

Enzimatska hidroliza proteina u otpadu ljuski rakova

Bingula, Petra

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:149:248258>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Petra Bingula

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Petra Bingula

Enzimatska hidroliza proteina u otpadu ljuski rakova

Enzymatic hydrolysis of protein in shrimp waste

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
2. prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić
3. doc. dr. sc. Marin Kovačić

Zagreb, rujan 2021.

Najljepša hvala prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na mentorstvu. Zahvaljujem se na trudu, uloženom vremenu, prenesenom znanju, pomoći, te razumijevanju i strpljivosti prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.

Hvala asistentima i kolegama iz laboratorija na pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi. Zahvaljujem svojim prijateljima na pruženoj nesebičnoj podršci i razumijevanju tijekom godina studiranja. Posebno hvala Sari na lijepom prijateljstvu stečenom tijekom studentskih dana, hvala na svim koracima koje smo zajedno prošle.

I na kraju, najljepša hvala mojoj obitelji koja mi je bila najveća podrška i snaga čak i onda kada se činilo nemoguće. Hvala im na strpljivosti, razumijevanju, pruženoj podršci i ljubavi.

Sažetak

Enzimi su proteini čija je osnovna zadaća ubrzavanje biokemijskih reakcija od kojih je svaka katalizirana jedinstvenim enzimom. Proteaze su jedna od najvažnijih skupina enzima, a njihova primjena svakodnevno raste u industriji. Razlog tome je ekonomska isplativost u vidu niskih troškova proizvodnje i male potrošnje energije, visokih prinosa i jednostavnosti genetičkih modifikacija. U ovom radu je ispitana učinkovitost enzima u hidrolizi proteina iz otpada kozica primjenom šest komercijalnih proteaza: Alkalaza, Neutraza, Esperaza, Flavourzyme, Novozyme i Novo-ProD. Svi navedeni enzimi su pokazali uspješnost u razgradnji proteina. Utvrđeno je kako su provedbom hidrolize i pri manjim koncentracijama enzima konverzije gotovo jednako visoke u većini slučajeva, osim kod Neutraze gdje je konverzija nešto niža. Kod većine enzima su visoke konverzije postignute već u prvom satu, što kod Neutraze nije slučaj budući da je konverzija postupno rasla. Po završetku hidrolize proteina Alkalaza, Flavourzyme i Novo-ProD pokazali su najveće stabilnosti pri koncentraciji enzima od 0,5 U / 10 mg, stoga su odabrani za provedbu hidrolize proteina u ponovljivom reaktoru sa 6 ciklusa. Pritom su Alkalaza i Novo-ProD pokazali zadovoljavajuće rezultate u smislu visokih konverzija te aktivnosti nakon zadnjeg ciklusa.

Ključne riječi: enzimi, proteaze, otpad kozica, hidroliza proteina, hitin, konverzija

Abstract

Enzymes are proteins whose primary task is to catalyse biochemical reactions, where each is catalyzed by a unique enzyme. Proteases are one of the most important groups of enzymes, and their application in industry is growing daily. The reason for this is economic profitability due to low production costs and low energy consumption, high yields and simplicity of genetic modifications. In this paper, the efficiency of enzymes in the hydrolysis of proteins from shrimp waste was examined using six commercial proteases: Alcalase, Neutrase, Esperase, Flavourzyme, Novozyme and Novo-ProD. All enzymes were successful in protein degradation. It was found that by performing hydrolysis even at lower enzyme concentrations, the conversions are almost equally high in most cases, except by Neutrase where the conversion is a bit lower. For most enzymes, high conversions were achieved in the first hour of experiment, which was not the case with Neutrase as the conversion gradually increased. Upon completion of protein hydrolysis, Alcalase, Flavourzyme, and Novo-ProD showed the highest stability at an enzyme concentration of 0.5 U / 10 mg, and were therefore selected to catalyse protein hydrolysis in a repetitive reactor with six cycles. Alcalase and Novo-ProD showed satisfactory results in terms of high conversions and activity after the last cycle.

Key words: enzymes, proteases, shrimp waste, protein hydrolysis, chitin, conversion

Sadržaj

1. UVOD	2
2. OPĆI DIO	3
2.1. ENZIMI	3
2.1.1. Povijest	3
2.1.2. Struktura i funkcija enzima	4
2.1.3. Enzimi kao katalizatori	5
2.1.4. Regulacija katalitičke aktivnosti i stabilnost enzima	7
2.1.5. Operacijska stabilnost enzima	8
2.1.6. Industrijska primjena enzima.....	9
2.2. PROTEAZE	10
2.2.1. Inženjerstvo proteaza i primjena u industriji	11
2.2.2. Komercijalne proteaze.....	14
2.3. HITIN	15
2.3.1. Struktura i svojstva hitina.....	15
2.3.2. Primjena hitina i hitozana	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.2. ANALITIČKE METODE	23
3.2.1. Određivanje volumne aktivnosti proteaza	23
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina	24
3.3. Optimalna pH vrijednost i temperatura	25
3.4. Operacijska stabilnost	25
3.5. Priprema uzoraka kozica	26
3.6. Hidroliza i ekstrakcija proteina u ljušturama kozica	26
3.7. Ekstrakcija proteina	27
3.8. Ponovljivi eksperimenti	28
3.9. Obrada rezultata	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Određivanje optimalnih radnih uvjeta	30
4.2. Operacijska stabilnost proteaza (pH 8, $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$)	32
4.3. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru.....	35

4.3.1. Koncentracija enzima 5 U / 10 mg.....	35
4.3.2. Koncentracija enzima 0,5 U / 10 mg.....	40
4.4. Hidroliza proteina u ostacima kozica u ponovljivom reaktoru	46
5. ZAKLJUČAK	49
6. LITERATURA.....	51
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	53
8. PRILOZI.....	55
9. ŽIVOTOPIS	57

1. UVOD

Iako su ljuštore morskih organizama prirodna pojava, nakupljene velike količine predstavljaju problem. S obzirom na znatnu količinu proteina koju sadrže, ne mogu se odlagati kao biootpad na odlagalištima, stoga je potrebno pronaći rješenje za tretiranje i zbrinjavanje ovakve vrste otpada. Jedna od mogućnosti jest primjena biološke metode koja uključuje korištenje enzima. Enzimi su polipeptidne molekule koje kataliziraju sve biokemijske reakcije.¹ U mnogim su se primjerima pokazali kao izvrsni katalizatori biološkog podrijetla, ne opterećuju okoliš jer su biorazgradivi, ekonomski su isplativi, a u mnogim slučajevima i učinkovitiji u odnosu na klasične kemijske metode. Jedna od najvažnijih skupina enzima jesu proteaze čija je primarna funkcija razgradnja proteina, a općenito je njihova primjena u stalnom porastu.

U ovom je radu ispitana potencijalna primjena proteaza u svrhu hidrolize i ekstrakcije proteina iz ljuštara rakova, što za sobom nosi čak nekoliko pozitivnih učinaka na okoliš, ali i ekonomiju. Biološkom, kao i kemijskom metodom obrade se dobiva hitin. Biološkom metodom se dobiva produkt visoke kvalitete koji se može koristiti i kao proteinsko-mineralni dodatak ljudskoj prehrani ili kao stočna hrana, za razliku od hitina dobivenog kemijskom metodom koji može sadržavati ostatke kemikalija korištenih u hidrolizi.² Osim toga, hitin ima mogućnost primjene i u biomedicini, u pročišćavanju otpadnih voda, u poljoprivredi, te prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.²

2. OPĆI DIO

2.1.ENZIMI

Enzimi su proteini čija je uloga ubrzavanje biokemijskih reakcija. Svaka od biokemijskih reakcija koje se neprestano odvijaju u svakoj živoj stanici katalizirana je jedinstvenim enzimom. Bez djelovanja enzima brzina reakcije bi bila prespora za održavanje života. Proučavanje enzima podjednako spada i u područje kemije i u područje biologije. Enzimi su izrazito selektivni i učinkoviti katalizatori, a za njihovu katalitičku učinkovitost zaslužna je trodimenzionalna proteinska struktura.¹

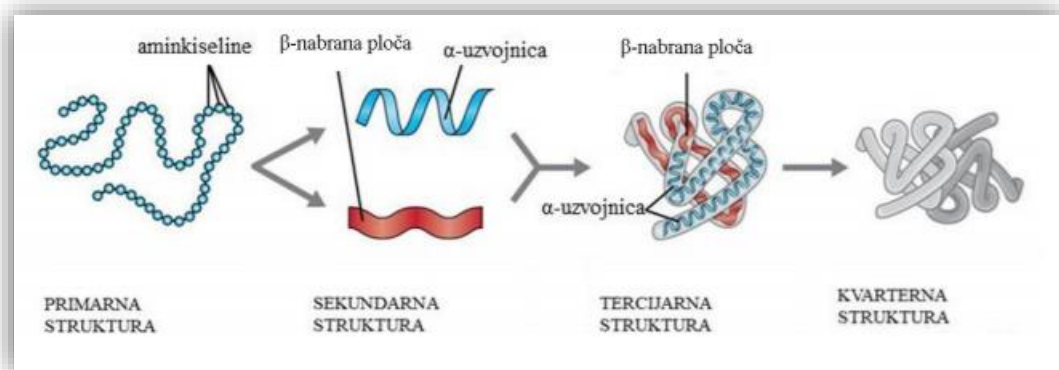
2.1.1. Povijest

Čovječanstvo se tisućama godina koristilo biološkom katalizom, još iz vremena kada se u starom Egiptu fermentacija koristila za proizvodnju piva i kruha. Tek u 19. stoljeću su se znanstvenici počeli baviti pitanjem o tome da li je za procese poput fermentacije odgovorna živa vrsta ili kemijska tvar. Godine 1897. Eduard Buchner je objavio zapažanje da su za fermentaciju šećera u alkohol i ugljikov dioksid odgovorni ekstrakti kvasca koji ne sadrže žive stanice. Predložio je kako je za fermentaciju odgovorna vrsta koji je nazvao zimaza i da se ona nalazi u stanicama kvasca. Biokemijski put uključen u fermentaciju, što je ujedno i prvi put koji je otkriven, razjasnili su Embden i Meyerhof. Konačno, godine 1926. je kristalizacija enzima ureaze iz graha pokazala da je biološku katalizu proveo kemijski spoj.

