

# Optimiranje hidrolize proteina u ljuskama kozica

---

Čačko, Sara

Master's thesis / Diplomski 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:149:017476>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Sara Čačko**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2021.

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

**Sara Čačko**

**OPTIMIRANJE HIDROLIZE PROTEINA U LJUSKAMA KOZICA**

**DIPLOMSKI 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. prof. dr. sc. Zlata Hrnjak-Murčić

Zagreb, rujan 2021.

*Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na stručnom vodstvu, prenesenom znanju, trudu, vremenu i pomoći prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svim asistentima i kolegama u laboratoriju na domišljatim idejama i ugodnoj i pozitivnoj atmosferi u laboratoriju. Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali boravak na fakultetu, a posebno hvala Petri na nesebičnoj pomoći i podršci na svakom koraku tijekom ovog diplomskog studija.*

*I na kraju zahvaljujem se dečku Mislavu što je vjerovao u mene i bio mi velika podrška i motivacija te veliko hvala roditeljima i obitelji na razumijevanju, podršci i poticanju tijekom studiranja jer ovo dostignuće ne bi bilo moguće bez vas.*

## SAŽETAK

Proteaze su jedne od najvažnijih skupina industrijskih enzima koje kataliziraju razgradnju proteina. Zbog visokog prinosa, malog utroška energije, niskih troškova proizvodnje i jednostavne genetičke manipulacije proteaze se koriste pri deproteinizaciji morskih ostataka u svrhu dobivanja hitina. U okviru ovoga rada provedena je optimizacija hidrolize proteina iz ljusaka kozica pri optimalnim uvjetima rada ispitanih proteaza ( $T = 40^{\circ}\text{C}$  i  $\text{pH} = 8$ ). Hidroliza proteina katalizirana je komercijalnim proteazama Flavourzyme, Novozyme, Neutraza i Novo-pro D pri koncentracijama 0.5 U / 10 mg i 0.1 U / 10 mg otpada. Za navedene proteaze ispitana je operacijska aktivnost te se zaključilo da troparametarski model najbolje opisuje inaktivaciju proteaza. Pri hidrolizi proteina iz ostataka kozica sve proteaze pri obje koncentracije su se pokazale uspješnim, a najučinkovitije i najstabilnije su bile Novo-pro D i Novozyme zbog čega su se s njima proveli daljnji eksperimenti s ciljem utvrđivanja koliko se puta ista proteaza može upotrijebiti za hidrolizu proteina. Iz eksperimenata u ponavljajućem rektoru s proteazama Novo-pro D i Novozyme, pri koncentracijama 0.5 U / 10 mg i 0.1 U / 10 mg, pokazalo se da se proteaze mogu upotrijebiti u više ciklusa (do 5 ciklusa pri koncentraciji 0.5 U / 10 mg, a pri koncentraciji i 0.1 U / 10 mg do 3-4 ciklusa).

**Ključne riječi:** hidroliza proteina, proteaze, ostaci kozica, hitin

## **ABSTRACT**

Proteases are one of the most important groups of industrial enzymes that catalyze the protein degradation. Due to their high yield, low energy consumption, low production costs and simple genetic manipulation, proteases are used in the deproteinization of marine residues for the purpose of obtaining chitin. In this work, the optimization of protein hydrolysis from prawn shells was performed under optimal operating conditions of the tested proteases ( $T = 40^{\circ}\text{C}$  and  $\text{pH} = 8$ ). Protein hydrolysis was catalyzed by the commercial proteases Flavourzyme, Novozyme, Neutrase, and Novo-pro D at concentrations of 0.5 U / 10 mg and 0.1 U / 10 mg of waste. For these proteases, the operation stability was examined, and it was concluded that the three-parameter model best describes the inactivation of proteases. In the hydrolysis of proteins from prawn residues, all proteases at both concentrations proved successful, and Novo-pro D and Novozyme were the most efficient and stable and was used in repetitive to determine how many times the same protease can be used for protein hydrolysis. In repetitive experiments with proteases Novo-pro D and Novozyme, used at concentrations of 0.5 U / 10 mg and 0.1 U / 10 mg, it was shown that proteases can be used in several cycles (up to 5 cycles at a concentration of 0.5 U / 10 mg, and at a concentration of 0.1 U / 10 mg for up to 3-4 cycles).

**Key words:** hydrolysis of protein, protease, prawn waste, chitin

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Enzimi.....	2
2.1.1. Struktura enzima .....	3
2.1.2. Podjela enzima .....	4
2.1.3. Mehanizam djelovanja enzima.....	4
2.1.4. Svojstva enzima.....	5
2.2. Proteaze .....	6
2.2.1. Podjela proteaza .....	7
2.2.2. Industrijska primjena proteaza .....	8
2.2.3. Komercijalne proteaze.....	8
2.3. Hitin .....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Aparatura .....	11
3.1.1. Spektrofotometar .....	11
3.1.2. Tresilica.....	11
3.1.3. Analitička vaga.....	12
3.1.4. Centrifuga.....	12
3.1.5. Magnetska miješalica i grijalica .....	13
3.2. Analitičke metode.....	13
3.2.1. Određivanje aktivnosti proteaza .....	13
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina .....	15
3.3. Određivanje optimalne pH vrijednosti i temperature .....	15
3.4. Određivanje operacijske stabilnosti.....	16
3.5. Priprema uzorka kozica .....	17
3.6. Hidroliza proteina u otpadcima kozica .....	17

3.7.	Ekstrakcija proteina iz otpadaka kozica .....	18
3.8.	Ponovljivi eksperimenti .....	19
3.9.	Obrada rezultata.....	19
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1.	Optimalni radni uvjeti komercijalnih proteaza .....	21
4.2.	Operacijska stabilnost proteza pri $T = 40^{\circ}\text{C}$ i pH 8.....	22
4.3.	Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru 0.5 U / 10 mg .....	25
4.4.	Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru 0.1 U / 10 mg .....	29
4.5.	Hidroliza proteina u ostacima kozica u ponovljivom reaktoru.....	33
5.	ZAKLJUČAK .....	37
6.	LITERATURA.....	39
7.	POPIS SIMBOLA I KRATICA .....	42
8.	PRILOZI.....	44
9.	ŽIVOTOPIS .....	46



## 1. UVOD

Danas u svijetu se milijuni tona kozica proizvode i konzumiraju kao morska hrana bogata proteinima. Polovinu tjelesne mase kozica čini vanjska ljuska koja se odbacuje kao otpad. Upravo te odbačene ljuske su istaknuti izvor proteina i hitina koji predstavljaju veliki problem ekosustavu zbog slabe topljivosti i spore biorazgradnje.<sup>1</sup> Zbog sadržaja vrijednih sirovina poput proteina, minerala i prirodnih pigmenata otpad kozica je zabranjeno odlagati kao biootpad na odlagališta te ga je potrebno obraditi ekološki prihvatljivim metodama kako bi se izbjeglo dodatno onečišćenje okoliša.<sup>2,3</sup> Kako bi se izbjeglo korištenje upotrebe koncentriranih jakih kiselina i lužina, te smanjilo dodatno onečišćenje okoliša za reakciju ekstrakcije hitina iz ljusaka kozica koriste se biokatalizatori, točnije proteaze.<sup>4</sup>

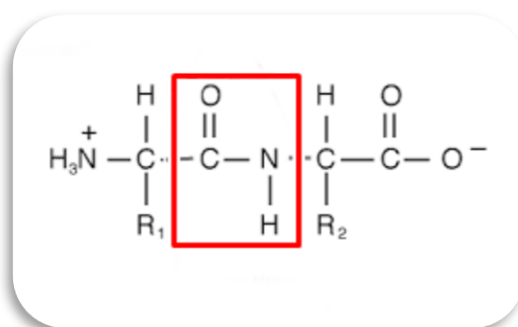
Biokatalizatori ili enzimi su proteini koji ubrzavaju reakcije u stanicama živih organizama te u zadnje vrijeme sve češće zamjenjuju klasične, kemijske katalizatore zbog njihove sposobnosti da kataliziraju reakcije pri blagim uvjetima odnosno pri temperaturi okoline, atmosferskom tlaku i neutralnim pH vrijednostima.<sup>5,6</sup> Proteaze su jedna od najmnogobrojnijih skupina enzima koji kataliziraju razgradnju proteina. S obzirom na to da im je primarna funkcija razgradnja proteina, proteaze se mogu primijeniti pri deproteinizaciji morskih ostataka u svrhu dobivanja hitina. Hitin je jedan od najrasprostranjenijih biopolimera u prirodi kojeg karakterizira netoksičnost, biorazgradivost i biokompatibilnost što ga čini pogodnim za upotrebu na mnogim područjima znanosti i industrije.<sup>7,8,9</sup>

U ovome radu provedena je optimizacija hidrolize proteina iz ljusaka kozica pri optimalnim uvjetima rada ispitanih proteaza. ( $T = 40^{\circ}\text{C}$  i  $\text{pH} = 8$ ). Hidroliza proteina katalizirana je komercijalnim proteazama Flavourzyme, Novozyme, Neutraza i Novo-pro D, proizvođača *Novozyme* pri koncentracijama od 0.5 U / 10 mg i 0.1 U / 10 mg otpada. Naposljetku je provedena i hidroliza proteina u ponovljivom reaktoru s proteazama koje su se pokazale najstabilnijima i najučinkovitijima, a kao takve su se pokazale proteaze Novo-pro D i Novozyme.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Enzimi

Enzimi su biološki katalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije unutar živih organizama, a iz njih izlaze nepromijenjeni. Nastaju unutar živih stanica, pri čemu razlikujemo unutarstanične i izvanstanične enzime. Unutarstanični, kako im ime govori, nalaze se unutar stanice u citoplazmi ili su vezani za staničnu stijenku. Izvanstanične enzime stanica nakon sinteze izlučuje u okolni vanstanični prostor. Po svojoj strukturi enzimi su proteini, a nastaju povezivanjem velikog broja aminokiselina peptidnim vezama. Peptidna veza (*Slika 2.1.*) nastaje između ugljikovog atoma karboksilne skupine jedne aminokiseline i dušikovog atoma  $\alpha$ -amino skupine druge aminokiseline.<sup>6</sup> Većina enzima građena je samo od proteina i nazivaju se jednostavni enzimi. Međutim, određeni enzimi se sastoje od dva dijela: proteinskog – apoenzima i neproteinskog – koenzima ili kofaktora. Takvi enzimi se nazivaju konjugirani enzimi, a zajednički naziv za apoenzim i koenzim je holoenzim.<sup>10</sup>



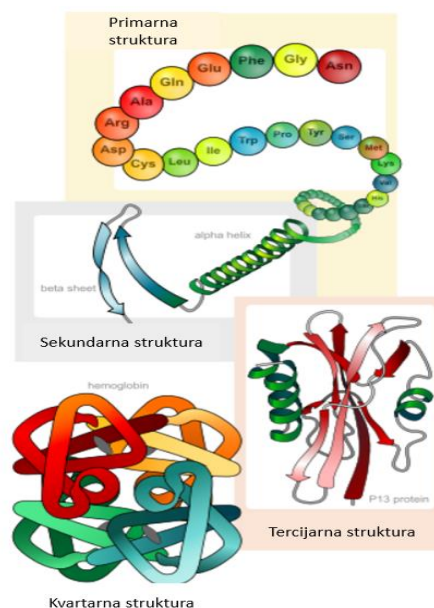
*Slika 2.1.* Shematski prikaz peptidne veze između dvije  $\alpha$ -aminokiseline

Enzimi ili biokatalizatori bili su poznati još u doba Antike i to pod nazivom fermenti zbog upotrebljavanja u procesima alkoholnog vrenja, kiseljenja mlijeka i pravljenje sira. Znanstvena istraživanja o enzimima započela su u prvoj polovici 19. stoljeća kada je G.S.C. Kirchoff pokušao objasniti enzimске reakcije i svojstva enzima, a J.J Berzelius dao tumačenje fermentacije alkohola kao katalitičkog procesa. Naziv enzim potječe od grčke riječi en-zyme što znači u kvascu, a to je predložio R. Kuhne tijekom druge polovice 19. stoljeća Također u drugoj polovici 19. stoljeća E. Fischer daje poznatu teoriju "brave i ključa", a E. Buchner otkriva alkoholno vrenje in vitro što daje veliki povod za daljnjim nastavkom istraživanja enzima. U ovome razdoblju dogodio se i jedan od najbitnijih događaja u biokatalizi kada su B. Gutte i R. Hirschman izveli prvu sintezu enzima Važno je napomenuti da je prvi izoliran enzim bila ureaza i to u kristalnom obliku, a izolirao ju je Sumner 1926. godine.<sup>11</sup>

Broj pronađenih, izoliranih i pročišćenih enzima danas je jako velik te su njihova fizikalna i kemijska svojstva jako dobro istražena. Pretpostavlja se da u prirodi postoji oko 25000 enzima, a poznato ih je svega preko 3000. Enzimi se mogu pronaći u životinjskom i biljnom svijetu te u mikroorganizmima poput gljiva, kvasaca i bakterija. Primjena enzima je vrlo velika, a najčešće se upotrebljavaju u farmaceutskoj, tekstilnoj, kožnoj, mesnoj, pekarskoj i papirnoj industriji. Također se koriste za proizvodnju deterdženata, sredstava za čišćenje, šećera, kave, piva, vina, sokova, alkohola, škroba, antibiotika...<sup>12</sup>

### 2.1.1. Struktura enzima

Enzimi su po svojoj građi proteini i stoga su definirani jedinstvenim slijedom aminokiselina kojeg definira DNA kod organizma (primarna struktura). Ako se promjeni slijed aminokiselina mijenja se i kompletna funkcija kao i struktura samoga enzima. Ovisno o broju aminokiselina postoje enzimi molekulskih masa od nekoliko tisuća do nekoliko milijuna. Nastali peptidni lanci međusobno se savijaju u spirale pri čemu se karbonilne i amidne grupe vežu vodikovim vezama i tako stabiliziraju molekulu pri čemu nastaje sekundarna struktura enzima. Također pod sekundarnom strukturom podrazumijevaju se i nabrane strukture koje nastaju nabiranjem peptidnih lanaca u ravnini pri čemu nastaju vodikove veze. Daljnjim povezivanjem uzvojnica kovalentnim vezama nastaje tercijarna struktura, a spajanjem lanaca u veće aglomerate disulfidnim mostovima nastaje najkompleksnija kvartarna struktura koja je karakteristična za biokatalizatore najveće molekulske mase.<sup>6</sup> Na *Slici 2.2.* su prikazane strukture enzima od primarne do kvartarne.



