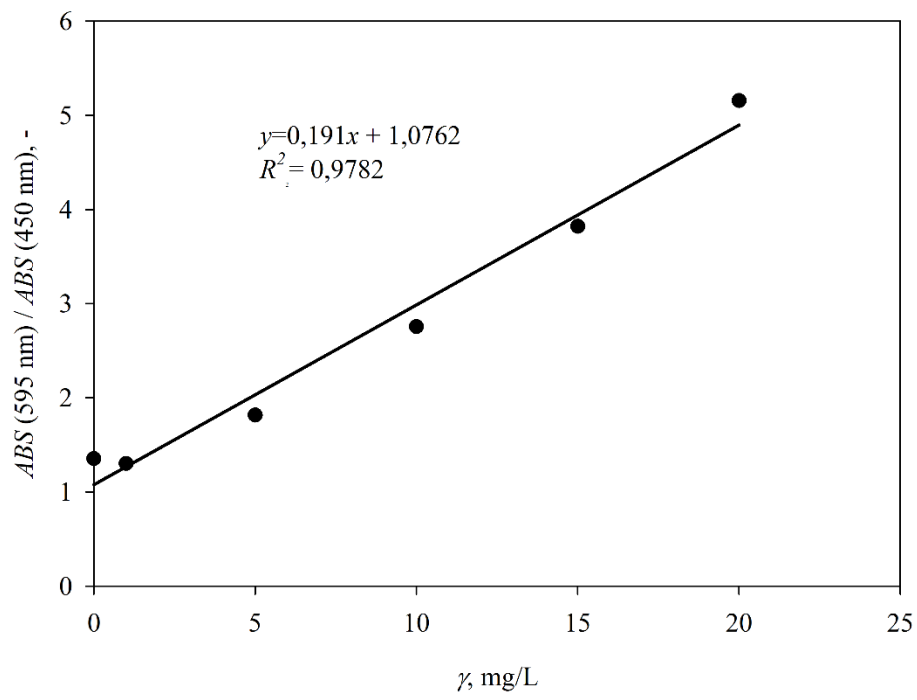
16. Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R., & Gomes, E., Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition, *Animal Feed Science and Technology*, 144 (2008) 1–22.
17. Pandey, A., Solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2003) 81–84.
18. Vassilev, N., de Oliveira Mendes, G., Solid-State Fermentation and Plant-Beneficial Microorganisms. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, C.R., Elsevier, Amstardam, 19, 2018, str. 435. – 450.
19. Bailey, M., Biely, P., Poutanen, K., Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, *Journal of Biotechnology*, 23 (1992) 257–270.
20. Ernst, O., Zor, T. Linearization of the Bradford protein assay, *Journal of Visualised Experiments*, 38 (2010) 1–7.
21. Rizzati, A., Sandrim, V., Jorge, J., Terenzi, Polizeli, M., Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31 (2004) 88–93.
22. Somboon, C., Boonrun, S., Katekaew, S., Ekprasert, J., Aimi, T., Boonlue, S., Purification and characterization of low molecular weight alkali stable xylanase from *Neosartorya spinosa* UZ-2-11, *Mycoscience*, (2019) 1–3.

7. PRILOZI

Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ksiloze



Prilog 2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina



Prilog 3. Programski kod u programskom paketu Scientist za procjenu konstante deaktivacije enzima

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: A
```

```
Params: kd
```

```
A'=-kd*A
```

```
t=0
```

```
A=100
```

```
kd=0.59202
```

```
***
```

ŽIVOTOPIS

Matea Bajo [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje je stekla u Osnovnoj školi „Nova Bila“ nakon kojeg upisuje opću gimnaziju Katolički školski centar „Petar Barbarić“ u Travniku. Tijekom pohađanja osnovne i srednje škole sudjeluje na natjecanjima iz područja matematike, biologije i kemije te joj je po završetku i osnovne i srednje škole dodijeljena Posebna diploma o postignutim rezultatima za odličan uspjeh iz svih nastavnih predmeta i uzorno vladanje.

Preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2018. godine. Tijekom sve tri godine studija je u kategoriji 10 % najuspješnijih studenata na studiju Kemijsko inženjerstvo. Na drugoj godini učlanjuje se u Studentsku sekciju Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa te sudjeluje u organizaciji mnogih projekata koji promiču znanost.