Spoznaja o tome da su za biološku katalizu zaslužni enzimi prethodila je pojašnjenju brojnih metaboličkih puteva, njihovom razvoju i detaljnom proučavanju. Razvoj molekularne biologije i brzih metoda sekvencioniranja DNA tijekom 1980-ih otvorio je mogućnost lakšeg kloniranja gena koji kodiraju određene enzime, što je omogućilo proizvodnju i izolaciju velikih količina brojnih enzima. Također, razvoj u određivanju kristalografske strukture proteina doveo je do utvrđivanja rendgenskih kristalnih struktura enzima.¹

2.1.2. Struktura i funkcija enzima

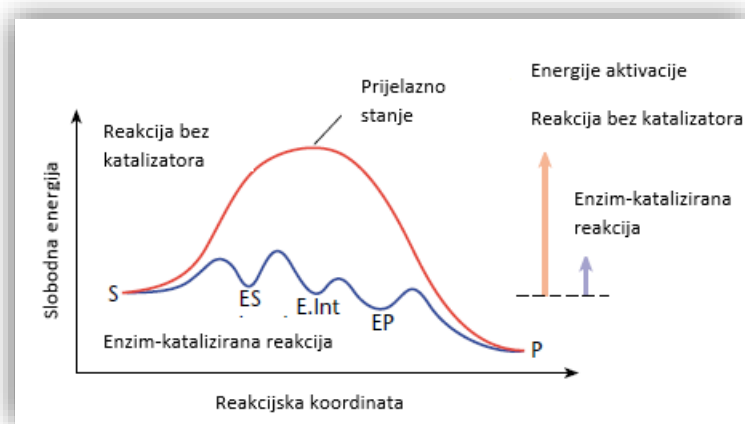
Proteini su polipeptidi sastavljeni od linearnog slijeda L-aminokiselina povezanih amidnim vezama. Postoji 20 prirodnih aminokiselina koje se koriste u biosintezi proteina od kojih sve imaju L-konfiguraciju, ali se razlikuju po prirodi bočnog lanca aminokiselina. Slijed aminokiselina određen je nukleotidnom sekvencom gena koji kodira taj enzim.¹ Ukoliko se promijeni slijed aminokiselina u lancu, promijenit će se i kompletna njegova struktura i funkcija.³ Molekulska masa enzima je između 10 000 i 100 000 Da, što odgovara nizu od približno 80-800 aminokiselina.¹ Nakon što je biosintezom nastao polipeptidni lanac, započinje proces formiranja trodimenzionalne strukture proteina, što je prikazano na *Slici 2.1*. Povezivanjem lanaca pomoću vodikovih veza u ravnini nastaje sekundarna struktura koja se naziva planarnom ili nabranom strukturom. Sekundarna struktura može biti i u obliku uzvojnice koja nastaje kada se proteinski lanac rasporedi oko osi zamišljenog valjka. Ovu strukturu stabiliziraju vodikove veze nastale između amidnih i karbonilnih skupina. Tercijarna struktura još se naziva i fibrilnom strukturom, a nastaje kada se peptidni lanci međusobno preklapaju i povezuju kovalentnim vezama. Konačan izgled molekule proteina određen je kvartarnom strukturom koja je određena disulfidnim mostovima i sekundarnim valencijskim silama.³



Slika 2.1. Proces formiranja trodimenzionalne strukture proteina

2.1.3. Enzimi kao katalizatori

Katalizator je vrsta koja povećava brzinu kemijske reakcije i koja po završetku kemijske reakcije ostaje nepromijenjena.¹ Enzimi su se pokazali iznimno učinkovitim u kataliziranju određene kemijske reakcije na način da smanjuju energiju aktivacije za tu reakciju (*Slika 2.2.*).



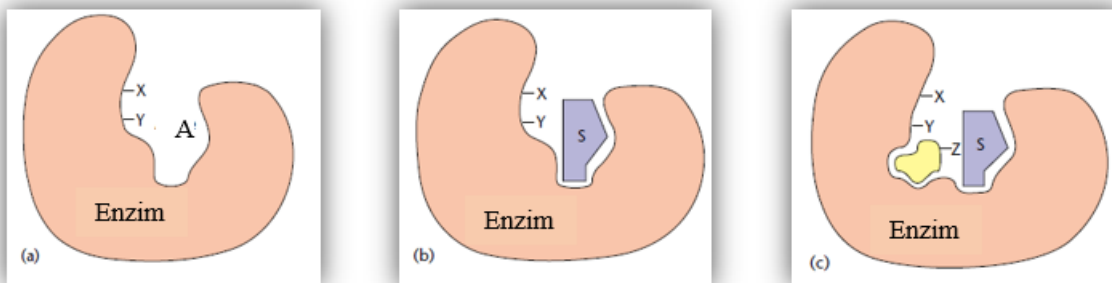
Slika 2.2. Dijagram energije aktivacije za reakciju kataliziranu enzimom

Unutar strukture enzima postoji mjesto u obliku rascjepa ili šupljine koje sadrži hidrofobna područja za eliminaciju molekula vode iz otapala tijekom odvijanja reakcije. To mjesto se naziva aktivnim mjestom, i ono je zaslužno za kataliziranje reakcija. Mehanizam odvijanja reakcije može se opisati sljedećom jednačbom:



a detaljan opis slijedi u nastavku.¹

U prvom koraku se supstrat veže na aktivno mjesto enzima (*Slika 2.3.a*) prilikom čega nastaje kompleks enzim-supstrat (ES) (*Slika 2.3.b*). Supstrat se veže na aktivno mjesto enzima djelovanjem nekovalentnih interakcija: elektrostatskih sila, vodikovih veza, hidrofobnih interakcija i van der Waalsovih međuatomnih sila. Navedene reakcije dovode do preciznog uklapanja između aktivnog mjesta enzima i njegovog određenog supstrata, što objašnjava visoku selektivnost enzimске katalize.¹



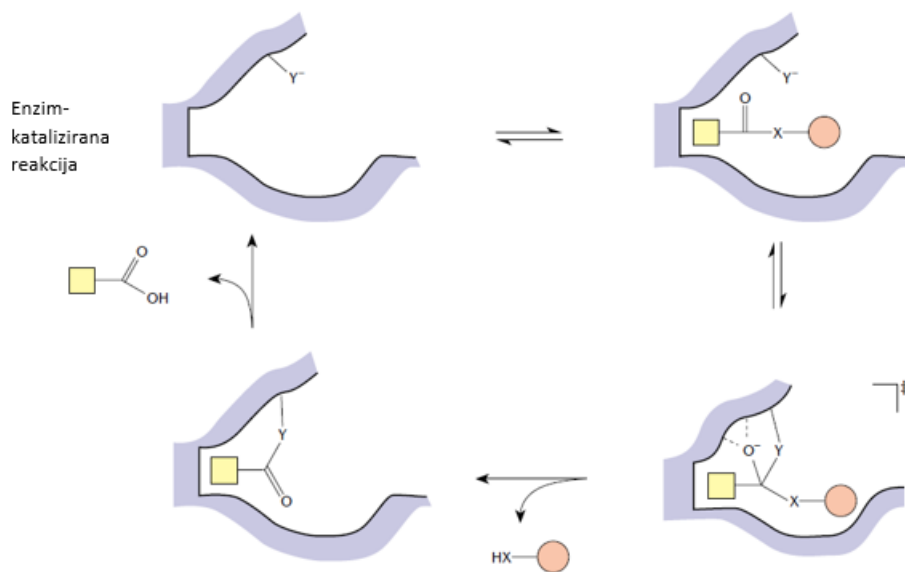
A – aktivno mjesto enzima

Slika 2.3. Shematski prikaz a) enzimskog aktivnog mjesta, b) kompleksa enzim-supstrat (ES), c) kompleksa enzim-supstrat (ES) s kofaktorom (Z)