*Slika 2.2.* Slikoviti prikaz strukture enzima

### 2.1.2. Podjela enzima

Enzime možemo podijeliti s obzirom na njihovu strukturu te prirodu reakcije koju kataliziraju. Struktura enzima određuje njihovu funkciju te ih prema tome dijelimo na monomere i oligomere ovisno o broju peptidnih lanaca koji ih definiraju. Podjela enzima prema prirodi reakcije koju kataliziraju te identitetu njihova supstrata i proizvoda prikazana je u *Tablici 2.1.*<sup>13</sup>

*Tablica 2.1.* Podjela enzima prema reakciji koju kataliziraju<sup>13</sup>

NAZIV	VRSTA REAKCIJE
<b>Oksidoreduktaze</b>	Oksidacija-redukcija
<b>Transferaze</b>	Prijenos funkcionalnih skupina
<b>Hidrolaze</b>	Hidroliza C-C, C-N, C-O, C-S ili O-P veza
<b>Liaze</b>	Adicija ili eliminacija skupina radi stvaranja ili uklanjanja dvostruke veze; C-C, C-N, C-O ili C-S veza
<b>Izomeraze</b>	Izomerizacija (intramolekulski prijenos skupina)
<b>Ligaze</b>	Stvaranje veza i hidroliza fosfatne grupe visoke energije, u ATP ili sličnim fosfatima

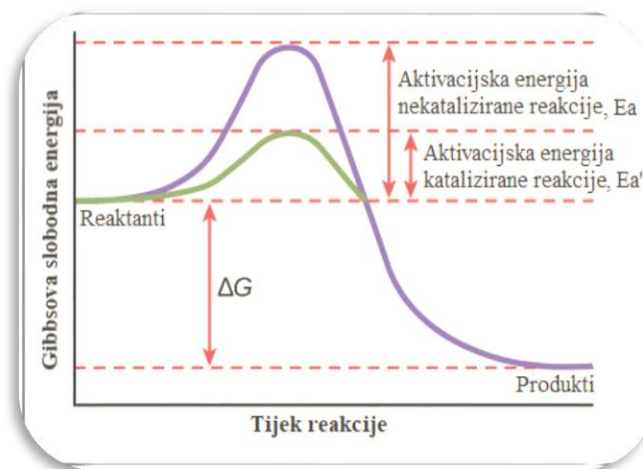
### 2.1.3. Mehanizam djelovanja enzima

Mehanizam djelovanja enzima opisuje se principom „ključ-brava“, pri čemu se enzim (E) veže na molekulu supstrata (S) točno određenog oblika. Interakcijom sa supstratom dolazi do formiranja aktiviranog prijelaznog kompleksa enzim-supstrat (ES) i smanjenja veličine energetske barijere. U kompleksu je enzim vezan uz supstrat Van der Waalsovima, elektrostatskim privlačenjem, vodikovom vezom ili rjeđe, kovalentnom vezom, što omogućava lakše razdvajanje po završetku reakcije. To je vrlo bitno jer kompleksiranje mora biti brzo i reverzibilno kako bi se produkt (P) mogao odvojiti od enzima odmah nakon reakcije i osloboditi ga za daljnje katalitičko djelovanje.<sup>14</sup> Navedena reakcija se može prikazati u dva koraka (*Jedn. 2.1.*):<sup>15</sup>



Enzimi funkcioniraju tako da snižavaju energiju aktivacije pojedine reakcije, te je na taj način ubrzavaju i do nekoliko milijuna puta (*Slika 2.3.*). Svrha enzima je ubrzavanje reakcije pri čemu

se ne mijenja način odvijanja reakcija. Treba napomenuti da enzimi izlaze nepromijenjeni iz određene reakcije u kojoj su sudjelovali.<sup>16</sup>

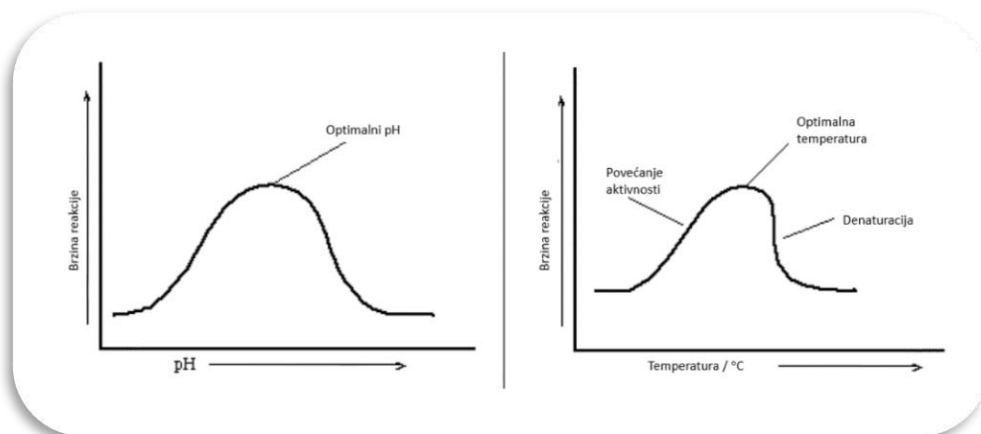


Slika 2.3. Prikaz energetske promjene pri prijelazu reaktanata u produkte sa i bez katalizatora

#### 2.1.4. Svojstva enzima

Glavna karakteristika i velika prednost enzima je njihova visoka specifičnost na supstrat, odnosno, selektivnost. Enzimi mogu ubrzati samo jednu od mogućih reakcija i tako smanjuju nastajanje nepoželjnih sporednih produkata.<sup>17</sup> Na taj način povećavaju produktivnost reakcije i smanjuju opterećenje okoliša. Enzimi najčešće djeluju pri umjerenim uvjetima, tj. pri sobnoj temperaturi, atmosferskom tlaku i neutralnom pH zbog čega su energetske troškovi mali, što znači da je i sam proces jeftiniji.<sup>18</sup> Glavni nedostatak enzimskih procesa su njihova niska stabilnost i/ili aktivnost u određenim radnim uvjetima, no mogu se pojaviti i drugi razni nedostaci koji mogu umanjiti efikasnost enzima poput inhibicije zbog prisutnosti određenih supstrata ili produkata reakcije, što smanjuje i ekonomsku opravdanost upotrebe pojedinog enzima.<sup>19</sup>

Svaki enzim ima svoju optimalnu pH vrijednost i temperaturu pri kojoj je njegova aktivnost najveća. Ekstremno visoke ili niske pH vrijednosti rezultiraju gubitkom enzimske aktivnosti. Brzina enzimske reakcije raste kako se raste temperatura, ali kada dostigne svoj maksimum, daljnjim povećanjem temperature brzina počinje naglo padati (Slika 2.4.).<sup>20</sup>



Slika 2.4. Grafički prikaz ovisnosti enzima o pH vrijednosti i temperaturi

Stabilnost enzima definirana je kao ostatak enzimske aktivnosti nakon određenog vremena. Razlikujemo dvije vrste enzimske stabilnosti, a to su operacijska stabilnost i stabilnost skladištenja. Stabilnost enzimske aktivnosti ovisi o očuvanju aktivne enzimske konformacije, a ona ovisi o kovalentnim, ionskim i dipolnim vezama te o hidrofилnim i hidrofobnim interakcijama. Bilo kakva promjena tih sila može uzrokovati promjene enzimske aktivnosti i stabilnosti.<sup>21</sup>

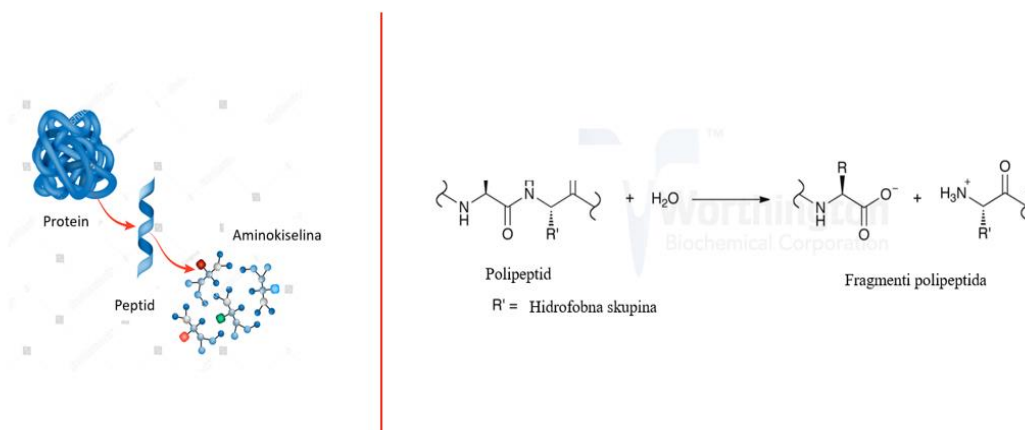
Operacijska stabilnost je stabilnost enzima tijekom njegove kontinuirane uporabe te se obično izražava kao vrijeme poluživota enzima,  $t_{1/2}$  (vrijeme potrebno da njegova aktivnost padne na polovinu početne vrijednosti). Vrlo često se procjenjuje vrijednost konstante inaktivacije,  $k_d$ , koja je povezana s vremenom poluraspada (*Jedn. 2.2.*), uz pretpostavku da se kinetika reakcije inaktivacije enzima može opisati modelom prvog reda.<sup>21</sup>

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0,5}{k_d} \quad (2.2.)$$

Stabilnost skladištenja ovisi o fizikalnom stanju biokatalizatora, o sredini u kojoj se čuva, o dodatku supstrata, efektoru, inhibitora ili stabilizatora, te o temperaturi na kojoj se čuva.<sup>21</sup>

## 2.2. Proteaze

Proteaze su enzimi koji razgrađuju proteine na manje polipeptide ili aminokiseline hidrolizom peptidnih veze koje povezuju aminokiseline u polipeptidnom lancu. Mehanizam hidrolize peptidne veze prikazan je na *Slici 2.5.*

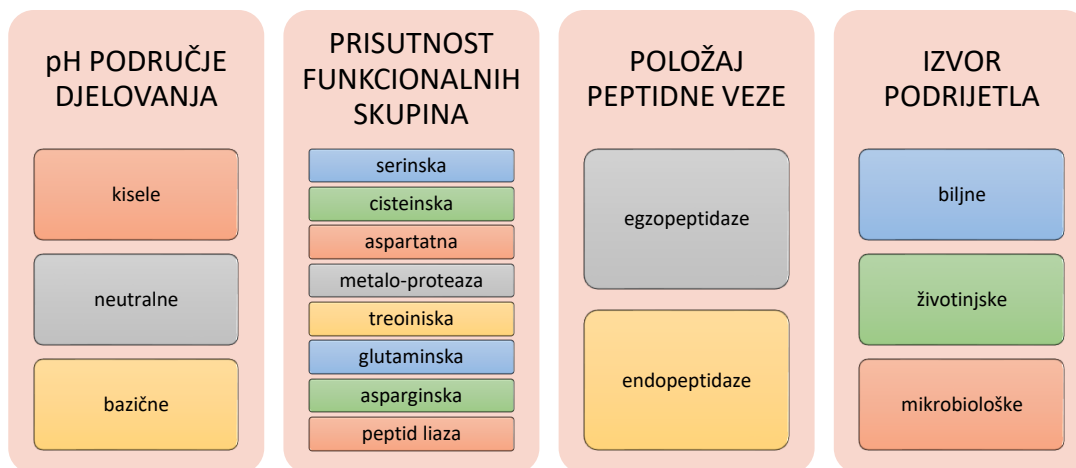


Slika 2.5. Mehanizam hidrolize peptidne veze

Proteaze spadaju u jednu od tri velike grupe industrijskih enzima i njihova je proizvodnja i korištenje u stalnom porastu. Radi se o degradacijskim enzimima koji pokazuju specifičnost i selektivnost u modifikaciji proteina. Prema istraživanjima, ovi enzimi kontroliraju aktivaciju, sintezu i transport proteina.<sup>22</sup> Danas se proteaze mogu pronaći u svim živim organizmima te u virusima, gdje su zasebno evoluirali što je rezultiralo velikim brojem razreda proteaza koje mogu katalizirati istu reakciju s različitim katalitičkim mehanizmima. Upravo se iz tih razloga proteaze mogu podijeliti na različite načine.<sup>23</sup>

### 2.2.1. Podjela proteaza

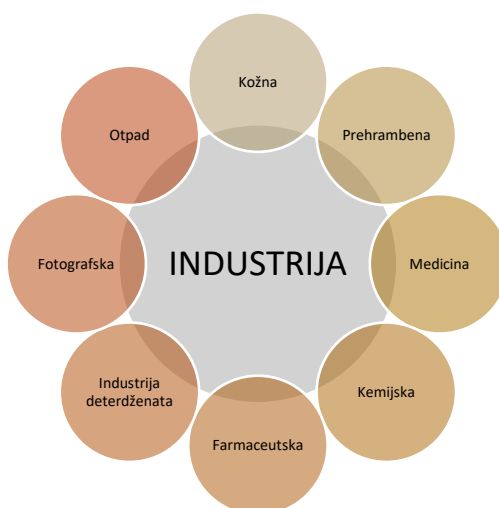
Postoji nekoliko podjela proteaza. Dije se s obzirom na pH područje djelovanja, prema prisutnosti funkcionalnih skupina, prema položaju peptidne veze te prema podrijetlu (Slika 2.6.). Također, dijele se i na unutarstanične proteaze koje imaju ulogu u diferencijaciji stanica, transportu proteina i regulaciji hormona, te na izvanstanične čija je zadaća hidroliza proteina. Budući da proteaze uglavnom spadaju u izvanstanične enzime, njihova izolacija je jednostavan proces.<sup>22</sup>



Slika 2.6. Prikaz podjele proteaza<sup>24</sup>

### 2.2.2. Industrijska primjena proteaza

Proteaze mikrobiološkog podrijetla smatraju se najznačajnijim enzimima u procesu hidrolize, a ujedno su i jedne od najzastupljenijih na tržištu. Zbog visokog prinosa, kratkog vremena proizvodnje, jednostavne genetičke manipulacije i malih troškova sve je veći značaj i potražnja ove vrste proteaza na tržištu. Svoju primjenu pronašle su u raznim granama industrije poput kemijske i prehrambene, ali koriste se i u industriji deterdženata, kožnoj industriji, medicini, farmaciji...*(Slika 2.7.)*<sup>22</sup>



Slika 2.7. Prikaz industrija u kojima se koriste proteaze<sup>22,25</sup>

### 2.2.3. Komercijalne proteaze

Komercijalne proteaze proizvode se od mikroorganizama proizvedenih u laboratoriju te se najčešće nalaze u tekućem stanju ili imobilizirane na odabranim nosačima. U ovome radu



korištene su četiri komercijalne proteaze Flavourzyme, Novozyme, Neutraza i Novo-pro D. Glave karakteristike korištenih proteaza prikazane su u *Tablici 2.2*.