Drugi korak podrazumijeva prijelaz supstrata vezanog za enzim u produkt koji je također vezan za enzim, a odvija se kroz jedno ili više prijelaznih stanja. Ova kataliza uključuje mali broj bočnih lanaca aminokiselina na aktivnom mjestu koji sudjeluju u reakciji (X, Y, (Slika 2.3.b)) kao kisele, bazične ili u nekim slučajevima kao nukleofilne skupine koje tvore kovalentnu vezu sa supstratom. U konačnici kompleks enzim-produkt (EP) disocira kako bi se oslobodio produkt P i regenerirao enzim koji onda može slobodno katalizirati sljedeću takvu reakciju. Neke reakcije katalizirane enzimima zahtijevaju prisutnost kofaktora (Slika 2.3.c). Drugim riječima, kofaktori povećavaju mogućnost primjene enzima. Postoje dvije vrste kofaktora: male organske molekule koje se nazivaju koenzimima (primjerice, molekula piridoksal fosfata poznatija kao vitamin B6), te metalni ioni (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{+}), koji se mogu koristiti za vezivanje supstrata, za katalizu Lewisove kiseline ili u nekim slučajevima za reakcije oksidacije ili redukcije.¹

Poznato je, dakle, da enzimi smanjuju energiju aktivacije i time ubrzavaju proces, no postavlja se pitanje na koji način oni to postižu. Odgovor stoji u činjenici da postoje specifične interakcije koje nastaju između aktivnog mjesta enzima i prijelaznog stanja reakcije, ali koje nastaju bez ES i EP kompleksa. Primjerice, specifična vodikova veza može nastati prijelaznim stanjem pri prekidu veze. Na taj način se prijelazno stanje visoke energije stabilizira, energija aktivacije smanjuje, a brzina reakcije povećava. Shematski prikaz nalazi se na Slici 2.4. koja prikazuje hidrolizu veze ester/amid kataliziranu enzimom. Napad grupe nukleofilnih aktivnih mjesta Y generira prijelazno stanje koje se stabilizira nastankom vodikovih veza s enzimom i

komplementarnošću oblika s enzimom. Potom nastaje akovalentni intermedijer acil-enzima koji se hidrolizira kako bi se regenerirao slobodni enzim.¹



Slika 2.4. Hidroliza veze ester-amid katalizirana enzimom

2.1.4. Regulacija katalitičke aktivnosti i stabilnost enzima

Brojni enzimi se proizvode kao neaktivni prekursori koji zahtijevaju određenu posttranslacijsku promjenu u strukturi kako bi postali aktivni. Primjeri takvih enzima su proteaze čija je zadaća razgradnja proteina. Dakle, u svojem aktivnom obliku, proteaza je donekle opasna za stanicu. Može se proizvesti kao neaktivan propeptid koji sadrži nastavak na amino terminalnom dijelu proteina. Taj se nastavak cijepa zasebnom proteazom kako bi se oslobodio aktivni oblik enzima. Jedna molekula cijepajuće proteaze može pocijepati veliki broj propeptida kako bi oslobodila drugu proteazu, a pojačavanje učinka ostvaruje se kaskadom koraka cijepanja proteina. Takva jedna kaskada zaslužna je za zgrušavanje krvi kod sisavaca.

U mnogim je slučajevima aktivni oblik enzima reguliran daljnjim modifikacijama. Neki enzimi mogu se fosforilirati (prilikom čega se dobije fosfoenzim) ili glikozilirati (prilikom čega nastaje glikoprotein), a produkti navedenih postupaka su više ili manje aktivni enzimi. Primjer enzima reguliranog fosforilacijom je glikogen fosforilaza koji je uključen u razgradnju glikogena.

Mnogi enzimi sadrže efektorska mjesta koja se razlikuju od aktivnog mjesta enzima za koje se onda efektorska molekula mora vezati kako bi se aktivirao enzim. Primjer jednog takvog enzima je fosfofruktokinaza koja katalizira rani korak u glikolitičkom putu, a reguliraju ju molekule ATP-a, AMP-a i citrat. Ovakva vrsta povratne regulacije je česti slučaj kod ranih koraka biosintetskog puta gdje se kao efektori koriste krajnji produkti. Na taj način se protok međuproizvoda kroz određeni put može regulirati nedostatkom ili viškom krajnjih proizvoda toga puta.¹

2.1.5. Operacijska stabilnost enzima

Stabilnost enzima se definira kao aktivnost enzima koja je preostala nakon što prođe određen vremenski period. Postoje dvije vrste stabilnosti, operacijska stabilnost i stabilnost u uvjetima skladištenja. Za enzimsku stabilnost je bitno očuvanje aktivne konformacije enzima. Moguće promjene aktivne enzimske konformacije jesu posljedice promjena u kovalentnim vezama, ionskim i dipolarnim silama, te različitim hidrofobnim i hidrofobnim interakcijama.³

Stabilnost enzima u uvjetima skladištenja vezana je uz fizikalno stanje enzima, ovisi, dakle, o tome da li se radi o liofilizatu, suspenziji ili otopini. Također, na ovu vrstu stabilnosti utječe i sredina u kojoj se enzim čuva, dodatak stranih tvari kao što je supstrat, efektor, inhibitor ili stabilizator, ali značajan utjecaj ima i temperatura.³

Operacijska stabilnost enzima se definira kao stabilnost enzima kroz period kontinuirane upotrebe, a izražava se kao vrijeme koje je potrebno da se aktivnost enzima smanji na polovinu svoje početne vrijednosti, odnosno, kao vrijeme poluraspada. Operacijska stabilnost ima veliki značaj za provedbu procesa, a uz to je i važan parametar koji ima utjecaj na volumnu produktivnost. Uz izražavanje vremena poluraspada, za iskazivanje stabilnosti enzima procjenjuje se i vrijednost konstante inaktivacije, k_d . Uz pretpostavku da se kinetika reakcije inaktivacije može opisati modelom prvog reda, konstanta inaktivacije povezana je s vremenom poluraspada i može se izračunati preko sljedećeg izraza³:

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

Operacijska stabilnost enzima ovisi o nekoliko faktora koji se nalaze na shematskom prikazu na *Slici 2.5*.



Slika 2.5. Faktori o kojima ovisi operacijska stabilnost enzima

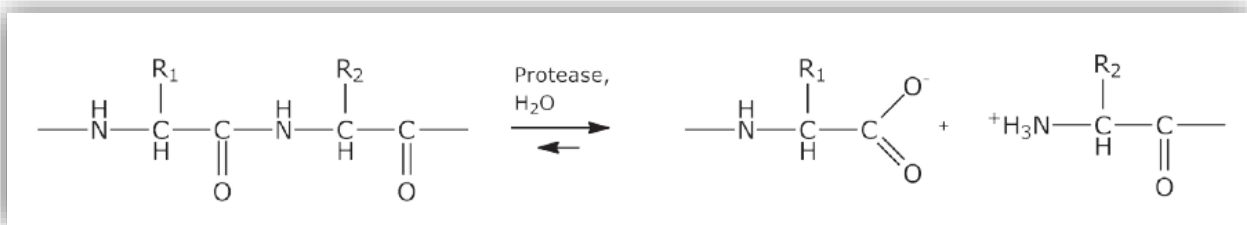
2.1.6. Industrijska primjena enzima

Korištenje enzimatske katalize u komercijalne svrhe je područje biotehnoške industrije koje je u novije vrijeme od velikog interesa i u stalnom porastu. Upotreba enzima je tako pronašla primjenu u asimetričnoj organskoj sintezi. Imajući na umu da su enzimi visoko učinkoviti katalizatori koji djeluju u blagim uvjetima i enantiospecifični su, mogu se koristiti u mnogim slučajevima za razdvajanje i prevođenje racemičnih smjesa u njihove optički aktivne komponente. Ova je primjena od velike važnosti u proizvodnji lijekova, budući da jedan enantiomer lijeka obično ima posve drugačija biološka svojstva od drugog. Enzimi se također koriste kao biosenzori za medicinsko i okolišno praćenje važnih metabolita. Stoga, ukoliko se put određenog supstrata može povezati s proizvodnjom električnog signala, tada se, u principu, enzim može imobilizirati na čvrstu podlogu i koristiti za detektiranje prisutnosti supstrata. Primjerice, enzim glukoza oksidaza se na ovaj način koristi za izradu biosenzora za razinu glukoze u krvi koji koriste osobe oboljele od dijabetesa. Enzimi koji su uključeni u biosintezu važnih prirodnih proizvoda također

su od potencijalnog interesa za biotehnologiju. Mnogi od prirodnih proizvoda strukturno su poprilično složeni i gotovo ih je nemoguće sintetizirati u laboratoriju po pristupačnoj cijeni. Jedan primjer je industrijska proizvodnja polusintetičkih penicilina korištenjem prirodnog enzima penicilin acilaze. Penicilin G, koji se dobiva uzgojem *Penicillium* plijesni, ima određene kliničke nedostatke, stoga se enzimskom deacilacijom i ponovnom kemijskom acilacijom dobiva čitav niz polusintetičkih penicilina poboljšanih svojstava koji su prema tome i klinički korisniji.¹

2.2.PROTEAZE

Proteaze ili proteolitički enzimi jesu enzimi čija je osnovna zadaća cijepanje peptidne veze te se na taj način velike molekule proteina prevode u manje molekule ili u aminokiseline. Proteolitički učinak očituje se u polarizaciji amidne CO veze te aktivaciji nukleofilne grupe kako bi ona mogla napasti karbonilni ugljik, što u konačnici rezultira hidrolizom. Na *Slici 2.6.* je prikazan mehanizam cijepanja peptidne veze. Proteaze djeluju u kontekstu složenih mreža koje se sastoje od aktivatora i inhibitora, peptida, receptora, supstrata i drugih malih molekula što u konačnici utječe na njihovu prostornu i vremensku aktivnost. Raznolikost u njihovim ulogama proizlazi iz modifikacija u strukturama koje zapravo imaju slične geometrije aktivnih mjesta, ali na različite načine prepoznaju supstrate. Zbog velike strukturne i funkcionalne raznolikosti, ovi enzimi obavljaju brojne funkcije koje su od velikog značaja za živi organizam. Tako su, primjerice, proteaze zaslužne za unutarstanično “recikliranje” proteina, probavu hranjivih tvari ili ranije spomenuto kaskadno pojačanje imunološkog sustava. Ljudski genom sadrži preko 550 gena za koje se pretpostavlja da su proteaze (otprilike 2% ljudskog genoma), od kojih su najzastupljenije metalo, serinske i cisteinske proteaze.⁴



Slika 2.6. Mehanizam cijepanja peptidne veze

Proteaze su na temelju karakterističnih svojstava podijeljene u šest skupina: aspartatne, cisteinske, glutamatne, metalo, serinske i treoninske.