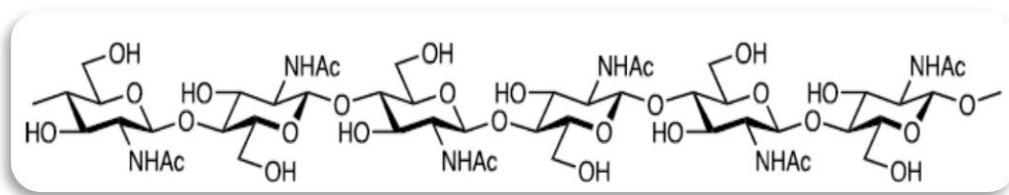
*Tablica 2.2.* Karakteristike korištenih komercijalnih proteaza<sup>26,27</sup>

Proteaza	Tip hidrolize	Generacija peptida ili aminokiselina	pH raspon	Temperaturni raspon	Siguran za korištenje	Tip proteaze
<b>Flavourzyme</b>	Agresivna	Peptidi i aminokiseline	4-8	30-65	Prehrambena industrija	Egzopeptidaza
<b>Novozyme 37071</b>	Manje agresivan	Peptidi	5-9	30-60	Prehrambena industrija	Alkalna proteaza
<b>Neutraza</b>	Manje agresivna	Peptidi	6-9	30-65	Prehrambena industrija	Metallo-endoproteaza
<b>Novo-pro D</b>	Agresivna	Peptidi	7-11	55-75	Za proizvodnju životinjske hrane	Endoproteaza

Na tržištu u današnje vrijeme postoji širok spektar dostupnih proteaza koje se koriste u različitim područjima proizvodnje. Njihova strukturna i funkcionalna raznolikost omogućuje im da se koriste u raznim industrijama te znanstvenim laboratorijskim istraživanjima. Kako bi proteaze zadržale svoju aktivnost i učinkovitost pri svim procesnim uvjetima razvilo se inženjerstvo proteaza. Svrha takvog inženjerstva je da proučava proteaze te modifikacijom aminokiselina poboljšava im svojstva poput toplinske stabilnosti, aktivnosti, specifičnosti i selektivnosti.<sup>28</sup>

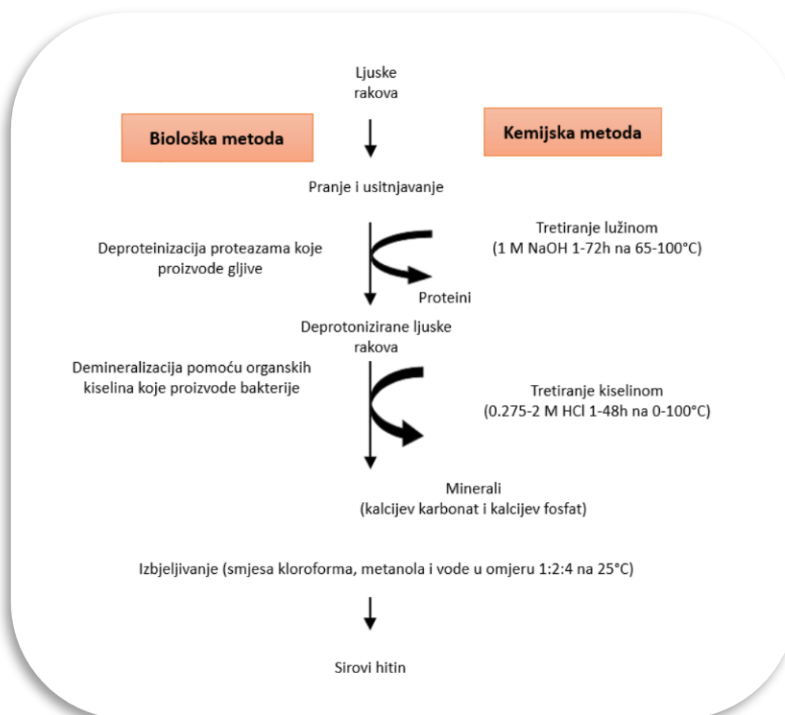
### 2.3. Hitin

Hitin je drugi najrašireniji biopolimer u prirodi nakon celuloze. Njegova kemijska struktura prikazana je na *Slici 2.8*. Ovaj biopolimer i njegovi derivati imaju veliku ekonomsku vrijednost zbog svoje biološke aktivnosti te industrijske i biomedicinske primjene.<sup>29</sup> Također, hitin je netoksičan, biorazgradiv i biokompatibilan što ga čini pogodnim za korištenje u medicini, farmaceutskoj, biotehnološkoj, prehrambenoj industriji i agrikulturi.<sup>8</sup>



Slika 2.8. Kemijska struktura hitina

Hitin se može ekstrahirati iz triju izvora, rakova, insekata i mikroorganizama. Međutim, glavni komercijalni izvor hitina su ljuške rakova poput škampi, kozica, jastoga koji se javljaju u otpadu morske hrane. Ljuške rakova sastoje se od proteina (30-40 %), kalcijevog karbonata (30-50 %) i hitina (20-30 %). Odabir izvora iz kojeg se ekstrahira hitin je bitan jer udio hitina u njemu treba biti dovoljno visok da se ekstrakcija hitina isplati, a ako je moguće, potrebno je izabrati izvor u kojem ima manje kalcijevog karbonata kako bi se hitin što lakše izolirao. Ekstrakcija hitina uključuje dva koraka, demineralizaciju i deproteinizaciju koje se mogu provesti kemijskim ili biološkim putem, što je prikazano na *Slici 2.9*. Kemijska metoda uključuje korištenje kiselina i baza, dok biološka metoda podrazumijeva korištenje mikroorganizama. Prilikom biološke ekstrakcije hitina u procesu deproteinizacije se koriste proteolitičke bakterije i kvasci, dok u procesu demineralizacije sudjeluju bakterije mliječne kiseline.<sup>8,29</sup>



Slika 2.9. Shematski prikaz ekstrakcije hitina biološkom i kemijskom metodom

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Aparatura

##### 3.1.1. Spektrofotometar

Spektrofotometar je instrument za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Apsorpcija svjetlosti kroz otopinu matematički se može opisati Beer-Lambertovim zakonom (*Jedn. 3.1.*) gdje je *ABS* apsorbancija na danoj valnoj duljini svjetlosti,  $\epsilon$  je molarni apsorpcijski koeficijent [ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ], svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, *b* je duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm], a *c* je koncentracija tvari u otopini [ $\text{mol L}^{-1}$ ].

$$ABS = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1.)$$

U ovom radu korišten je UV/VIS spektrofotometar, *Shimadzu UV-1800*, za praćenje aktivnosti i stabilnosti proteaza, te određivanje koncentracije proteina (*Slika 3.1.*).



*Slika 3.1.* Spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

##### 3.1.2. Tresilica

Za provedbu reakcija t pri 1100 okretaja u minuti i temperaturi 40°C korištena je Tresilica *Thermo Scientific™*, termostatirana tresilica prikazana na *Slici 3.2.*



*Slika 3.2. Tresilica Thermo Scientific™*

### **3.1.3. Analitička vaga**

Mase otpadaka ljuštura kozica u čvrstom agregatnom stanju potrebne za provođenje eksperimenata vagane su na analitičkoj vagi *Shimadzu* (Slika 3.3).



*Slika 3.3. Analitička vaga Shimadzu*

### **3.1.4. Centrifuga**

Centrifuga je korištena kako bi se odvojio supernatant, te se uzorak mogao dalje pripremiti za spektrofotometrijsku analizu. Uzorci su centrifugirani 5 min pri 14000 okretaja u minuti na temperaturi od 5°C. Korišten je uređaj *Hettich Universal 320R* prikazan na Slici 3.4.



*Slika 3.4. Centrifuga Hettich Universal 320R*

### **3.1.5. Magnetska miješalica i grijalica**

Za otapanje kazeina kao i miješanje Bradford reagensa korištena je magnetska miješalica i grijalica *IKA RH basic 2* koja je prikazana na *Slici 3.5.*



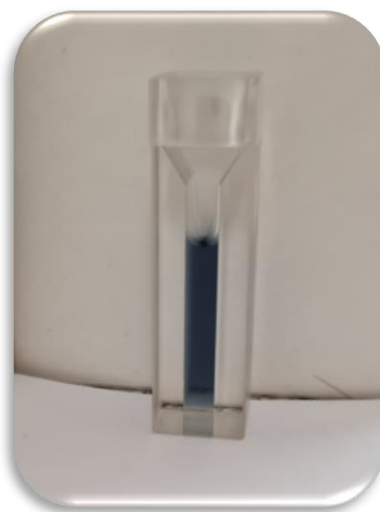
*Slika 3.5. Magnetska miješalica i grijalica IKA RH basic 2*

## **3.2. Analitičke metode**

### **3.2.1. Određivanje aktivnosti proteaza**

Aktivnost proteaza određena je reakcijom hidrolize kazeina gdje kao glavni produkt nastaje tirozin, koji u reakciji s Folin reagensom daje plavo obojenje (*Slika 3.6.*). Mjerena je

promjena apsorbancije kod 660 nm te je iz baždarnog dijagrama (*Prilog 1*) određen ekstincijski koeficijent ( $\epsilon$ ) tirozina koji služi za daljnje određivanje aktivnosti proteaza.



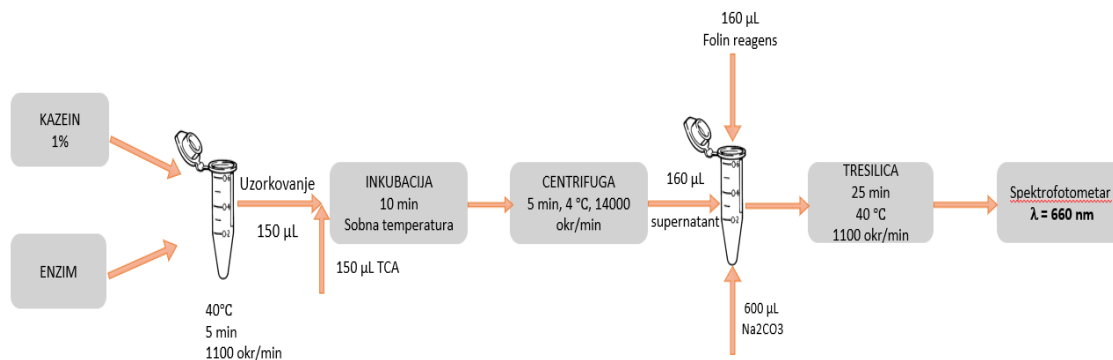
*Slika 3.6.* Tirozin u reakciji s Folin reagensom, plavo obojenje

Aktivnost proteaza određivana je u reaktoru volumena 2 mL gdje je pomiješano 900  $\mu\text{L}$  kazeina s 900  $\mu\text{L}$  enzima razrijeđenog 20 puta (855  $\mu\text{L}$  pufera i 45  $\mu\text{L}$  enzima). Zatim je reaktor stavljen na inkubaciju na tresilicu pri temperaturi od 40 °C i 1100 okretaja u minuti. Unutar prvih 5 minuta reakcije, u razmacima od minute, iz reaktora je uzimano po 150  $\mu\text{L}$  uzorka koji su pomiješani sa 150  $\mu\text{L}$  1 M trikloroctene kiseline (TCA) te su inkubirani na sobnoj temperaturi 15 minuta s ciljem zaustavljanja reakcije i taloženja proteina. Nakon inkubacije uzorak je centrifugiran na temperaturi od 4 °C na 14000 okretaja u minuti tijekom 5 minuta. 160  $\mu\text{L}$  dobivenog supernatanta u nastavku je pomiješano sa 600  $\mu\text{L}$  0.5 M natrijevog karbonata i 160  $\mu\text{L}$  1 M Folin reagensa, nakon čega je uzorak ponovno stavljen na inkubaciju u trajanju od 25 minuta pri temperaturi od 40 °C. Na kraju postupka uzorak je analiziran spektrofotometrijski, odnosno, mjerenjem promjene apsorbancije pri 660 nm. Iz dobivene vrijednosti promjene apsorbancije ( $\Delta\text{ABS}$ ) pri različitim vremenima računa se nagib pravca koji će se koristiti pri izračunu aktivnosti proteaza prema navedenoj jednadžbi (*Jedn. 3.2.*):

$$A_v = \frac{V_r}{\epsilon_{660} \cdot d \cdot V_{enzim}} \cdot \frac{\Delta\text{ABS}}{\Delta t} \quad (3.2.)$$

U gore navedenoj jednadžbi  $V_r$  predstavlja ukupni volumen reaktora (mL),  $V_{enzim}$  je volumen dodanog enzima (mL),  $\epsilon_{660}$  je ekstincijski koeficijent ( $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ) pri valnoj duljini  $\lambda = 660 \text{ nm}$ , te odgovara vrijednosti nagiba baždarnog pravca tirozina (*Prilog 1*),  $d$  predstavlja

promjer kivete koji iznosi  $d = 1 \text{ cm}$ ,  $\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$  predstavlja promjenu apsorbancije u vremenu ( $\text{min}^{-1}$ ). Primjer krivulje promjene apsorbancije u vremenu nalazi se u *Prilogu 2*, dok se na *Slici 3.7.* nalazi shema mjerenja aktivnosti proteaza.



*Slika 3.7.* Shema postupka mjerenja aktivnosti proteaza

### 3.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je Bradfordovom metodom. Za Bradfordovu metodu određivanja proteina koristio se Bradfordov reagens koji je pripreman otapanjem 100 mg bojila Commassie blue u mješavini 50 mL 95%-tnog etanola i 100 mL 85%-tne ortofosforne kiseline nakon čega se dodavala ultračista voda (do 1 L) i višestruko se filtrirala kroz 0,45 µm šprica filter do smeđe boje. Tako pripremljen reagens je čuvan na 4°C u boci zamotanoj folijom te se otprilike sat vremena prije korištenja stavljao na miješalicu kako bi se reagens zagrijao na sobnu temperaturu i bio spreman za korištenje. Koncentracija proteina određuje se mjerenjem apsorbancije smjese uzorka proteina i Bradfordovog reagensa u plastičnim kivetama na spektrofotometru. 500 µL uzorka proteina pomiješalo se s 500 µL Bradfordovog reagensa i inkubiralo na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Nakon inkubacije mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm i 450 nm. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina nalazi se u *Prilogu 3.*

### 3.3. Određivanje optimalne pH vrijednosti i temperature

Kako bi se utvrdili uvjeti u kojima komercijalne proteaze imaju najveću aktivnost, određivana je optimalna pH vrijednost i temperatura.

Optimalna pH vrijednost određivana je u rasponu od 6 do 9 s korakom od 0.5 pri čemu je korišten pufer Tris-HCl navedenih pH-vrijednosti pri 40 °C. Pri pH vrijednosti od 7.5 ispitivani



je temperaturni raspon od 40 °C do 60 °C s korakom od 5 °C. Navedeni rasponi pH vrijednosti i temperature odabrani su na temelju podataka proizvođača.<sup>26,30</sup>

Za određivanje optimalnog pH, navedene pH vrijednosti pufera (6-9) korištene su u postupku pripreme otopine kazeina i razrjeđenja enzima koje su se dalje koristile prilikom određivanja aktivnosti proteaza (poglavlje 3.2.1.). Pri određivanju optimalne temperature postupak se provodio kao mjerenje aktivnosti proteaza (poglavlje 3.2.1.), a u fazi procesa koja uključuje inkubaciju u trajanju od 25 minuta, reaktori su postavljeni na inkubaciju na tresilice na temperaturama od 40 do 60 °C.

### 3.4. Određivanje operacijske stabilnosti

Pri ranije određenoj optimalnoj pH vrijednosti i temperaturi određivana je operacijska stabilnost enzima. Operacijska stabilnost mjerena je tako da je u vremenskom razdoblju od 0 do 71.5 h (0 h, 0.5 h, 2 h, 4 h, 24 h, 47 h, 47.5 h, 71 h, 71.5 h) uzorkovano 90 µL uzorka iz reaktora, koji su se potom razrijedili i pomiješali s 900 µL kazeina i 810 µL pufera. Iz tako pripremljenih uzoraka određivala se aktivnost proteaza (poglavlje 3.2.1.). Od korištenih komercijalnih proteaza, Novozyme, Neutraza i Novo-pro D su razrijedeni 400 puta dok je Flavourzyme razrijedeni 200 puta.

Eksperimentalni podaci smanjenja aktivnosti enzima opisani su modelima inaktivacije kao što su kinetika 1. reda, kinetika 2. reda te troparametarski modelom korištenjem programskog paketa *Scientist*.