Većina prirodno nastalih proteaza su neaktivni prekursori zvani zimogenima. Neki zimogeni se aktiviraju promjenama u okolini koje iniciraju promjenu konformacije ili vezanjem male molekule (najčešće peptida) što također kao rezultat ima promjenu neaktivne konformacije u aktivnu. Uobičajen postupak aktivacije zimogena uključuje ekspresiju proteaze spojene s aktivacijskim segmentom koji je veličine od 2 do 100 proteinskih ostataka i čija je zadaća spriječiti proteolitičku aktivnost sve dok se ne odcijepi. Najčešći aktivacijski segmenti su N-terminalne sekvence koje sterički blokiraju aktivno mjesto, a osim toga, važni su i za savijanje, stabilnost i sortiranje prekursora proteaze.⁴

2.2.1. Inženjerstvo proteaza i primjena u industriji

Temeljeno na snazi i specifičnosti hidrolitičkih reakcija inženjerskih proteaza otvara se mogućnost velikom broju potencijalnih upotreba. Ključno svojstvo jest prividna plastičnost aktivnih mjesta proteaza koja im je omogućila evoluciju u različitim stupnjevima specifičnosti i selektivnosti prema supstratu otvarajući tako i mogućnost za daljnji razvoj inženjerstva te stvaranje jedinstvenih i novih aktivnosti.⁴

Jedinstvene katalitičke aktivnosti proteaza čine ih jeftinim izborom za hidrolizu peptidnih veza za industrijsku upotrebu. No, primjena u komercijalne svrhe vrlo često zahtijeva održavanje velike aktivnosti u nefiziološkim uvjetima kao što su visoke temperature i pH, prisutnost intenzivnih kelirajućih sredstava i deterdženata. Budući da to nije prirodno okruženje za enzime, oni su u takvim uvjetima nestabilni ili neaktivni. Stoga se inženjerstvom proteaza mutagenezom ili usmjerenom evolucijom generiraju proteaze s poboljšanim funkcijama koje zadovoljavaju potrebe komercijalne primjene.⁴

Proteaze su se prvi put primijenile u industriji deterdženata, te kožnoj i prehrambenoj industriji. U nastavku slijede svojstva proteaza koja su bitna ukoliko je enzim namijenjen korištenju u idustrijama.⁴

2.2.1.1. Termostabilnost

Visoka termostabilnost je vrlo važno svojstvo za primjenu proteaza u industriji deterdženata ili preradi kože. Povećane temperature mogu utjecati na nekovalentne interakcije unutar savijenog proteina, može doći do razmatanja proteina, čime on mijenja svoj oblik, ali i gubi funkciju.⁴

Proteinsko inženjerstvo rješenje pronalazi u moduliranju stabilnosti u skladu sa željenim zahtjevima. Prvi korak u poboljšanju termostabilnosti jest traženje bilo kakvih prirodno evoluiranih stabilizacijskih ostataka usporedbom sekvenci s odgovarajućim homolognim proteinima iz mezofila i termofila. Osim toga se opsežno istražuje i nekoliko drugih strategija proteinskog inženjerstva.⁴

2.2.1.2. Disulfidne veze

Prilikom nastajanja kvartarne strukture, nekim proteinima je prirodno da stvaraju disulfidne veze čija je funkcija stabilizacija proteina. Jedna od strategija u proteinskom inženjerstvu za povećanje stabilnosti strukture jest uvođenje neprirodnih intramolekularnih disulfidnih veza. Dodatne intramolekulske disulfidne veze mogu smanjiti entropiju razmotanog polipeptidnog lanca stabilizirajući tako savijenu strukturu. No, pritom treba imati uzeti u obzir da uvođenje disulfidnih veza na pogrešnim mjestima u strukturi može dovesti do narušavanja stabilnosti proteaza.⁴

2.2.1.3. Modifikacija aminokiselina

Budući da je struktura i funkcija proteina određena slijedom aminokiselina u polipeptidnom lancu, i najmanja promjena u tom smislu može u potpunosti promijeniti izgled, ali i funkciju cijelog proteina. Na ovaj način se promjenom slijeda može utjecati na ponašanje enzima prema supstratu. Mutageneza i kemijska modifikacija su važne strategije u stvaranju oksidacijski oslabljenih ostataka u proteazama s ciljem poboljšanja svojstava otpornih na oksidaciju. Primjerice, u neoksidativnim uvjetima su aminokiseline koje sadrže sumpor (cistein i metionin) pokazale najspecifičnije aktivnosti prema određenom supstratu.⁴

2.2.1.4. Metalno vezivanje

Mjesta vezivanja metala mogu imati funkciju stabilizacije i za aktivacije enzima. Primjerice, visoko termostabilna proteaza iz *Bacillus sp.* u potporodici subtilisin snažno se stabilizira vezanjem triju iona Ca^{2+} na specifična mjesta u terciarnoj strukturi sprječavajući tako autolizu i toplinsko razmatanje. No, za upotrebu u deterdžentima za rublje su potrebne modificirane varijante subtilisina koje pokazuju visoku stabilnost i katalitičku aktivnost bez prisutnosti kalcija zbog velike koncentracije kelatnih sredstava prisutnih u većini marki. Kako bi se riješio ovaj problem, izolirana je evoluirana varijanta subtilisina, potencijal vezanja kalcija u početku je uklonjen brisanjem petlje za vezanje kalcija, nakon čega je uslijedilo poboljšanje stabilnosti usmjerenom evolucijom. Promjenom 12 položaja aminokiselina je dobivena vrlo stabilna varijanta subtilisina s povećanim vremenom poluraspada na povišenim temperaturama, a bez prisutnosti kalcija.⁴

2.2.1.5. Stabilnost i aktivnost u organskim otapalima

Industrijska primjena enzima može se uvelike proširiti ukoliko enzim može djelovati u prisutnosti organskih otapala, a ne samo u vodenim sredinama. Proteaze, uključujući i ranije spomenuti subtilisin, pokazale su potencijalnu primjenu u organskoj sintezi, sintezi peptida, enzimskoj esterifikaciji oligosaharida u dimetilformamidu (DMF). Sloj vode kao otapala vezan za savijenu strukturu proteina omogućava proteinu da pri prijelazu iz vode u organsko otapalo zadrži ispravnu i funkcionalnu konformaciju. No, organska otapala koja se miješaju s vodom, kao što je DMF, imaju sposobnost uklanjanja vode od molekule proteina, iz čega kao posljedica proizlazi destabilizacija prirodnog proteina. Organska otapala također mogu destabilizirati stanje prijelazne reakcije i na taj način smanjiti katalitičku aktivnost enzima. Stoga, proteinsko inženjerstvo ima zadatak da usmjerenom evolucijom pronađe rješenje za oporavak izgubljene stabilnosti i katalitičke aktivnosti enzima u organskim otapalima.⁴

2.2.1.6. Inženjerstvo proteaza u terapijskim primjenama

Koncept korištenja dizajniranih proteaza u terapijskim primjenama dugo je bio cilj farmaceutske industrije. Katalitička aktivnost proteaza čini ih jedinstvenom terapijom u smislu da u malim dozama imaju mogućnost inaktivirati ciljane proteine i pritom pokazati veliku učinkovitost. U kombinaciji ti efekti mogu dovesti do potrebe za manjim i rjeđim doziranjem što

rezultira nižim troškovima. Trenutno se klinički ispituju različite terapije proteazama te se za mnoge od njih očekuje da će u idućih nekoliko godina izaći na tržište. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) je odobrila različite prirodne proteaze za primjenu kod trombolize, hemofilije, grčenja mišića, sepse i drugih. U terapijske svrhe su trenutno na tržištu najviše zastupljene serinske proteaze, od čega su samo dvije projektirane za poboljšana svojstva kao što je vrijeme poluživota u serumu ili stabilnost, ali do sada nisu zabilježeni dizajni enzima s ciljem poboljšanja specifičnosti i selektivnosti.⁴

Od godine 1982., kada je usmjerena mutagenesa korištena prvi put u inženjerstvu enzima poznate strukture, ostvarena su izvanredna postignuća za poboljšanje urođenih svojstava proteaza, kao što su katalitička aktivnost i stabilnost. Iako su postignuća sa subtilisinom i faktorima zgrušavanja kod ljudi pokazala mjerljivo pozitivan učinak, šira primjena komercijalnih proteaza i dalje je ograničena jer je postignut mali napredak u mijenjanju specifičnosti supstrata. Stoga, prilagodba specifičnosti proteaza jest važan cilj u unaprjeđenju uporabe projektiranih proteaza za terapijske primjene.⁴

2.2.2. Komercijalne proteaze

Prilikom izrade ovog rada korišteno je šest komercijalnih proteaza proizvođača *Novozymes*, najvećeg svjetskog dobavljača enzimskih i mikrobnih tehnologija. Njihova imena i kratak pregled informacija nalaze se u *Tablici 2.1.*

Tablica 2.1. Komercijalne proteaze

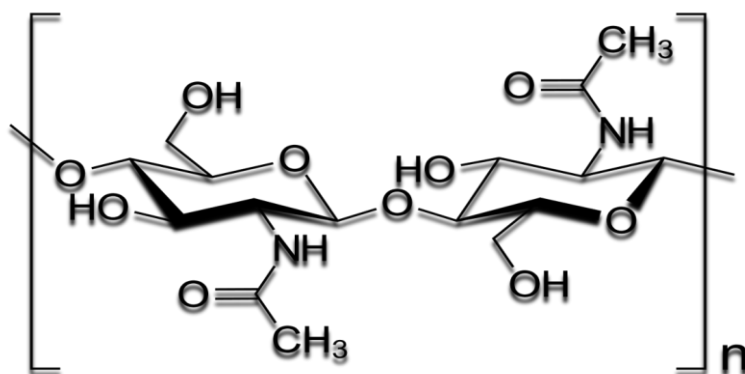
Enzim	Porijeklo	Optimalni uvjeti	Primjena
Alkalaza ⁵	<i>Bacillus licheniformis</i>	pH 7-9 temperatura 30-65 °C	stereoselektivna hidroliza amino estera i selektivnih estera
Esperaza ⁵		pH 8-10 temperatura 30-70 °C	serinska endopeptidaza, hidrolizira unutarnje peptidne veze
Neutraza ⁵	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	pH 7 temperatura 40-50 °C	Metallo endoproteaza, hidrolizira unutarnje peptidne veze
Flavourzyme ⁶		pH 4-8 temperatura 30-65 °C	Hidroliza proteina životinjskog podrijetla, ekstrakcija proteina iz kvasaca
Novozyme ⁷ 37071	<i>Aspergillus oryzae</i>	pH 5-9 temperatura 30-60 °C	Stereoselektivna hidroliza estera
Novo-ProD ⁸		pH 7-11 temperatura 55-75 °C	Endoproteaza, hidrolizira proteine perja, glikozamine, želatinu, kolagen

2.3.HITIN

2.3.1. Struktura i svojstva hitina

Hitin je jedan od najrasprostranjenijih biopolimera u prirodi.⁹ Riječ je o linearnom strukturnom polisaharidu sličnom celulozi, sastavljenom od 2-acetamido-2-deoksi-D-glukoza

jedinica povezanih α -(1-4)- vezama koje se mogu de-N-acetilirati do određene mjere. Prikaz ponavljajuće monomernne jedinice se nalazi na *Slici 2.7*. Molekule hitina su poredane u helikoidne mikrofibrilarne strukture koje su ugrađene u proteinski materijal ljuski. Hitin se javlja u tri polimorfna oblika, α -, β -, γ - hitinima, koji se razlikuju po rasporedu molekularnih lanaca unutar kristalne ćelije. α -hitin je sa svojim antiparalelnim lancem najrasprostranjeniji hitin u prirodi, prisutan je kod rakova i školjki. β -hitin ima paralelne lance i ima ga u torovima lignji, dok je γ -hitin kombinacija α - i β -hitina. Hitin je usko povezan s proteinima, mineralima, lipidima i pigmentima.²



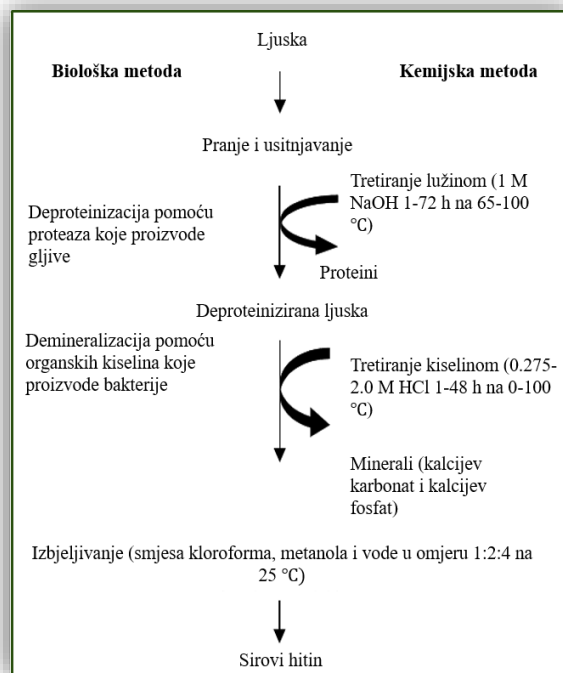
Slika 2.7. Ponavljajuća monomerna jedinica hitina

Nekoliko istraživanja pokazalo je da se specifične karakteristike, kao što su stupanj deacetilacije te molekulska masa hitina i njegovog deacetiliranog derivata hitozana, razlikuju ovisno o uvjetima procesa. Fizikalno-kemijske karakteristike hitina i hitozana utječu na njihova funkcionalna svojstva kao što su topljivost, kemijska reaktivnost i biološka aktivnost. Slično celulozi, hitin je netopiv u vodi, vodenim otapalima i uobičajenim organskim otapalima zbog svojih jakih unutarmolekulskih i međumolekulskih vodikovih veza. Topljivost, koja je povezana s različitim parametrima, vrlo je teško kontrolirati.² Hitin se hidrolizira različitim metodama s ciljem nastajanja manjih oligosaharida. Neke od kemijskih metoda su provođenje acetolize pomoću anhidrida octene kiseline/sumporne kiseline, hidroliza s klorovodičnom kiselinom/sonoliza pod ultrazvučnim zračenjem ili fluorohidroliza pomoću bezvodnog HF.¹⁰ Hitin podliježe nespecifičnoj enzimskoj hidrolizi lizosomima, celulazama, hemicelulazama, proteazama i lipazama. Slične kemijske strukture celuloze i hitina/hitozana određuju sličnost njihovih puteva razgradnje od strane mikroorganizama, uključujući stvaranje djelomično deaminiranog hitozana/celuloze.¹¹ Enzimska hidroliza korisna je metoda za pripravu monomera iz hitina i

hitozana jer je prinos monomera veći enzimskom hidrolizom u odnosu na kiselinsku, a i ekološki je prihvatljiviji. Enzim hitin acetilaza hidrolizira acetamido skupinu u N-acetilglukozaminske jedinice hitina i hitozana prilikom čega nastaju jedinice glukozamina i octena kiselina.¹⁰

U biosferi su prisutne velike količine hitina. Glavna je komponenta u potpornim tkivima organizama kao što su rakovi, gljive i insekti.¹² U preradi kozica za ljudsku prehranu preko 40% ukupne mase odlazi u otpad. Oko 40% otpada čini hitin prekriven kalcijevim karbonatom i astaksantinom, sadrži meso i male količine lipida. Manji dio otpada se suši i koristi kao hrana za kokoši, dok se ostatak odlaže u more što predstavlja jedno od glavnih onečišćenja obalnih područja. Korištenje otpada školjkaša predloženo je ne samo za rješavanje ekoloških problema, već i kao alternativa za tretiranje otpada školjkaša budući da je u sastavu 30-40% proteina, 30-50% kalcijevog karbonata i 20-30% hitina, ovisno o vrsti i sezoni.²

Danas glavni izvor industrijskog hitina dolazi od otpada iz proizvodnje morske hrane, a najlakši način dobivanja je jednostavna ekstrakcija. Ekstrakcija hitina se može provesti kemijskom i biološkom metodom, a shematski prikaz nalazi se na *Slici 2.8*. Kemijska metoda podrazumijeva dva osnovna koraka od čega je prvi odvajanje proteina alkalnom obradom (deproteinizacija), a drugi odvajanje kalcijevog karbonata i kalcijevog fosfata kiselom obradom na visokoj temperaturi (demineralizacija). Korištenjem enzima proteaza za deproteinizaciju ljuski rakova izbjegava se korištenje lužine. Biološka metoda obrade omogućuje dobivanje čvrste frakcije hitina i tekuće frakcije bogate proteinima, mineralima i astaksantinom. Tekuća frakcija se može koristiti i kao proteinsko-mineralni dodatak za prehranu ljudi ili kao stočna hrana.²



Slika 2.8. Shematski prikaz obrade ljuštura, usporedba biološke i kemijske metode