Najjednostavniji inaktivacijski model kojim se najčešće opisuje brzina inaktivacije je kinetika 1. reda koja je prikazana sljedećom jednačinom (*Jedn. 3.3.*):

$$\frac{dA}{dt} = -k_d A \quad (3.3.)$$

Sljedeći model kojim se može opisati brzina inaktivacije je kinetika 2. reda koja je prikazana jednačinom (*Jedn. 3.4.*):

$$\frac{dA}{dt} = -k_d A^2 \quad (3.4.)$$

Troparametarski model je treći model kojim možemo opisati brzinu inaktivacije. Pretpostavlja da se enzim sastoji od dva izoenzima od kojih svaki oblik ima svoju brzinu inaktivacije. Brzina inaktivacija pojedinog izoenzima se opisuje kinetikom 1. reda.. Takav model se opisuje jednačinom (*Jedn. 3.5.*):



$$A = A_0[(\alpha e^{-k_{d1}t}) + (1 - \alpha)e^{-k_{d2}t}] \quad (3.5.)$$

gdje je:  $A$  aktivnost proteaze,  $k_d$  inaktivacijska konstanta,  $A_0$  početna aktivnost proteaze,  $t$  vrijeme, a  $\alpha$  parametar koji označava udio jednog ili drugog oblika enzima.

### 3.5. Priprema uzorka kozica

Kao sirovina iz koje je ekstrahirani hitin korišteni su otpaci ljuštura kozica. Uzorci otpadaka kozica prikupljeni su s tržnice Dubrava (Zagreb). Pripremljeni su tako da su prvo tri puta isprani s vodovodnom vodom nakon čega su se sušili tijekom 14 h u sušioniku s digestorom, koji odvodi neugodne mirise, te su na kraju samljeveni u mlincu za mljevenje kave. Mljevenjem ljuštura kozica dobiven je prah karakterističnog mirisa koji je potom prosijan na analitičkom situ promjera 200 mm i veličine otvora mreže 2 mm. Prosijavanjem kozica dobivena je heterogena smjesa kozica frakcija različitih veličina čestica manjih od 2 mm (*Slika 3.8.*).



*Slika 3.8.* Uzorak otpadaka kozica

### 3.6. Hidroliza proteina u otpadcima kozica

Hidroliza proteina u otpadcima kozica katalizirana je komercijalnim proteazama različitih koncentracija (0.5 i 0.1 U / 10 mg). Provedena je u kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktor}} = 600 \mu\text{L}$ ) miješanjem 10 mg kozica s određenim volumenom enzima otopljenog u Tris HCl puferu pH=8 pri 40 °C tijekom 8 h. Komercijalne proteaze koje su upotrijebljene za izradu ovog rada prikazane su u *Tablici 3.1.* zajedno sa korištenim volumenima pufera i proteaza tj. enzima, koncentracijama te razrjeđenjem.

Svaki eksperiment hidrolize proteina u otpadcima kozica trajao je određeno vrijeme (1 h, 2 h, 4 h, 6 h i 8 h) nakon kojega je prekinut kako bi se utvrdila aktivnost enzima i konverzija proteina. Po završetku svakog eksperimenta, reaktor je centrifugiran 5 minuta pri 4 °C na 14 000 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja, dobiveni supernatant je odvojen radi određivanja preostale aktivnosti enzima te je razrijeđen 20 puta. Ostatak kozica je dva puta opran u Tris HCl puferu, te je korišten za analizu sadržaja proteina po optimiranom postupku opisanom u poglavljima 3.2.2. i 3.7.

*Tablica 3.1.* Prikaz kombinacija određenog volumena pufera i proteaza koji su dodani kozicama za hidroliza proteina.

<b>Proteaza</b>	<b>Koncentracija [U /10 mg]</b>	<b>Razrijeđenje proteaze</b>	<b>Volumen proteaze [μL]</b>	<b>Volumen pufera [μL]</b>
<b>Flavourzyme</b>	0.5	10 x	11	89
	0.1	50 x	11	89
<b>Neutraza</b>	0.5	10 x	9	91
	0.1	50 x	9	91
<b>Novozyme</b>	0.5	10 x	7	93
	0.1	50 x	7	93
<b>Novo-pro D</b>	0.5	10 x	5	95
	0.1	50 x	5	95

### 3.7. Ekstrakcija proteina iz otpadaka kozica

Proteini iz otpadaka kozica ekstrahirani su metodom alkalne ekstrakcije koja se pokazala dosta učinkovitom kod ekstrakcije proteina iz ostataka škampi, lososa, bakalara.<sup>31,32</sup>

Proces je proveden homogenizacijom 10 mg uzorka kozica sa 60 μL 0.5 M temeljne otopine natrijeva hidroksida (NaOH), 174 μL 10% temeljne otopine natrijeva klorida (NaCl) i 366 μL ultra čiste vode. Tako homogenizirana smjesa je inkubirana na tresilici tijekom 60 minuta pri 40°C na 1100 okretaja u minuti. Po završetku inkubacije uzorci su centrifugirani na

5 minuta pri 4 °C na 14 000 okretaja u minuti, nakon čega je supernatant odvojen radi određivanja koncentracije proteina metodom opisanom u poglavlju 3.2.2.

### 3.8. Ponovljivi eksperimenti

Svrha ponovljivih eksperimenata je da se vidi koliko puta istu proteazu odnosno isti enzim možemo ponovno upotrijebiti za hidrolizu proteina u ostacima kozica.

Eksperimenti su provedeni tako da su se prvo pripremili uzorci kozica od 10 mg u koje će se dodati određeni volumen pufera, 0.1 M Tris HCl, te proteaze tako da volumen reaktora iznosi 200 µL. Svaki eksperiment se provodi 1 h nakon čega se zaustavlja. U prvi uzorak kozica dodaje se određeni volumen pufera i proteaze te ih se stavlja na tresilicu pri 40°C i 1100 okretaja tijekom sat vremena. Nakon 1 h eksperiment se zaustavlja centrifugiranjem na 4°C i 14 000 okretaja u minuti. Ostaci kozica koji ostaju kao talog se dva puta operu u puferu i spreme za analizu proteina (poglavlje 3.2.2.), a odvojeni supernatant se istovremeno dodaje u sljedeći uzorak kozica te se eksperiment ponavlja sve do zadnjeg uzorka kozica. Nakon završenog zadnjeg eksperimenta s istom proteazom, iz odvojenog supernatanta se određuje aktivnost proteaze prema metodi opisanom u poglavlju 3.2.1.

### 3.9. Obrada rezultata

Obrada rezultata provedena je u programskom paketu *Scientist*. Na temelju pretpostavljenih modela i eksperimentalnih podataka napravljena je simulacija eksperimenta. Parametri modela procijenjeni su simpleks metodom te metodom najmanjih kvadrata koje se temelje na pronalasku minimalnog zbroja kvadrata pogreške između podataka izračunatih pomoću modela i eksperimentalnih podataka.<sup>33</sup> Simpleks metoda je jako dobra za određivanje približne vrijednosti parametara, a koristi se onda kada postoji velika razlika između početnih i pravih vrijednosti parametara.

Nakon napisanog modela i procijenjenih parametara, provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi određenog modela metodama kao što su Eulerova metoda, metoda Runge Kutta IV, Bulirsch - Stoer metoda i Episode algoritam u programu *Scientist*.

U svrhu statističke usporedbe modela korišteni su kriteriji poput  $R^2$  (standardna devijacija) te *MSC* (engl. *Model Selection Criterion*) koji je prikazan sljedećom jednadžbom (*Jedn. 3.6.*):

$$MSC = \ln \left( \frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (Y_{exp,i} - \bar{Y}_{exp})^2}{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (Y_{exp,i} - Y_{rač,i})^2} \right) - \frac{2 \cdot p}{n} \quad (3.6.)$$

gdje su  $w_i$  parametri za svaki uzorak podataka ( $i$ ),  $Y_{rač,i}$  previđene (simulirane, ugrađene) vrijednosti,  $Y_{exp,i}$  izmjerene vrijednosti, a  $\overline{Y_{exp}}$  srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti. MSC ili kriterij odabira modela je recipročna modifikacija Akaike informacijskog kriterija korištena u programu *Scientist* (MicroMath, Sant Louis, Missouri, USA). MSC je neovisan o veličini odnosno skaliranju podataka, a veća vrijednost MSC-a znači bolje prilagođavanje. Prilikom usporedbe modela, najprikladniji model za podatke je onaj s najvećom vrijednosti MSC-a.<sup>34</sup>

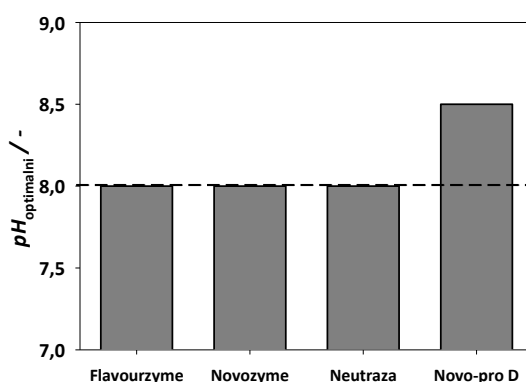
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu provedena je optimizacija procesa hidrolize proteina u ljuskama kozica primjenom komercijalnih proteaza. Cilj optimizacije je bio odrediti optimalne radne uvjete proteaza te u tim uvjetima ispitati njihovu aktivnost, stabilnosti i mogućnost konverzije odnosno razgradnju proteina iz otpadaka ljusaka kozica.

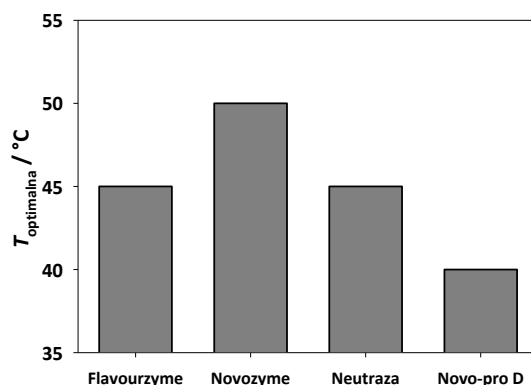
S ciljem pronalaženja najbolje dostupne komercijalne proteaze ispitane su njih četiri proizvođača Novozyme (*Tablica 3.1.*). Za sve proteaze je provedeno ispitivanje ovisnosti aktivnosti o pH i temperaturi te je određena operacijska stabilnost u radnim uvjetima bez prisustva supstrata. Reakcija hidrolize proteina u ljuskama kozica provedena je u kotlastom reaktoru, pri čemu je praćena aktivnost odnosno stabilnost proteaze i koncentracija proteina. Reakcija hidrolize proteina ispitivana je pomoću četiri proteaze dviju različitih koncentracija (0.5 i 0.1 U / 10 mg). Za proteaze s najboljim konverzijama provedene su još i reakcije hidrolize u ponovljivim reaktorima kako bi se ispitala mogućnosti ponovnog korištenja iste proteaze s ciljem njene manje potrošnje u procesu hidrolize proteina.

### 4.1. Optimalni radni uvjeti komercijalnih proteaza

Svaka proteaza ima svoj optimalni pH i temperaturu pri kojoj je njezina aktivnost najveća odnosno brzina reakcije maksimalna. Tako iz grafičkih prikaza prikazanih na *Slikama 4.1.* i *4.2.* možemo vidjeti kako optimalni pH za proteaze Flavourzyme, Novozyme i Neutrazu iznosi 8, dok za proteazu Novo-pro D iznosi 8.5. Također optimalna temperatura za proteaze Flavourzyme i Neutrazu iznosi 45°C, za Novozyme je 50°C, a za Novo-pro D je 40°C.

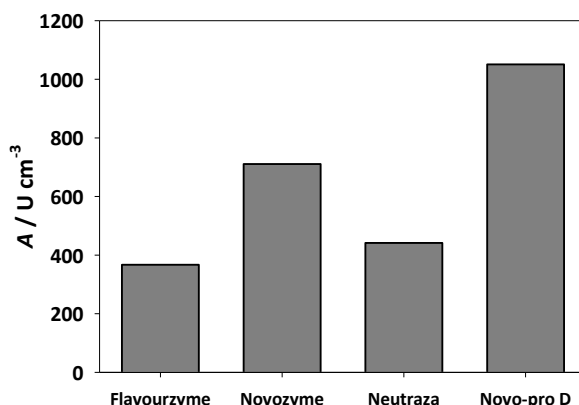


*Slika 4.1.* Optimalni pH za ispitivane proteaze ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ )



Slika 4.2. Optimalna temperatura za ispitivane proteaze ( $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8)

Za daljnja ispitivanja za sve ispitivane proteaze kao optimalna pH vrijednost uzet je pH 8, a optimalna temperatura  $40^\circ\text{C}$ . Pri tim optimalnim uvjetima sve proteaze su pokazale zadovoljavajuću aktivnost te se njihova usporedba nalazi na Slici 4.3. Kako iz slike možemo vidjeti, najveću aktivnost ima proteaza Novo-pro D, zatim Novozyme pa Neutraza i najmanju aktivnost je pokazala proteaza Flavourzyme.

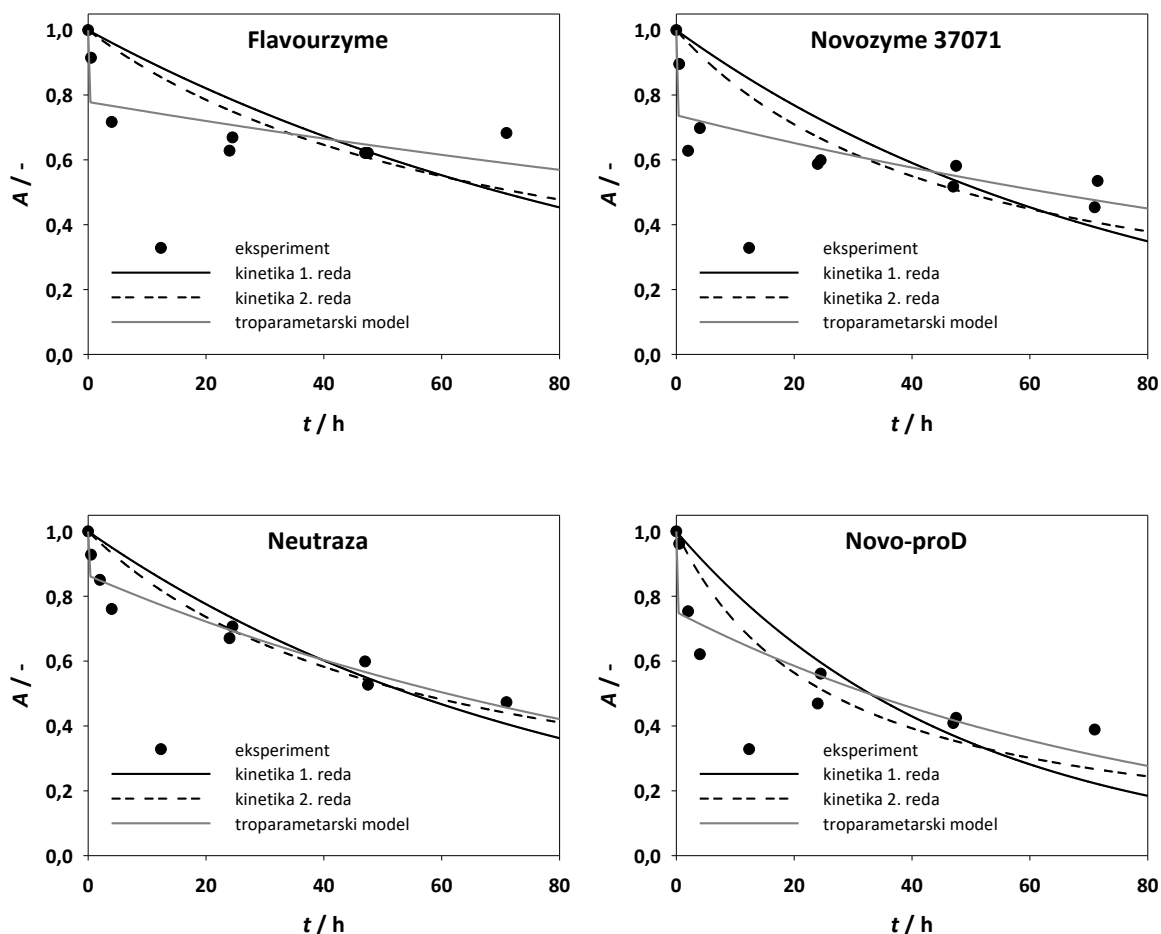


Slika 4.3. Usporedba aktivnost ispitivanih proteaza ( $T = 40^\circ\text{C}$ ,  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8)

#### 4.2. Operacijska stabilnost proteza pri $T = 40^\circ\text{C}$ i pH 8

Operacijska stabilnost proteaza je određena pri odabranim uvjetima, praćenjem aktivnosti proteaze u vremenu kako je opisano u poglavlju 3.4. Pad aktivnosti proteaze opisan je kinetičkim modelom inaktivacije u programskom paketu *Scientist*. pri čemu su ispitana tri empirijska modela (kinetika 1. reda, kinetika 2. reda i troparametarski model) te procijenjeni sljedeći parametri:  $k_d$ , konstanta brzine inaktivacije enzima za kinetiku 1. i 2. reda,  $k_{d1}$  i  $k_{d2}$ ,

inaktivacijske konstante pojedinog oblika izoenzima i  $\alpha$ , parametar koji označava udio jednog izoenzima za troparametarski model.

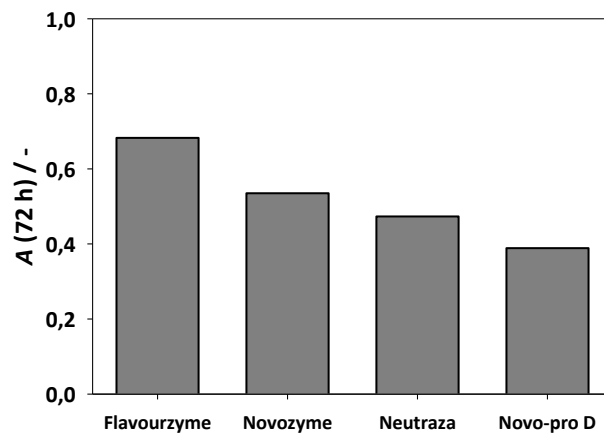


Slika 4.4. Operacijska stabilnost proteaza u radnim uvjetima ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0.1\text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8)

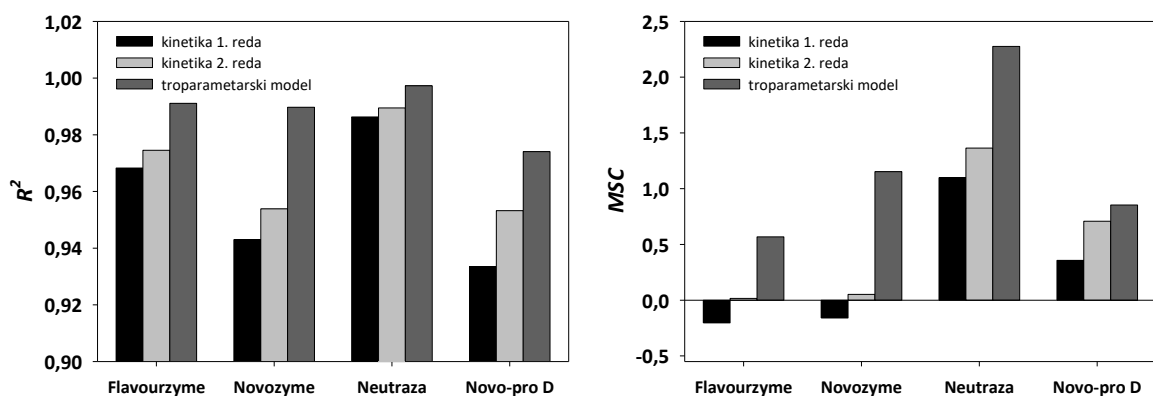
Na Slici 4.4. prikazana je grafička usporedba triju ispitivanih modela za svaku proteazu. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da troparametarski model najbolje opisuje kinetiku inaktivacije proteaza iako se uobičajeno smatra da je najbolji model onaj s manjim brojem parametara. U Tablici 4.1. prikazani su procijenjeni parametri modela kinetike 1. reda, 2. reda i troparametarskog modela inaktivacije proteaza u radnim uvjetima. Manja konstanta brzine inaktivacije, upućuje na veću stabilnost proteaze, a samim time i njezinu bolju učinkovitost.<sup>21</sup> Vrijednosti  $\alpha$  parametra, troparametarskog modela ukazuju na to da se veći dio jednog oblika enzima deaktivira sporo dok se manji dio drugog oblik enzima deaktivira značajno brže. Iz dobivenih vrijednosti može se zaključiti da je najstabilnija proteaza Flavourzyme s obzirom na to da joj je preostala aktivnost nakon 72 h bila viša od 60 %, dok je najnestabilnija proteaza Novo-pro D s preostalom aktivnošću nakon 72 h oko 40% ( Slika 4.5.)

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

Enzim	Model 1. reda	Model 2. reda	Troparametarski model		
	$k_d / \text{min}^{-1}$	$k_d / \text{min}^{-1}$	$\alpha$	$k_{d1} / \text{min}^{-1}$	$k_{d2} / \text{min}^{-1}$
Flavourzyme	$1.65 \cdot 10^{-4}$	$2.28 \cdot 10^{-4}$	0.78	$6.53 \cdot 10^{-5}$	0.39
Novozyme	$2.19 \cdot 10^{-4}$	$3.41 \cdot 10^{-4}$	0.74	$1.03 \cdot 10^{-4}$	0.53
Neutraza	$2.12 \cdot 10^{-4}$	$2.99 \cdot 10^{-4}$	0.86	$1.50 \cdot 10^{-4}$	0.68
Novo-pro D	$3.52 \cdot 10^{-4}$	$6.44 \cdot 10^{-4}$	0.75	$2.08 \cdot 10^{-4}$	0.30



Slika 4.5. Usporedba preostale aktivnosti proteaza prilikom ispitivanja operacijske stabilnosti enzima ( $t = 72 \text{ h}$ ,  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8)



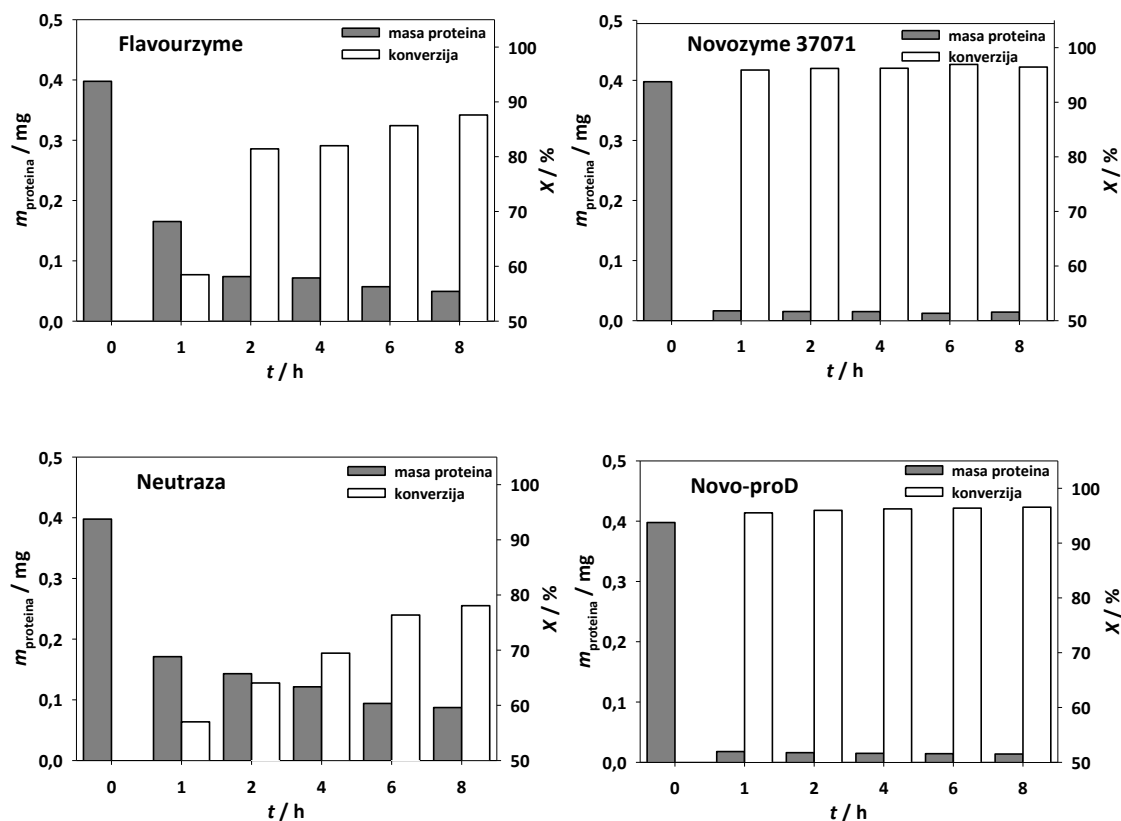
Slika 4.6. Statistička analiza modela inaktivacije proteaza



Provedena je i statistička analiza modela inaktivacije proteaza te su rezultati prikazani na *Slici 4.6.* u obliku stupčastih prikaza vrijednosti  $R^2$  i  $MSC-a$  za svaku proteazu.  $R^2$  najčešće se koristi u statistici za procjenu prilagodbe modela regresijske jednadžbe te je poželjno da njegova vrijednost bude što veća.<sup>33</sup> Za svaku proteazu dobivena vrijednost  $R^2$  je najveća za troparametarski model, što označava da upravo on najbolje opisuje brzinu inaktivacije proteaza. MSC je alat unutar programskog paketa *Scientist* koji služi za prihvatanje ili odbacivanje modela.<sup>34</sup> Njegova vrijednost je također kod svih ispitivanih proteaza najveća za troparametarski model. Modeli s MSC vrijednošću ispod 0 nisu prihvatljivi, a to se odnosi na model kinetika 1. reda za Flavourzyme i Novozyme.

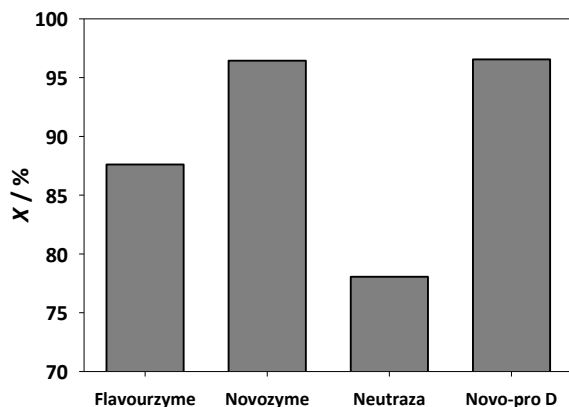
### **4.3. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru 0.5 U / 10 mg**

Hidroliza proteina u ljuskama kozicama katalizirana je s četiri komercijalne proteaze koncentracije 0.5 U / 10 mg kroz 8 sati. Uzorci iz kojih se određivala aktivnost proteaza i konverzija proteina uzeti su u određenim vremenima (1 h, 2 h, 4 h, 6 h i 8 h). Aktivnost proteaza određivala se iz supernatanta uzorka dok se konverzija proteina određivala iz krutog ostatka kozica. Rezultati hidrolize proteina prikazani su na *Slici 4.7.* te je iz njih vidljivo kako su sve četiri komercijalne proteaze uspješno razgradile proteine iz otpadaka kozica. Na grafovima je vidljivo kako Neutraza pokazuje konverziju oko 80%, Flavourzyme oko 90 % dok je kod proteaza Novozyme i Novo-pro D konverzija blizu 100%. Konverzija blago raste tijekom vremena kod proteaza Flavourzyme i Neutraze dok se kod proteaza Novozyme i Novo-pro D odmah nakon 1 h provedbe eksperimenta postiže maksimalna konverzija U sva četiri slučajeva vidljivo je da se najveća količina proteina hidrolizira u prvih sat vremena od početka pokusa te da se kasnije količina proteina smanjuje za malu količinu i sporo.

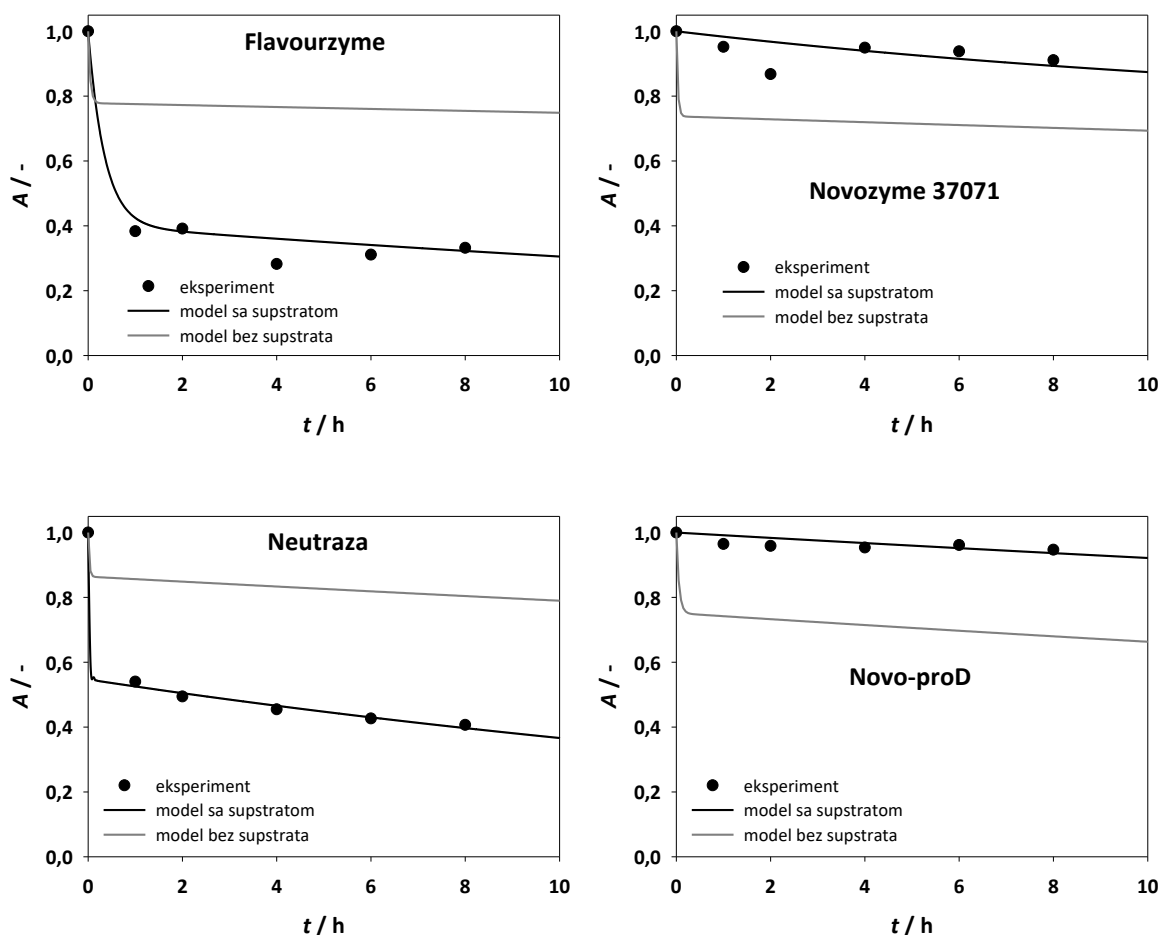


Slika 4.7. Masa proteina i konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 600\text{ }\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$ ,  $A_{\text{protease}} = 0.5\text{ U}$ )

Na grafičkom prikazu (Slika 4.8.) je vidljivo kako je hidroliza proteina uspješna za sve četiri proteaze te kako je njihova konverzija visoka što ukazuje da se sve proteaze mogu koristiti za razgradnju proteina u ostacima kozica te da nema potrebe za njihovim kombiniranjem. Na Slici 4.9. prikazani su grafovi operacijske stabilnosti proteaza tijekom hidrolize proteina iz ostataka kozica. Usporedbom grafova, vidljivo je kako se eksperimentalni podaci ispitivanih proteaza više-manje poklapaju s modelom sa supstratom te pokazuju trend pravilnog ponašanja odnosno pada stabilnosti s vremenom. Iz grafova je vidljivo kako je najnestabilnija proteaza Flavourzyme, dok je najstabilnija proteaza Novo-pro D. U eksperimentima bez supstrata najstabilnija proteaza je bila Flavourzyme, a najnestabilnija Novo-pro D što se može protumačiti da produkti hidrolize proteina doprinose poboljšanoj stabilnosti proteaze Novo-pro D dok kod Flavourzima rezultiraju smanjenom stabilnošću.