2.3.2. Primjena hitina i hitozana

Tijekom proteklih nekoliko desetljeća su hitin i hitozan privukli veliki interes s obzirom na širok raspon novih primjena koje su moguće zahvaljujući jedinstvenim svojstvima, biorazgradivosti, biokompatibilnosti te netoksičnosti.²

2.3.2.1. Pročišćavanje otpadnih voda

Hitin i hitozan se mogu koristiti za adsorpciju ili fiksaciju teških metala i boja. Hitozan je polikacijski polimer učinkovit u koagulaciji, flokulaciji i dehidraciji aktivnog mulja zbog čega se koristi u pročišćavanju otpadnih voda. Druga moguća primjena jest imobilizacija mikroorganizama ili mulja u matricama hitozana za pročišćavanje otpadnih voda u ekstremnim okolišnim uvjetima kao što su ekstremne pH vrijednosti te prisutnost organskih otapala. Na taj način je omogućena ponovna upotreba stanica mikroorganizama i njihovo korištenje u kontinuiranom procesu.²

2.3.2.2. Prehrambena industrija

Primjena ovih biopolimera u prehrani tek je djelomično iskorištena, a nude širok raspon jedinstvenih primjena zahvaljujući funkcionalnim svojstvima. Hitozan pokazuje sposobnosti vezanja vode, masti i bojila, a može se koristiti i kao emulgator. Koristi se kao dodatak prehrani za konzerviranje hrane, kod filtriranja i bistrenja voćnih sokova, kao antioksidans, kao ekstrakt željeza za sprječavanje neugodnih mirisa u kuhanom mesu i tako dalje.²

2.3.2.3. Biomedicinska primjena

Hitin i hitozan pokazuju izvrsna biološka svojstva kao što su netoksičnost, biorazgradnja u ljudskom tijelu, biokompatibilnost, pomažu kod zacjeljivanja rana, pokazuju hemostatsko djelovanje. Hitin se koristi kao pomoćna tvar i nosač lijeka u obliku filma, gela ili praha kod primjena koje uključuju mukoadhezivnost stoga se, osim ranije navedenoga, koristi i u isporuci lijekova.²

2.3.2.4. Ostale primjene

Hitin i derivati hitozana mogu učinkovito smanjiti bolesti koje se prenose tlo. Osim toga, hitin ima veliki potencijal primjene u poljoprivredi, može zadržavati hranjive tvari u tlu te doprinosi ciklusu dušika. Pri određenim uvjetima hitin se može prevoditi u saharide. Potencijalnu primjenu ima i kod proizvodnje biogoriva, može se koristiti kao polako razgrađujući supstrat u mikrobnim gorivnim člancima.²

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio podijeljen je u nekoliko cjelina. Najprije su određivani optimalni radni uvjeti (pH vrijednost i temperatura) komercijalnih proteaza, nakon čega je uslijedilo ispitivanje operacijske stabilnosti proteaza pri zadanim vrijednostima temperature i pH. Sljedeći korak bio je hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru pri dvjema različitim koncentracijama enzima, dok zadnji korak uključuje hidrolizu proteina u ostacima kozica u ponovljivom reaktoru.

3.1. APARATURA

U nastavku slijede fotografije i kratki opisi korištenih uređaja i aparatura.

Na *Slici 3.1. a i b* su prikazane tresilice koja su korištene za održavanje određene temperature enzima i za inkubaciju uzoraka.



Slika 3.1. a) Tresilica Thermo Scientific™, b) Tresilica Eppendorf ThermoMixer C

Slika 3.2. a) i b) prikazuju centrifugu s hlađenjem korištenu za odvajanje taloga i supernatanta i rotor koji je pritom korišten za centrifugiranje reaktora malih volumena.



Slika 3.2. a) Centrifuga Hettich Universal 320R i b) Rotor korišten za centrifugiranje reaktora malih volumena

Slika 3.3. prikazuje miješalicu s grijačem koja je korištena za otapanje kazeina u vodenoj kupelji zagrijanoj na 75 °C. Uz to, korištena je i za miješanje Bradford reagensa korištenog kod određivanja koncentracije proteina.



Slika 3.3. Miješalica IKA RH Basic 2

Sljedeća fotografija (*Slika 3.4.*) prikazuje spektrofotometar korišten za mjerenje promjena apsorbancije pri određenim valnim duljinama.



Slika 3.4. Spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

Za provedbu reaktorskih i ponovljivih eksperimenata bilo je potrebno odvagati određenu masu otpadaka kozica te staviti u reaktore. U tu svrhu korištena je analitička vaga prikazana na *Slici 3.5.*



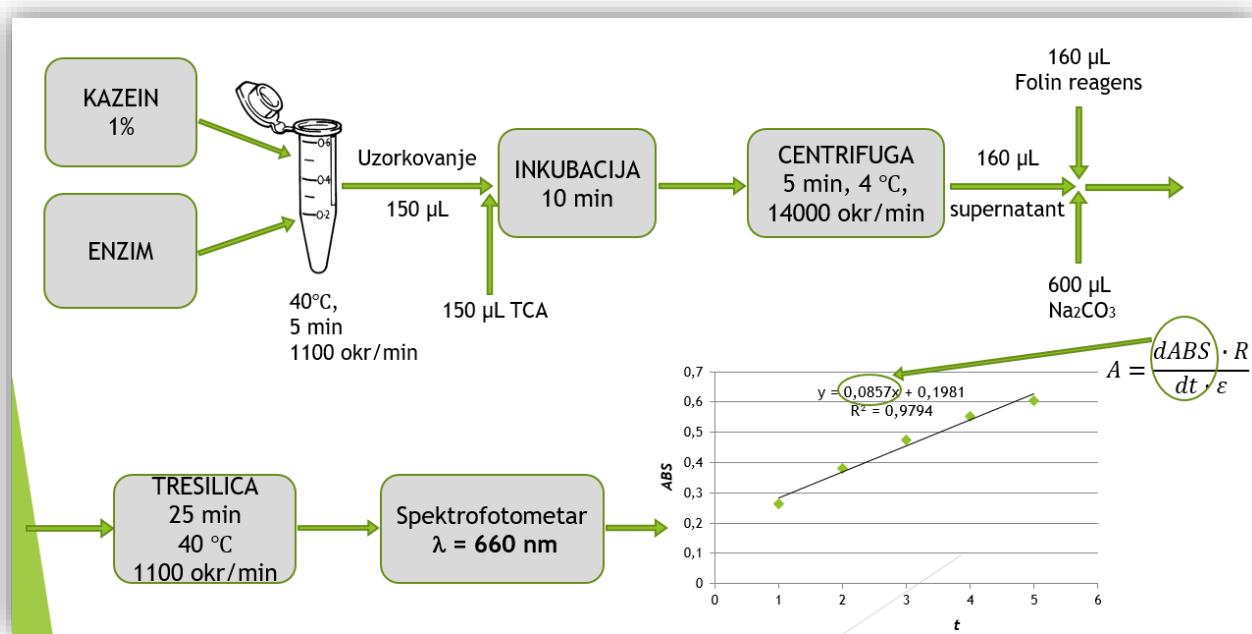
Slika 3.5. Analitička vaga *Shimadzu*

3.2. ANALITIČKE METODE

3.2.1. Određivanje volumne aktivnosti proteaza

Pojam određivanja aktivnosti odnosi se na volumnu aktivnost. Kako bi se odredila volumna aktivnost proteaza, provedena je reakcija razgradnje kazeina prilikom čega nastaje tirozin. Koncentracija tirozina određivana je dodatkom Folinovog reagensa i mjerenja apsorbancije na spektrofotometru pri valnoj duljini od 660 nm. Prije početka određivanja aktivnosti bilo je potrebno napraviti baždarni pravac za tirozin (*Prilozi, Slika 8.1.*) i to tako da su mjerene apsorbancije za poznate koncentracije otopina tirozina, a rezultati su prikazani u obliku linearne ovisnosti apsorbancije o koncentraciji tirozina.

Shematski prikaz određivanja volumne aktivnosti nalazi se na *Slici 3.6.*



Slika 3.6. Prikaz određivanja volumne aktivnosti

Volumna aktivnost određivana je na način da je u reaktoru pomiješano 900 μL otopine kazeina i 900 μL otopine enzima prema zadanom razrjeđenju. U vremenu $t = 0$ je iz reaktora uzeto 150 μL uzorka i prebačeno u 150 μL otopine TCA kako bi se zaustavila reakcija, te je postupak ponavljan u narednih 5 minuta s korakom od 1 minute. Nakon toga su uzorci inkubirani 10 minuta

na sobnoj temperaturi kako bi se istaložio preostali enzim i kazein. Uslijedilo je centrifugiranje na 4 °C, 14000 okr min⁻¹ tijekom 5 minuta. U sljedećem koraku je 160 µL supernatanta prebačeno u 600 µL 0,5 M otopine Na₂CO₃, te je po dodatku 160 µL 1 M otopine Folinovog reagensa uzorak stavljen na inkubaciju na tresilicu pri temperaturi od 40 °C i 1100 okr min⁻¹. Inkubacija je trajala 25 min, a po završetku je uzorak prebačen u kvarcnu kivetu te je na spektrofotometru pri valnoj duljini od 660 nm očitana promjena apsorbancije. Na temelju promjene apsorbancije u vremenu izračunata je volumna aktivnost prema sljedećoj jednadžbi:

$$A_v = \frac{V_r}{\epsilon_{660} \cdot d \cdot V_{enzim}} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (3)$$

Ukupni volumen reaktora izražen u mL predstavlja oznaka V_r . ϵ_{660} je ekstincijski koeficijent pri valnoj duljini od 660 nm izražen u cm² µmol⁻¹, a njegova vrijednost je jednaka vrijednosti nagiba baždarnog pravca za tirozin (*Prilozi, Slika 8.1.*). Oznaka d jest promjer kivete (1 cm), a V_{enzim} predstavlja volumen dodanog enzima i izražen je u mL. Vrijednost omjera $\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$ predstavlja promjenu apsorbancije u vremenu i izražena je u min⁻¹. Primjer rezultata mjerenja aktivnosti proteaze dan je na *Slici 8.2.* u poglavlju *Prilozi*.