Slika 4.8. Usporedba konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ( $t = 8$  h,  $T = 40$  °C,  $50$  mmol  $\text{dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 600\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10$  mg,  $A_{\text{proteaze}} = 0.5$  U)

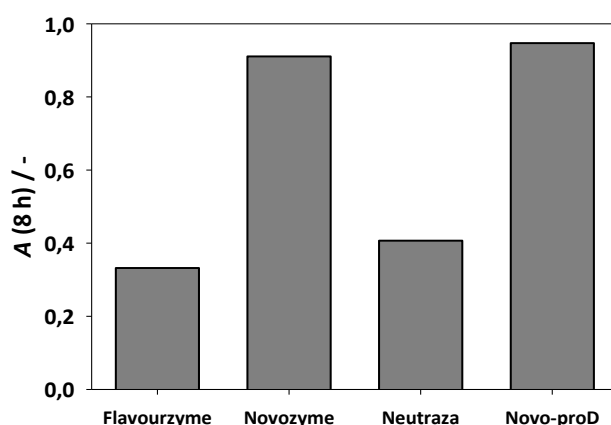


Slika 4.9. Operacijska stabilnost enzima tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ( $T = 40$  °C,  $50$  mmol  $\text{dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 100\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10$  mg,  $A_{\text{proteaze}} = 0.5$  U)

Tablica 4.2. Procijenjeni parametri troparametarskog modela inaktivacije proteaza u radnim uvjetima sa supstratom ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 600\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$ ,  $A_{\text{protease}} = 0.5\text{ U}$ )

Enzim	$\alpha$	$k_{d1}/\text{min}^{-1}$	$k_{d2}/\text{min}^{-1}$
Flavourzyme	0.40	$4.60 \cdot 10^{-4}$	$4.82 \cdot 10^{-2}$
Novozyme	0.74	$6.00 \cdot 10^{-7}$	$1.09 \cdot 10^{-3}$
Neutraza	0.55	$6.68 \cdot 10^{-4}$	0.70
Novo-pro D	0.75	$1.83 \cdot 10^{-4}$	$1.20 \cdot 10^{-6}$

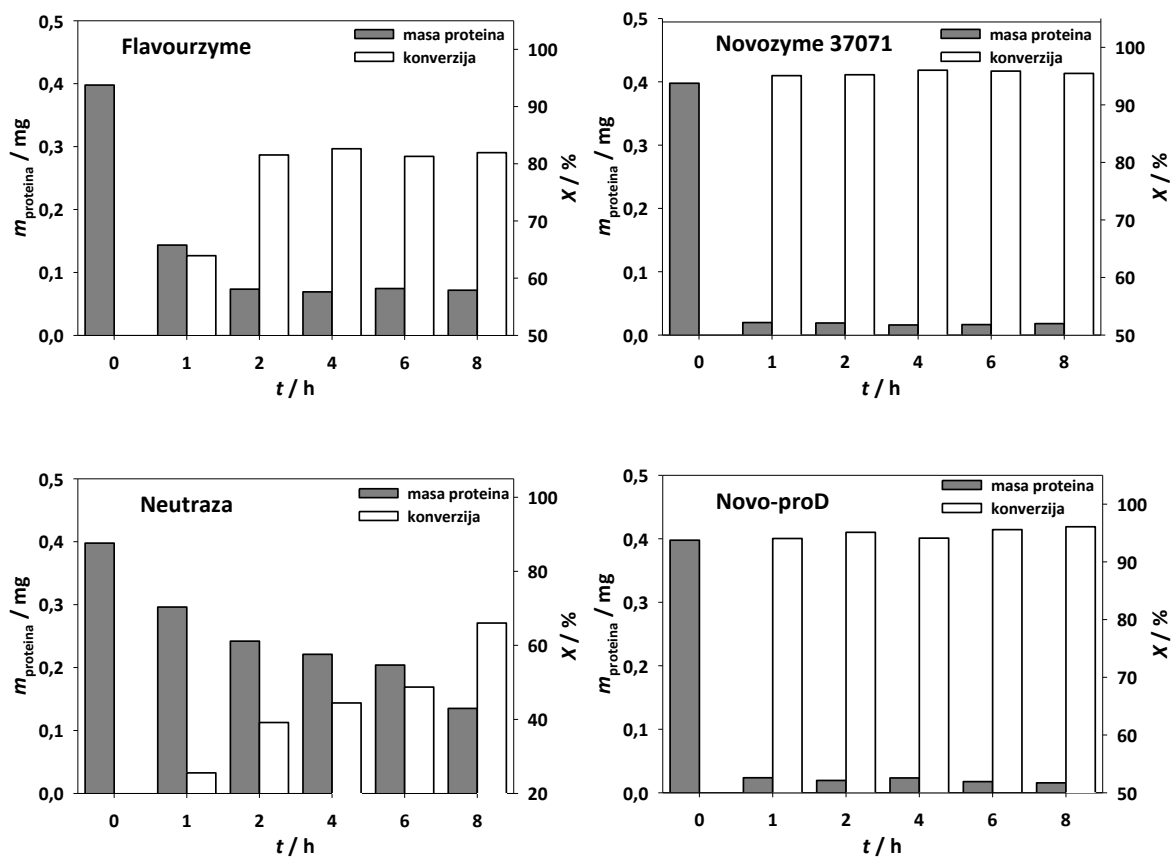
U Tablici 4.2. vidljivi su procijenjeni parametri troparametarskog modela inaktivacije pojedinih proteaza u radnim uvjetima sa supstratom, te prema konstantama inaktivacije možemo zaključiti kako su najstabilnije proteaze Novozyme i Novo-pro D. Usporedbom preostale aktivnosti ispitivanih proteaza (slika 4.10.) može se zaključiti kako najmanju aktivnost ima Flavourzyme, a najveću preostalu aktivnost ima Novo-pro D te odmah nakon njega Novozyme. Ovakvi rezultati se slažu s eksperimentalnim podacima na grafovima na Slici 4.9. na kojem je vidljivo kako su Novo-pro-D i Novozyme operacijski najstabilniji te prema Tablici 4.2. kako su im konstante inaktivacije najmanje.



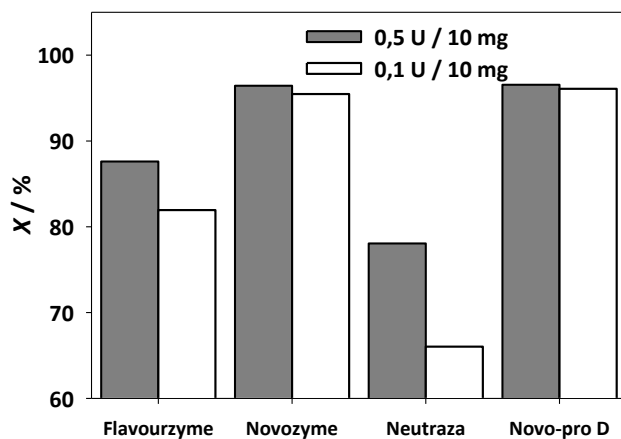
Slika 4.10. Usporedba preostale aktivnosti enzima nakon hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirane proteazama u kotlastom reaktoru ( $t = 8\text{ h}$ ,  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 600\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$ ,  $A_{\text{protease}} = 0.5\text{ U}$ )

#### 4.4. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru 0.1 U / 10 mg

Hidroliza proteina u ljuskama kozicama katalizirana je s četiri komercijalne proteaze koncentracije 0.1 U / 10 mg kroz 8 sati. Uzorci iz kojih se određivala aktivnost proteaza i konverzija proteina uzeti su u određenim vremenima (1 h, 2 h, 4 h, 6 h i 8 h). Aktivnost proteaza određivala se iz supernatanta uzorka dok se konverzija proteina određivala iz krutog ostatka kozica. Rezultati hidrolize proteina prikazani su na *Slici 4.11.* te je iz njih vidljivo kako su sve četiri komercijalne proteaze uspješno razgradilo proteine iz otpadaka kozica. Na grafovima je vidljivo kako se uz enzim Neutrazu postigla konverzija od oko 70%, Flavourzyme oko 80 % dok je kod proteaza Novozyme i Novo-pro D konverzija blizu 100%. Konverzija blago raste tijekom vremena kod Neutraze dok se kod proteaza Novozyme i Novo-pro D odmah nakon 1 h provedbe eksperimenta postiže maksimalna konverzija, odnosno kod Flavourzyme nakon 2 h. U gotovo svim slučajevima vidljivo je da se najveća količina proteina hidrolizira u prvih sat vremena od početka pokusa osim kod Neutraze gdje količina hidroliziranog proteina pada s vremenom reakcije. Iz grafičkog prikaza uspoređenih konverzija proteaza s većom i manjom koncentracijom (*Slika 4.12.*) možemo vidjeti kako su proteaze Novozyme i Novo-pro D imale gotovu jednaku konverziju za obje koncentracije blizu 100%. S obzirom na to da su obje konverzije blizu 100%, može se zaključiti kako su te proteaze veoma uspješne u hidrolizi proteina i u manjim koncentracijama pa su tako dobar izbor jer ih se ne treba upotrijebiti u velikoj količini. Proteaze Flavourzyme i Neutraza pri manjoj koncentraciji imaju manju konverziju što znači da je uspješnija hidroliza proteina pri njihovoj većoj koncentraciji.

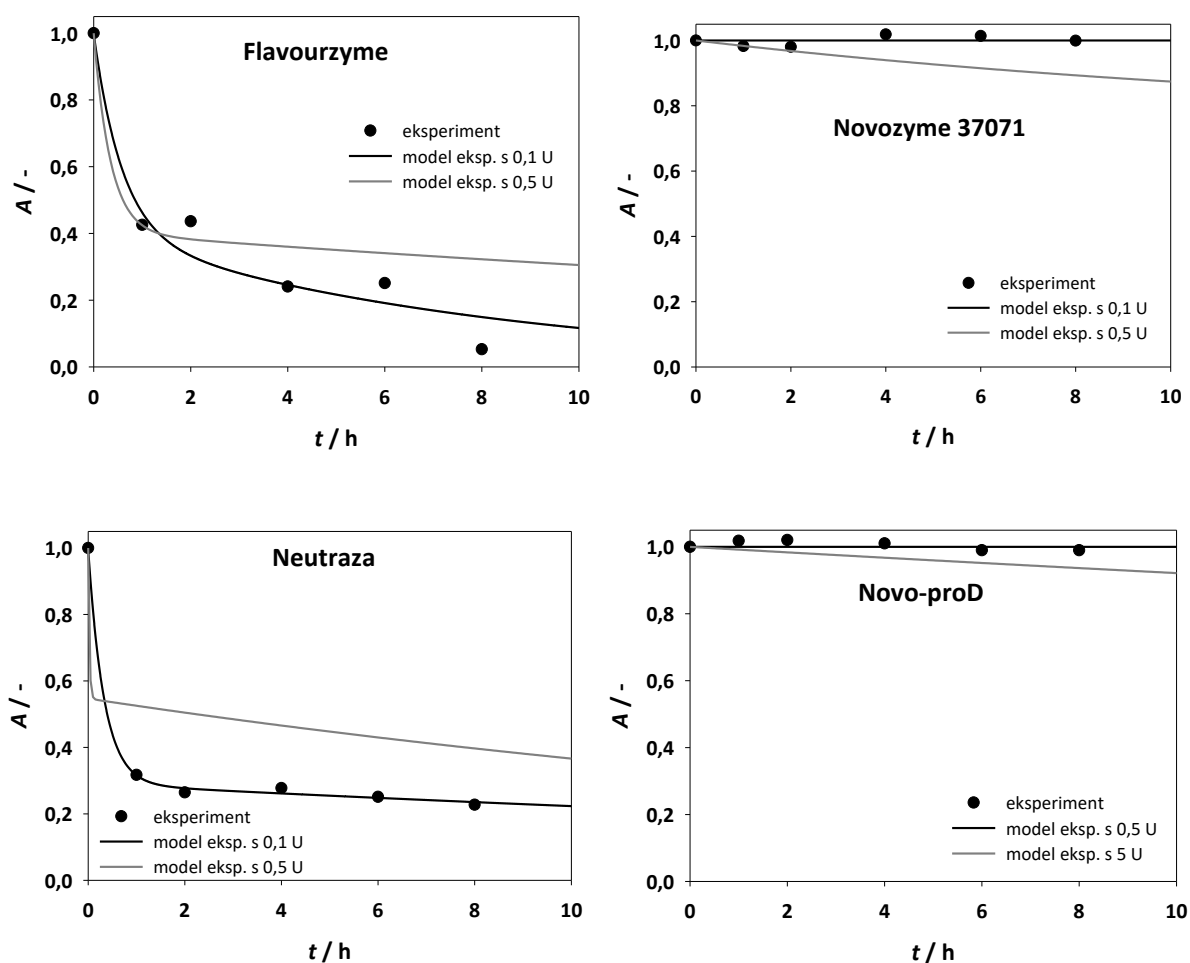


Slika 4.11. Masa proteina i konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ( $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 100 \mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10 \text{ mg}$ ,  $A_{\text{protease}} = 0.1 \text{ U}$ )



Slika 4.12. Usporedba konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ( $t = 8 \text{ h}$ ,  $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 100 \mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10 \text{ mg}$ ,  $A_{\text{protease}} = 0.1 \text{ U}$ ;  $0.5 \text{ U}$ )

Na *Slici 4.13.* prikazani su grafovi operacijske stabilnosti proteaza tijekom hidrolize proteina iz ostataka kozica. Usporedbom grafova, vidljivo je kako se eksperimentalni podaci ispitivanih proteaza više-manje poklapaju s modelom eksperimenta s manjom koncentracijom od 0.1 U / 10 mg. Iz grafova je vidljivo kako je najnestabilnija proteaza Neutraza, dok su proteaze Novozyme i Novo-pro D jako stabilne što potvrđuju i procijenjeni parametri troparametarskog modela inaktivacije prikazani u *Tablici 4.3.*

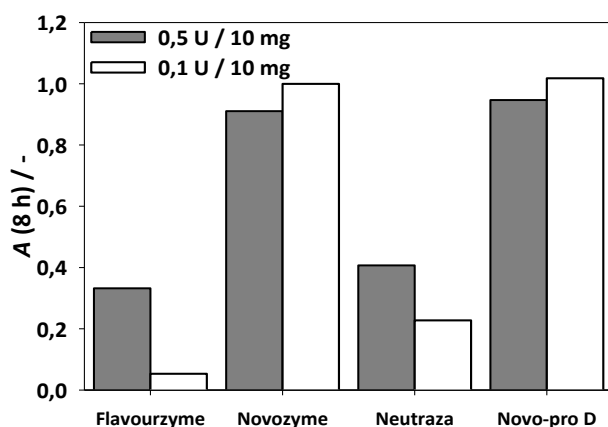


*Slika 4.13.* Operacijska stabilnost enzima tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,

$$V_{\text{reaktor}} = 100\mu\text{L}, m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}, A_{\text{protease}} = 0.1\text{ U}$$

Tablica 4.3. Procijenjeni parametri troparametarskog modela inaktivacije proteaza u radnim uvjetima sa supstratom ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 600\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$ ,  $A_{\text{protease}} = 0,1\text{ U}$ )

Enzim	$\alpha$	$k_{d1}/\text{min}^{-1}$	$k_{d2}/\text{min}^{-1}$
Flavourzyme	0.40	$2.06 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^{-2}$
Novozyme	0.74	0	0
Neutraza	0.71	$5.09 \cdot 10^{-2}$	$4.37 \cdot 10^{-4}$
Novo-pro D	0.75	0	0 <sup>6</sup>



Slika 4.14. Usporedba preostale aktivnosti enzima nakon hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirane proteazama u kotlastom reaktoru ( $t = 8\text{ h}$ ,  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 100\mu\text{L}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$ ,  $A_{\text{protease}} = 0.1\text{ U}$ ;  $0.5\text{ U}$ )

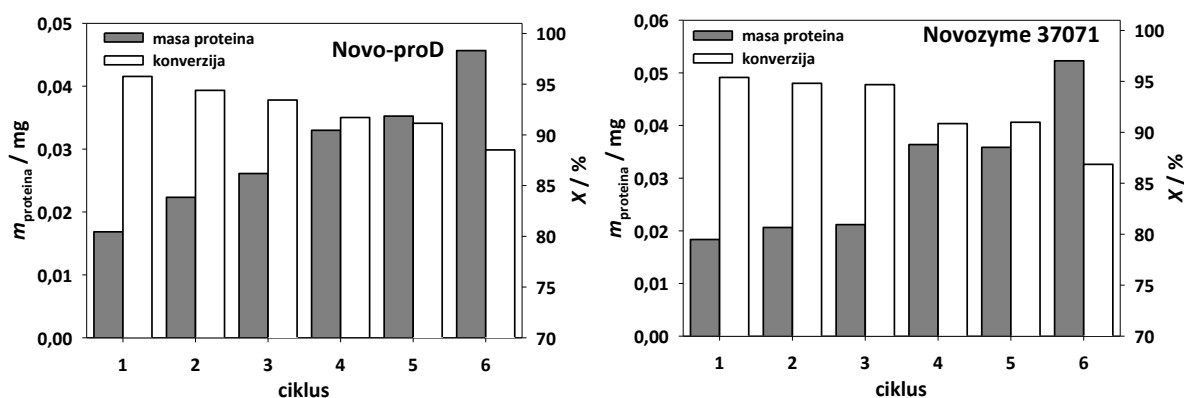
Preostala aktivnost proteaza nakon hidrolize proteina u ostacima kozica (Slika 4.14.) još je jedna potvrda kako su proteaze Novo-pro D i Novozyme učinkovitije od proteaza Flavourzyme i Neutraze. Pri većoj i pri manjoj koncentraciji aktivnost proteaza Novo-pro D i Novozyme je veća nego ona kod Flavourzyme i Neutraze. Također, kod proteaza Novo-pro D i Novozyme ne postoji značajna razlika u aktivnosti pri različitim koncentracijama, dok je kod proteaza Flavourzyme i Neutraza aktivnost veća pri njihovim većim koncentracijama.



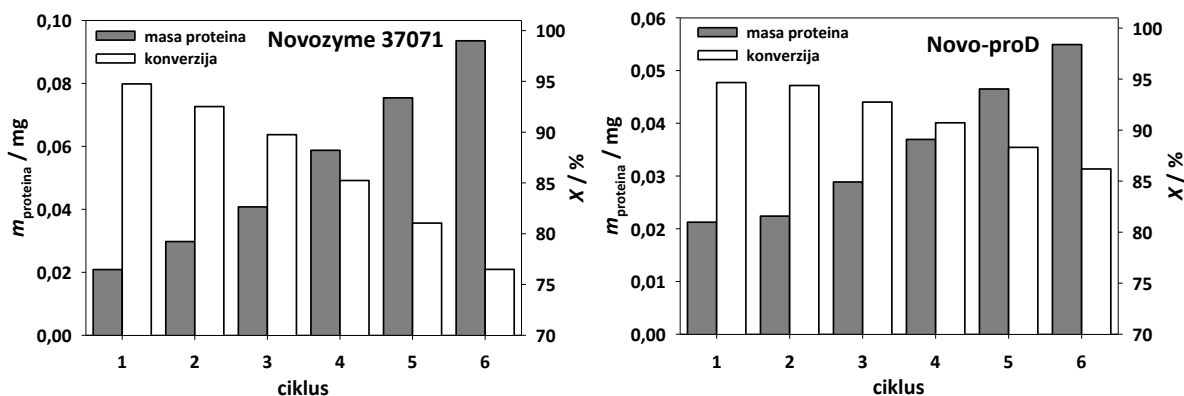
#### 4.5. Hidroliza proteina u ostacima kozica u ponovljivom reaktoru

Hidroliza proteina u ponovljivom reaktoru radi se s ciljem da se utvrdi koliko puta se isti enzim može upotrijebiti u procesu hidrolize proteina u ostacima kozica. Prethodni rezultati, gdje su se uspoređivale četiri proteaze pri dvije koncentracije, pokazali su da se s proteazama Novo-pro D i Novozyme postiže visoka konverzija (blizu 100%), te da imaju dobru stabilnost tijekom procesa hidrolize proteina u ostacima kozica. Stoga se provelo još jedno ispitivanje hidrolize proteina za te dvije proteaze, ali ovoga puta u ponovljivom reaktoru. Kako nema značajne promjene u masi proteina nakon 1. i 8. h, hidroliza proteina u ponovljivom reaktoru se radila u 6 ciklusa po 1 h. Aktivnost proteaza određivala se iz supernatanta zadnjeg uzorka dok se konverzija proteina određivala iz krutih ostataka kozica prema metodama opisanim u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2.

Rezultati konverzije i mase proteina, nakon hidrolize proteina iz ostataka kozica tijekom 6 ciklusa katalizirane proteazama Novo-pro D i Novozyme, prikazane su na *Slikama 4.15. i 4.16.*

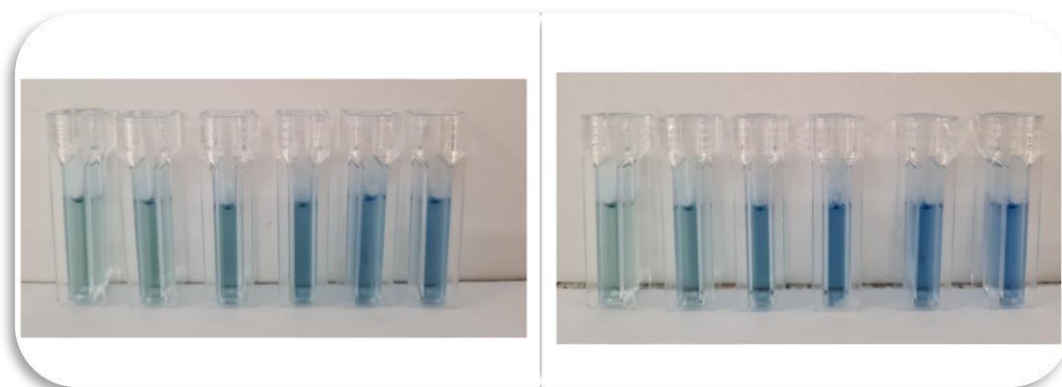


*Slika 4.15.* Preostala masa proteina i konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama Novozyme i Novo-ProD u kotlastom reaktoru s 6 ciklusa dodavanja supstrata ( $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 200 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $t_{\text{ciklusa}} = 1 \text{ h}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10 \text{ mg}$ ,  $A_{\text{proteaze}} = 0.5 \text{ U}$ )



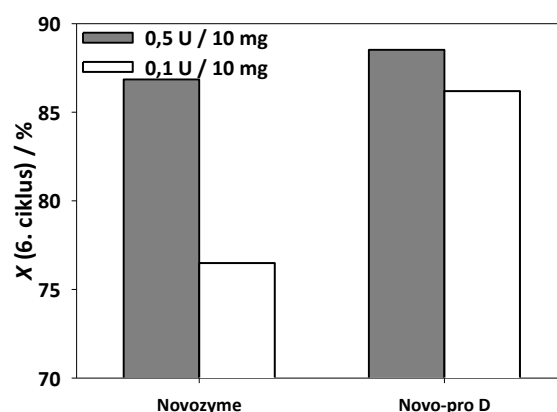
Slika 4.16. Preostala masa proteina i konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama Novozyme i Novo-Pro D u kotlastom reaktoru s 6 ciklusa dodavanja supstrata ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$ ,  $t_{\text{ciklusa}} = 1\text{ h}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$ ,  $A_{\text{protease}} = 0.1\text{ U}$ )

Na prikazanim grafičkim prikazima (Slike 4.15 i 4.16) možemo vidjeti kako masa proteina kroz cikluse raste dok se konverzija smanjuje. Kod hidrolize proteina u ostacima kozica kataliziranih proteazama Novo-pro D i Novozyme, koncentracije  $0.5\text{ U} / 10\text{ mg}$  vidljivo je da konverzija gotovo identična u prva tri ciklusa ( $\sim 95\%$ ). Nakon trećeg ciklusa dolazi do vidljivog smanjenja konverzije iako je i dalje dosta visoka ( $> 85\%$ ). Na temelju tih rezultata možemo zaključiti kako se proteaze Novo-pro D i Novozyme pri koncentraciji  $0.5\text{ U} / 10\text{ mg}$  mogu koristiti pet puta zaredom odnosno kroz pet ciklusa hidrolize proteina jer je konverzija nakon petog ciklusa i dalje iznad  $90\%$ . Pri hidrolizi proteina u ostacima kozica kataliziranih proteazama Novo-pro D i Novozyme, koncentracije  $0.1\text{ U} / 10\text{ mg}$  vidljiv je veći pad konverzije kroz cikluse, pogotovo kod proteaze Novozyme gdje je nakon šestog ciklusa konverzija oko  $75\%$ . Prema prikazanim rezultatima navedene proteaze s manjom koncentracijom mogu se koristiti manji broj puta. Novo-pro D četiri ciklusa, a Novozyme tri ciklusa nakon čega im konverzija pada ispod  $90\%$ . Također važno je napomenuti da je prilikom izvođenja eksperimenata, odnosno prelaska iz jednog ciklusa u drugi došlo do gubitka volumena ( $10\text{--}20\%$ ) zbog čega vjerojatno dolazi do smanjenja konverzije kroz cikluse, iako je izuzev toga konverzija i dalje dosta visoka. Porast mase, a ujedno i koncentracije proteina u reaktoru vidljiv je i u plastičnim kivetama prilikom određivanja koncentracije proteina Bradfordovom metodom. Na Slici 4.17. uočava se prelazak iz svijetlo zelene boje u plavu boju što označava porast mase proteina. Što je veća koncentracija proteina to je boja tamnija.



*Slika 4.17.* Prikaz plastičnih kiveta sa smjesom uzorka proteina i Bradfordovog reagensa za određivanje koncentracije proteina kroz 6 ciklusa hidrolize u ponovljivom reaktoru

Na *Slici 4.18.* prikazana je usporedba konverzija nakon šestog ciklusa hidrolize proteina u ostacima kozica u ponovljivom reaktoru pri različitim koncentracijama proteaza.

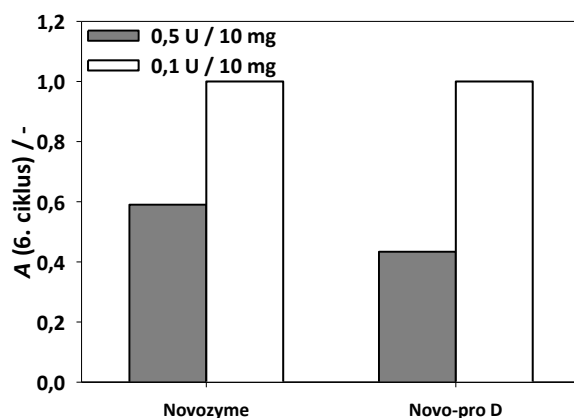


*Slika 4.18.* Usporedba konverzija nakon 6. ciklusa hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama Novozyme i Novo-ProD u kotlastom reaktoru ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$ ,  $t_{\text{ciklusa}} = 1\text{ h}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$ ,  $A_{\text{proteaze}} = 0.5\text{ U}; 0.1\text{ U}$ )

Usporedbom konverzija na gornjem grafu vidljivo je kako kod proteaze Novo-pro D postoji neznatno manja konverzija u sustavu gdje je manja koncentracija enzima dok je kod proteaze Novozyme vidljivo odstupanje u konverziji pri većoj i manjoj koncentraciji, odnosno da je bolja konverzija s većom koncentracijom proteaze. S obzirom na to da je nakon 6. ciklusa hidrolize većina konverzija preko 85% može se zaključiti kako su ispitane proteaze veoma

uspješne u hidrolizi proteina i nakon više ciklusa ponavljanja. Stoga su dobar izbor za hidrolizu proteina jer ih se ne treba upotrijebiti u velikoj količini i iste se mogu upotrijebiti veći broj puta.

Na *Slici 4.19.* vidljive su aktivnosti ispitivanih proteza nakon 6. ciklusa hidrolize proteina u ostacima kozica. Preostala aktivnost proteaza nakon 6. ciklusa hidrolize proteina u ostacima kozica potvrđuje kako su proteaze Novo-pro D i Novozyme stabilnije pri manjoj koncentraciji. Pri manjoj koncentraciji stabilnost obje proteaze je jednaka, dok je pri većoj koncentraciji proteaza Novozyme nešto stabilnija od proteaze Novo-pro D.