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Primjenom Bradfordove metode određivana je koncentracija proteina u krutim uzorcima. Za ovu metodu je bilo potrebno pripremiti Bradfordov reagens na način da se 100 mg bojila Commassie Brilliant blue otopila u smjesi 50 mL 95% etanola i 100 mL 85% ortofosforne kiseline te se do volumena 1 L dodala ultra čista voda. Dobivena smjesa se potom višestruko filtrirala kroz 0,45 µm šprica filter do smeđe boje. Pripremljeni reagens se čuvao u staklenoj boci omotanoj folijom u hladnjaku na 4 °C. Prije korištenja je reagens otprilike sat vremena stavljan na sobnu temperaturu uz lagano miješanje na magnetskoj miješalici.

Proces određivanja koncentracije proteina provodio se mjerenjem promjene apsorbancije smjese koju čini uzorak proteina i Bradfordov reagens. Mjerenje se provodi u plastičnim kivetama na spektrofotometru na dvije različite valne duljine, 450 nm i 595 nm. Sadržaj kiveta čini 500 µL uzorka kojem se doda 500 µL Bradfordovog reagensa, nakon čega slijedi inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Po završetku inkubacije se provodi mjerenje. Na *Slici 8.3.* u poglavlju *Prilozi* se nalazi baždarni dijagram korišten kod određivanja koncentracije proteina.

3.3. Optimalna pH vrijednost i temperatura

S ciljem utvrđivanja optimalnih vrijednosti pH i temperature za rad pojedinog enzima, mjerene su promjene apsorbancija te računane vrijednosti volumnih aktivnosti proteaza prema metodi opisanoj u *Poglavlju 3.2.1.* Ispitivane su pH vrijednosti od 7 do 9 s korakom 0,5 prilikom čega je korišten pufer Tris-HCl spomenutih pH vrijednosti i na temperaturi od 40 °C. Za ispitivanje vrijednosti optimalne temperature korišten je pufer koncentracije 0,1 M Tris-HCl pH vrijednosti 8, a ispitivane su temperature između 35 i 60 °C s korakom od 5 °C.

3.4. Operacijska stabilnost

Operacijska stabilnost određivana je za šest komercijalnih proteaza tijekom 71,5 h, prilikom čega su Alkalaza, Novozyme, Neutraza i Novo-ProD bili razrijeđeni 400 x, a Esperaza i Flavourzyme 200 x. Eksperimenti su provođeni pri temperaturi od 50 °C korištenjem pufera Tris-HCl koncentracije 0,05 M i pH vrijednosti 8. Iz reaktora je uzimano po 90 µL uzorka u 0h, 0,5h, 2h, 4h, 24h, 47h, 47,5h, 71h i 71,5h i dodano u 810 µL pufera i 900 µL kazeina te je prema postupku iz *Poglavlja 3.2.1.* određena aktivnost enzima.

Dobiveni eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu *Scientist* kako bi se opisala inaktivacija enzima. Kinetika smanjenja aktivnosti proteaza opisana je kinetikom prvoga reda, kinetikom drugoga reda, te pomoću troparametarskog modela.

Za prikaz brzine inaktivacije se obično koristi kinetika prvog reda koja je ujedno i najjednostavniji model, a prikazuje se jednadžbom:

$$dA = -k_d A \quad (4)$$

Drugi način za opisivanje brzine inaktivacije jest kinetika drugog reda koja je dana jednadžbom:

$$dA = -k_d A^2 \quad (5)$$

Treći model korišten za opis brzine inaktivacije jest troparametarski model. Osnova ovog modela je kinetika prvog reda za sustav s dva oblika enzima gdje se u obzir uzima da svaki oblik enzima ima svoju brzinu inaktivacije. Jednadžba troparametarskog modela slijedi u nastavku:

$$A = A_0[(\alpha e^{-k_{d1}t}) + (1 - \alpha)e^{-k_{d2}t}] \quad (6)$$

A predstavlja aktivnost enzima, A_0 početnu aktivnost enzima, α je parametar koji označava udio pojedinog oblika enzima, a konstante k_{d1} i k_{d2} jesu inaktivacijske konstante jednog i drugog oblika enzima.

3.5. Priprema uzoraka kozica

Sirovina korištena za ekstrakciju hitina su u ovom slučaju ljuštura kozica. Otpaci ljuštura su prikupljeni na tržnici Dubrava u Zagrebu. Prije provođenja eksperimenata bilo je potrebno pripremiti uzorke što je provedeno na način da su ispirani vodovodnom vodom u tri obroka, potom sušeni 14 h u sušioniku s digestorom kako bi se odvodili neugodni mirisi. Sljedeći korak u pripremi bio je mljevenje ljuštura u mlincu za mljevenje kave. Zadnji korak uključuje prosijavanje na analitičkom situ promjera 200 μ m i otvora mreže 2 mm. Rezultat obrade jest heterogena smjesa čestica različitih veličina, a manjih od 2 mm (*Slika 3.7.*) te pripadajućeg karakterističnog mirisa.



Slika 3.7. Obradeni uzorci ljuštura kozica

3.6. Hidroliza i ekstrakcija proteina u ljušturama kozica

Za provedbu hidrolize proteina iz otpadaka kozica korištene su komercijalne proteaze različitih koncentracija (5 U / 10 mg i 0,5 U / 10 mg), a reakcije su provođene u kotlastim

reaktorima volumena $V_{\text{reaktor}} = 100 \mu\text{L}$ (osim za Flavourzyme koncentracije 5 U / 10 mg gdje je $V_{\text{reaktor}} = 219 \mu\text{L}$). Sadržaj reaktora je uključivao masu kozica od 10 mg, određene volumene pufera 0,05 M Tris-HCl pH vrijednosti 8, te određene volumene pojedinog enzima što je prikazano u *Tablici 3.1.* za obje koncentracije. Eksperimenti su provedeni tijekom 8 sati na temperaturi od 50 °C i miješani na 1100 okr min^{-1} .

Tablica 3.1. Volumeni pufera i enzima korišteni kod hidrolize i ekstrakcije proteina

Enzim	5 U / 10 mg		0,5 U / 10 mg		
	$V_{\text{pufer}}/\mu\text{L}$	$V_{\text{enzim}}/\mu\text{L}$	$V_{\text{pufer}}/\mu\text{L}$	$V_{\text{enzim}}/\mu\text{L}$	Razrjeđenje enzima
Alkalaza	78	22	78	22	10
Esperaza	90	10	90	10	10
Flavourzyme	0	219	78	22	1
Novozyme	95	5	95	5	10
Neutraza	41	59	41	59	10
Novo-ProD	92	8	92	8	10

Pripremljeno je 30 reaktora. Sve reakcije su pokrenute u isto vrijeme, ali nisu sve jednako trajale. Za svaki pojedini enzim reakcije su prekidane nakon 1, 2, 4, 6 i 8 sati. Po završetku reakcija u prvoj seriji reaktora (nakon 1 h), reaktori su prebačeni na centrifugiranje tijekom 5 minuta na 4 °C i 14000 okr min^{-1} . Dobiveni supernatant je izdvojen kako bi se odredila preostala aktivnost enzima prema metodi opisanoj u *Poglavlju 3.2.1.* Talog je u dva obroka ispiran s po 1 mL pufera 0,05 M Tris-HCl pH=8, nakon čega je spremljen za analizu proteina prema metodama opisanim u *Poglavlju 3.7* i *Poglavlju 3.2.2.* Isti postupak proveden je i nakon 2, 4, 6 i 8 sati.