*Slika 4.19.* Usporedba preostale aktivnosti enzima nakon 6. ciklusa hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama Novozyme i Novo-ProD u kotlastom reaktoru ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8,  $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$ ,  $t_{\text{ciklusa}} = 1\text{ h}$ ,  $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$ ,  $A_{\text{proteaze}} = 0,5\text{ U}; 0,1\text{ U}$ )

## 5. ZAKLJUČAK

Poznato je da je otpad rakova zakonom zabranjeno odlagati kao biootpad na odlagališta zbog proteina koji sadrži stoga je provedena optimizacija biološke metode njihova zbrinjavanja. U svrhu hidrolize proteina iz ljusaka kozica ispitana je stabilnost i aktivnost četiri komercijalne proteaze Flavourzyme, Novozyme, Neutraze i Novo-Pro D. Također je provedena hidroliza proteina iz ljusaka kozica, pri dvije koncentracije navedenih proteaza od 0.5 U / 10 mg i 0.1 U / 10 mg, kako bi se utvrdila njihova učinkovitost, mogućnost ponovne upotrebe i konverzije proteina. Na temelju svih provedenih eksperimenata doneseni su sljedeći zaključci :

- ✓ Ispitivanjem utjecaja promjene pH vrijednosti u rasponu od 6 do 9 na aktivnost proteaza pri temperaturi od 40 °C utvrđena je kompromisna optimalna pH vrijednost od pH 8. Također ispitivanje utjecaja promjene temperature na aktivnost proteaza pri pH 7.5 u rasponu od 40 do 60 °C utvrđena je kompromisna optimalna temperatura od 40 °C.
- ✓ Pri optimalnim uvjetima (pH 8 i  $T = 40$  °C) određena je operacijska stabilnost proteaza te je utvrđeno da aktivnost proteaza raste prema sljedećem nizu:  
Flavourzyme < Neutraza < Novozyme < Novo-pro D.
- ✓ Kinetiku inaktivacije proteaza najbolje opisuje troparametarski model.
- ✓ Sve 4 proteaze pri obje koncentracije pokazuju isti trend brzine hidrolize proteina gdje do najvećeg smanjenja mase proteina dolazi u prvih sat vremena, izuzetak je Neutraza pri koncentraciji 0.1 U / 10 mg kod koje se masa proteina smanjuje kroz vrijeme reakcije. Sve četiri komercijalne proteaze razgradile su proteine iz otpadaka kozica zadovoljavajućom konverzijom. Najslabiju konverziju pokazala je Neutraza, ispod 80 % za obje ispitane koncentracije. Najbolju konverziju pokazale su proteaze Novo-pro D i Novozyme koja je blizu 100 % za obje koncentracije, dok Flavourzyme za obje koncentracije pokazuje konverziju između 80-90 %.
- ✓ Operacijska stabilnost proteaza tijekom hidrolize proteina iz ostataka kozica pokazala je da su proteaze Novo-pro D i Novozyme stabilnije od proteaza Flavourzyme i Neutraze pri većoj koncentraciji od 0.5 U / 10 mg i pri manjoj koncentraciji od 0.1 U / 10 mg.
- ✓ Proteaze Novo-pro D i Novozyme su se pokazale kao najstabilnije i najučinkovitije proteaze, te su ispitane u ponavljajućem reaktoru s ciljem utvrđivanja koliko se puta ista proteaza može upotrijebiti za hidrolizu proteina u ostacima kozica, pri koncentracijama 0.5 i 0.1 U / 10 mg. Obje proteaze, pri većoj i manjoj koncentraciji pokazale su se uspješnim u hidrolizi proteina i nakon 6.ciklusa korištenja gdje je konverzija za većinu

bila iznad 85% (izuzetak je Novozyme pri 0.1 U / 10 mg gdje je konverzija iznosila ~ 76%). Pri koncentraciji od 0.5 U / 10 mg obje proteaze se mogu upotrijebiti i do 5 ciklusa (konverzija > 90%). Pri koncentraciji 0.1 U / 10 mg se Novo-pro D može upotrijebiti 4 ciklusa, a Novozyme 3. Novozyme se pokazala kao stabilnija proteaza s većom aktivnošću nakon 6.ciklusa, dok se Novo-pro D pokazao kao učinkovitija proteaza s većom konverzijom proteina nakon 6.ciklusa ponavljanja.

Sve četiri komercijalnih proteaza, pri koncentracijama 0.5 i 0.1 U / 10 mg, pokazale su se uspješnima u hidrolizi proteina što sugerira mogućnost njihovog korištenja u biološkoj metodi hidrolize proteina iz ostataka kozica. Od ispitanih komercijalnih proteaza, za hidrolizu proteina, najstabilnijom i najučinkovitijom se pokazala Novo-pro D.

## 6. LITERATURA

1. Muley, A. B., Chaudhari, A. S., Mulchandani, K. H., Singhal, R. S., Extraction and characterization of chitosan from prawn shell waste and its conjugation with cutinase for enhanced thermo-stability, *International Journal of Biological Macromolecules*, 111 (2018) 1047-1058.
2. <https://www.cistoca.hr/usluge/odvojeno-skupljanje-otpada/biootpad/1350> pristup 8. kolovoza 2021. godine.
3. Sjaifullah, A., Santoso, A. B., Autolytic Isolation of Chitin from White Shrimp (*Penauesvannamei*) Waste, *Procedia Chemistry* 18 (2016) 49–52.
4. Kurita, K., Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans, *Marine Biotechnology* 8 (2006) 203-226.
5. Fischer, J. D., Characterisation, Classification and Conformational variability of Organic Enzyme Cofactors, European Bioinformatics Institute Clare Hall College, University of Cambridge (2011).
6. Findrik Blažević, Z., Bioreaktori, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017).
7. Bayoudh, A., Gharsallah, N., Chamkha, M., Dhouib, A., Ammar, S., Nasri, M., Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24 (2000) 291–295.
8. Alabaraoye, E., Achilonu, M., Hester, R., Biopolymer (Chitin) from Various Marine Seashell Wastes: Isolation and Characterization, *J Polym Environ.* 26(6) (2017) 2207-2218.
9. Mokhtari-Hosseini, Z.B., Hatamian-Zarmi, A., Mohammadnejad, J., Ebrahimi-Hosseinzadeh, B., Chitin and chitosan biopolymer production from the Iranian medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Optimization and characterization, *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 48(7) (2018) 662-670.
10. Duraković, S., *Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering*, Zagreb, (1996).
11. Karlson, P., *Biokemija, Školska knjiga*, Zagreb (1984).
12. Godfrey, T., West, S., *Industrial Enzymology*, Stockton Press, New York (1996).
13. Loughlin, W. A., Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Tehnol* 74 (2000) 49.

14. Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., *Microbiology*, McGraw-Hill, New York, (2000) 161, 554, 1006.
15. Mantsala, P., Niemi, J., *Enzymes: The biological catalysts of life, Physiology and Maintenance*, 2 (2002) 1-9.
16. Copeland, R. A., *Enzymes: Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Dana Analysis*, 2nd Ed, Wiley-VCH (2000).
17. Zrnčević, S., *Kataliza i katalizatori*, Hinus, Zagreb (2005) 8-12.
18. Illanes, A., *Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications Homogeneous enzyme kinetics*, Springer, Valparaiso (2008) 1-39, 107-120.
19. Eslahi, H., Ghaffari-Moghaddam, M., Khajeh, M., Omay, D., Zakipour-Rahimabadi, E., Motalleb, G., *General biography, structure and classification of enzymes*, *Research and Reviews in Materials Science and Chemistry*, 3 (2014) 1-83.
20. Worthington Biochemical Corporation, *Manual of clinical enzyme measurements*, New Jersey, Worthington Diagnostics, (1972) 1-56.
21. Findrik Blažević, Z., *Bioreakcijska tehnika I*, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2013).
22. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf, M., *Microbial Proteases Applications*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7 (2019).
23. Hooper, N. M., *Proteases: a primer*, *Essays in Biochemistry* 38 (2002) 1-8.
24. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (1998) 597–635.
25. Banerjee, G., Ray, A. K., *Impact of microbial proteases on biotechnological industries*, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33 (2017) 119-143.
26. <https://biosolutions.novozymes.com/en/animal-protein/products/neutrase> pristup 25. srpnja 2021. godine
27. [https://www.strem.com/catalog/v/06-3123/101/biocatalysts\\_9001-62-1](https://www.strem.com/catalog/v/06-3123/101/biocatalysts_9001-62-1) pristup 13. kolovoza 2021. godine
28. Li, Q., Yi, L., Marek, P., Iverson, B.L., *Commercial proteases: Present and future*, *FEBS Lett.* 587 (2012) 1155-1163.
29. Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A., *Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods*, *Food Technol. Biotechnol.* 51(2013) 12–25.



30. [https://www.strem.com/uploads/technical\\_notes/06-3115tech.pdf](https://www.strem.com/uploads/technical_notes/06-3115tech.pdf) pristup 25. srpnja 2021. godine
31. Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., Jensen, I. J., Protein Determination-Method Matters, *Foods*, **7**(1) (2018) 5.
32. Gan, C. Y., Abdul Manaf, N. H., Latiff, A. A., Optimization of alcohol insoluble polysaccharides (AIPS) extraction from the *Parkia speciosa* pod using response surface methodology (RSM), *Carbohydrate Polymers*, **79** (2010) 825–831.
33. <https://hr.eferrit.com/linearna-regresijska-analiza/-regresijska-analiza/> pristup 27. srpnja 2021. godine
34. [http://www.turkupetcentre.net/petanalysis/model\\_aic.html](http://www.turkupetcentre.net/petanalysis/model_aic.html) pristup 27. srpnja 2021. godine

## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

### Simboli

$A$  - aktivnost enzima

$A_0$  - početna aktivnost enzima

$A_t$  - aktivnost enzima nakon  $t$  vremena

$A_v$  - volumna aktivnost [ $U mL^{-1}$ ]

$\alpha$  - parametar koji označava udio jednog ili drugog oblika enzima

$b$  - duljina puta svjetlosti [cm]

$c$  - molarna koncentracija [ $mol/dm^3 = M$ ]

$d$  - promjer [cm]

$E_a$  - energija aktivacije [J/mol]

$\varepsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent [ $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ ]

$\varepsilon_{660}$  - eksitincijski koeficijent tirozina [ $cm^2 \mu mol^{-1}$ ]

$k_d$  - konstanta deaktivacije enzima modela 1. i 2. Reda [ $min^{-1}$ ]

$k_{d1}$  - inaktivacijska konstanta troparametarskog modela [min-1]

$k_{d2}$  - inaktivacijska konstanta troparametarskog modela [min-1]

$\lambda$  - valna duljina [nm]

$m_{\text{proteina}}$  - masa proteina [mg]

$m_{\text{kozica}}$  - masa kozica [mg]

$pH$  - negativna koncentracija vodikovih iona

$R^2$  - standardna devijacija

$T$  - temperatura [ $^{\circ}C$ ]

$t_{1/2}$  - vrijeme poluraspada enzima [s]

$t$  - vrijeme [min]

$U$  - jedinica enzimске aktivnosti [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]

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

$Y$  - odabrani odziv procesa

### **Kratice**

ABS – apsorbancija

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

E - enzim

ES - kompleks enzim-supstrat

HCl - klorovodična kiselina

MSC - kriterij selekcije modela, engl. *Model selection criteria*

NaOH - natrijev hidroksid

NaCl - natrijev klorid

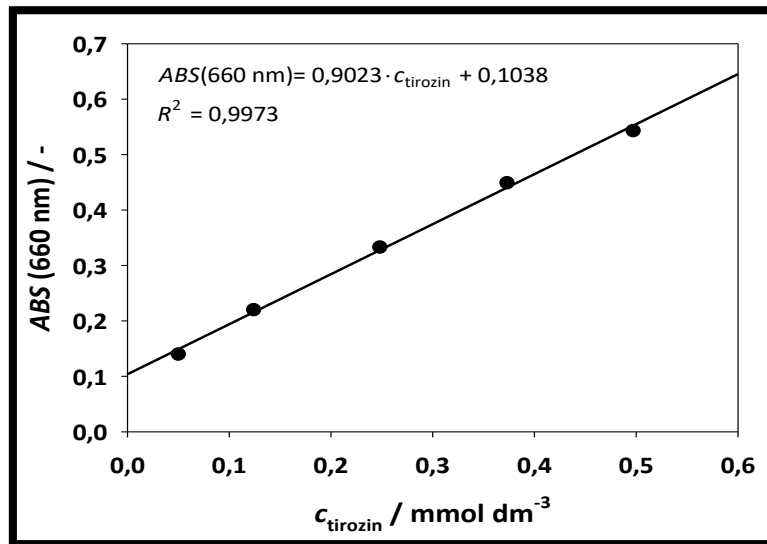
P - produkt

S - supstrat

TCA - trikloroetena kiselina

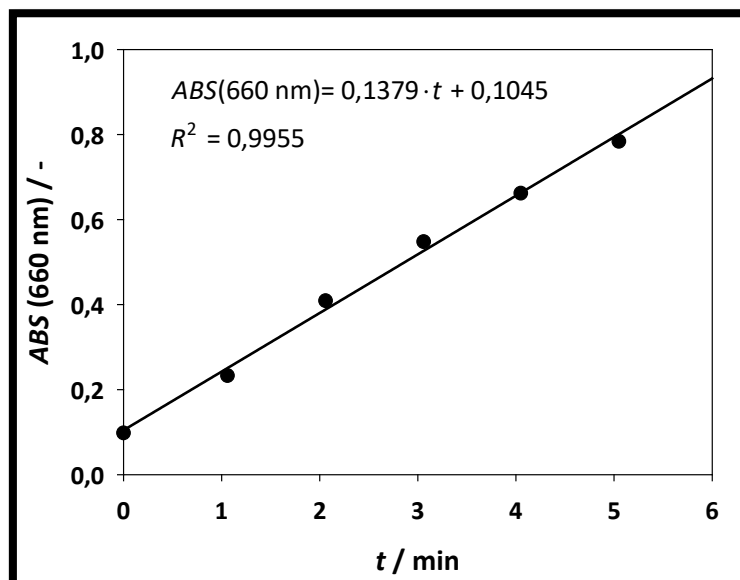
## 8. PRILOZI

### Prilog 1

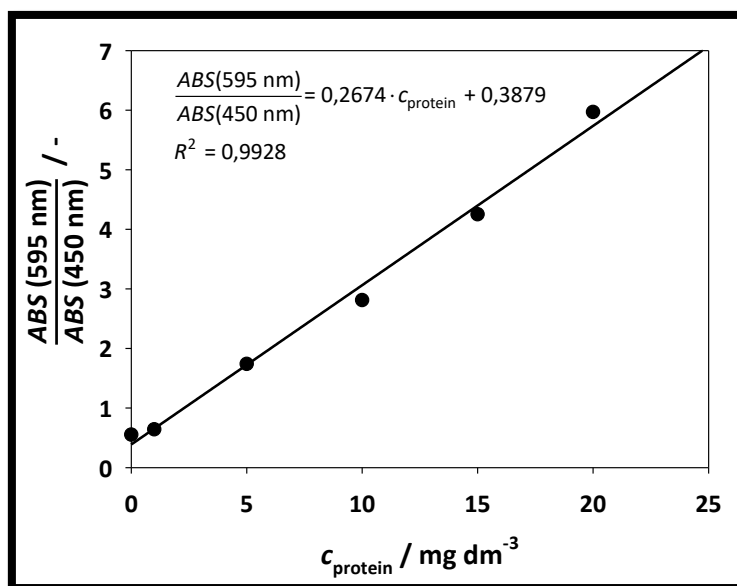


Slika 8.1. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije tirozina

### Prilog 2



Slika 8.2. Primjer rezultata mjerenja aktivnosti proteaze



Slika 8.3. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije proteina

## 9. ŽIVOTOPIS

Sara Čačko [REDACTED] Osnovnu školu Ljudevita Gaja završava 2010. godine te iste godine upisuje X. Gimnaziju „Ivan Supek“. Maturirala je 2014. godine te upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, smjer Ekoinženjerstvo. Stručnu praksu odradila je 2019. godine u Zagrebačkoj pivovari u mikrobiološkom i fizikalno kemijskom laboratoriju, odnosno Kontrolu kvalitete. Preddiplomski studij završava 2019. godine sa završnim radom „Ispitivanje uvjeta sinteze nanočestica srebra uz glukozu“ te nastavlja obrazovanje na diplomskom studiju Ekoinženjerstva. U sklopu završnog rada, dobivene rezultate prezentirala je na XIII susretu mladih kemijskih inženjera 2020. godine u Zagrebu.