3.7. Ekstrakcija proteina

U svrhu ekstrakcije proteina iz ljuštura kozica primijenjena je metoda alkalne ekstrakcije. Ova metoda korištena je i kod ekstrakcije proteina iz ostataka škampa, lososa i bakalara gdje se pokazala iznimno učinkovitom.^{13,14}

Ekstrakcija proteina iz otpadaka kozica provedena je na ispranim talozima iz reaktorskih eksperimenata. Krutim uzorcima je dodano 60 μL otopine NaOH koncentracije 0,5 M, 174 μL

10% otopine NaCl te 366 μL ultra čiste vode. Reaktori su potom stavljeni na inkubaciju na tresilicu pri 40 °C i 1100 okr min^{-1} tijekom 1 sata, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje na 4 °C na 14000 okr min^{-1} tijekom 5 minuta. Dobiveni supernatant je izdvojen u svrhu određivanja koncentracije proteina metodom koja je opisana ranije, u *Poglavlju 3.2.2.*

3.8. Ponovljivi eksperimenti

U okviru ovih eksperimenata ispitivala se mogućnost višestruke primjene istog enzima prilikom hidrolize proteina u ljušturama kozica. Na ovaj način je ispitana učinkovitost istog enzima u hidrolizi proteina u više reakcija te je po završetku eksperimenata određen ostatak aktivnosti enzima i koncentracija proteina u talogu. U ovim eksperimentima su korištena tri enzima: Alkalaza, Flavourzyme i Novo-ProD. Volumeni dodanog pufera i razrijeđenih enzima nalaze se u *Tablici 3.2.*

Tablica 3.2. Volumeni pufera i enzima korišteni prilikom provođenja ponovljivih eksperimenata

Enzim	Razrjeđenje enzima	$V_{\text{pufer}}/\mu\text{L}$	$V_{\text{enzim}}/\mu\text{L}$
Alkalaza	10	178	22
Flavourzyme	1	178	22
Novo-ProD	10	192	8

Pripremljeno je 18 reaktora i u svakoga od njih je dodano po 10 mg kozica. U prva tri reaktora (za svaki enzim) su dodani volumeni pufera (0,05 M Tris-HCl, pH=8) i razrijeđenih enzima prema *Tablici 3.2.*, nakon čega su reaktori prebačeni na tresilicu na 1100 okr min^{-1} i 50 °C tijekom jednog sata. Po isteku vremena, reakcija je zaustavljena centrifugiranjem na 14000 okr min^{-1} na 4 °C unutar 5 minuta. Supernatant koji sadrži enzim je izdvojen i dodan u drugi reaktor u kojem se nalazilo 10 mg kozica, čime je započeta sljedeća reakcija. Talosi su isprani s po 1 mL pufera u dva obroka te spremljeni za analizu proteina prema optimiranom postupku opisanom u *Poglavlju 3.2.2.* Po završetku zadnjeg eksperimenata je iz supernatanta određena preostala aktivnost enzima prema metodi opisanoj u *Poglavlju 3.2.1.*

3.9. Obrada rezultata

U svrhu obrade rezultata korišten je programski paket *Scientist*. Uzevši u obzir pretpostavljene modele i eksperimentalne podatke procijenjeni su parametri modela korištenjem metode najmanjih kvadrata i simpleks metode. Metoda najmanjih kvadrata se definira kao oblik matematičke regresijske analize s ciljem određivanja linije koja najbolje opisuje skup podataka. Pritom svaka točka predstavlja odnos između nezavisne i zavisne varijable, a konačan cilj je graf linearne funkcije, odnosno pravac, koji minimizira zbroj kvadrata pogrešaka nastalih zbog rezultata pridruženih jednadžbama.¹⁵ Simpleks metoda jest opća iterativna metoda koja se ujedno smatra i konačnom metodom u linearnom programiranju budući da rješava problem u konačnom broju iteracija. Radi se o iterativnom postupku koji polazi od početnog rješenja koje zadovoljava jednadžbe i uvjete nenegativnosti i u svakom sljedećem koraku traži rješenje koje je bolje od onog prethodnog.¹⁶

Simulacije se provedene rješavanjem diferencijalnih jednadžbi unutar programskog paketa *Scientist* koji koristi metode kao što su Episode algoritam, Eulerova metoda, Runge Kutta IV te Bulirsch-Stoer metoda.

Kriteriji kao što su standardna devijacija (R^2) te kriterij odabira modela (*Model Selection Criterion, MSC*) su korišteni za statističku usporedbu modela. *Model Selection Criterion* prikazuje jednadžba:

$$MSC = \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (Y_{exp,i} - \bar{Y}_{exp})^2}{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (Y_{exp,i} - Y_{rač,i})^2} \right) - \frac{2 \cdot p}{n} \quad (7)$$

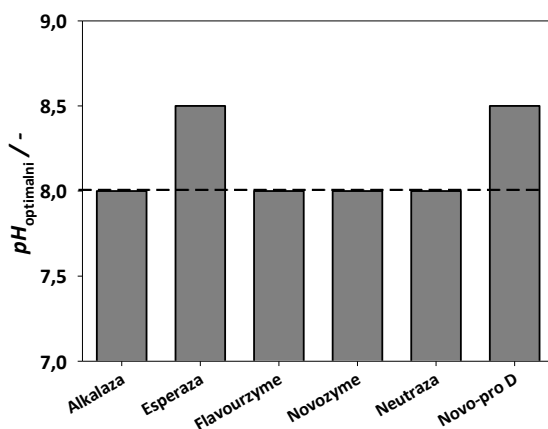
prilikom čega w_i predstavlja parametre za uzorke podataka, $Y_{rač,i}$ simulirane vrijednosti, $Y_{exp,i}$ eksperimentalno dobivene (izmjerene) vrijednosti, a \bar{Y}_{exp} srednju vrijednost izmjerenih vrijednosti. *MSC* je recipročna modifikacija *Akaike* informacijskog kriterija, ne ovisi o skaliranju podataka, a što je vrijednost veća, označava bolje prilagođavanje. Kod uspoređivanja modela, prikladnijim se smatra onaj koji ima veću vrijednost *MSC*.¹⁷

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu korišteno 6 komercijalnih proteaza (*Tablica 2.1.*) kao mogućih rješenja za hidrolizu proteina iz otpada ljusaka rakova. Najprije su ispitani optimalni radni uvjeti, nakon čega je određena operacijska stabilnost svih enzima na temperaturi od 50 °C i pH vrijednosti 8. Uslijedila je provedba reaktorskih eksperimenata gdje su za hidrolizu proteina korištene dvije koncentracije enzima, 5 U / 10 mg i 0,5 U / 10 mg. Zadnji korak bio je hidroliza proteina u ponovljivom reaktoru u kojem je ispitano koliko se puta uzastopno može koristiti isti enzim te kolika je njegova učinkovitost u provedbi takvih reakcija.

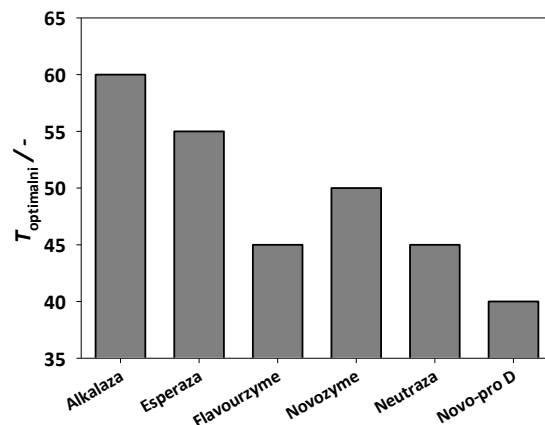
4.1. Određivanje optimalnih radnih uvjeta

Svaki enzim ima svoje optimalno područje rada u smislu temperature i pH vrijednosti. Pri tim uvjetima je njegova aktivnost najveća. Optimalna pH vrijednost proteaza korištenih u ovom radu ispitivana je pri temperaturi od 40 °C, a dobiveni rezultati prikazani su na *Slici 4.1.*, prema kojima svim proteazama odgovara alkalna sredina. Točnije, optimalan pH za Alkalazu, Flavourzyme, Novozyme i Neutrazu je 8, dok je za Esperazu i Novo-ProD 8,5.



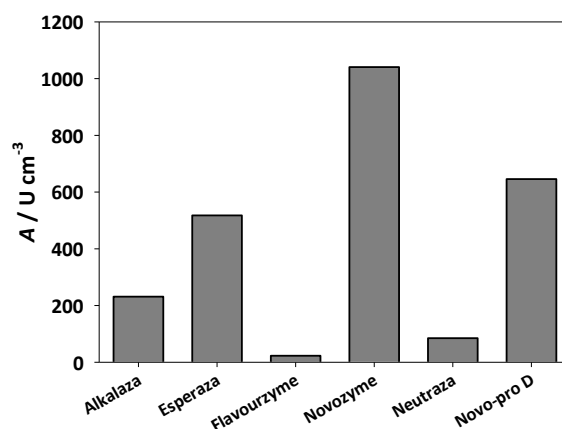
Slika 4.1. Optimalni pH za ispitivane proteaze ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Optimalne temperature su određivane pri pH vrijednosti 8. Na *Slici 4.2* je vidljivo kako je njihove vrijednosti nalaze između 40 i 60 °C, odnosno, najniža temperatura odgovara proteazi Novo-ProD, a najviša Alkalazi. Flavourzyme i Neutraza imaju najveću aktivnost na 45 °C, Novozyme na 50, a Esperaza na 55 °C.



Slika 4.2. Optimalna temperatura za ispitivane proteaze (0,1 M Tris-HCl, pH 8)

Za provedbu svih daljnjih ispitivanja određena je temperatura od 50 °C te pH vrijednost 8 koja je održana korištenjem pufera Tris-HCl koncentracije 0,05 M. Pri tim uvjetima je ispitana volumna aktivnost proteaza čiji su rezultati prikazani na *Slici 4.3*. Rezultati su pokazali kako najveću aktivnost pri navedenim uvjetima ima Novozyme, nakon čega slijedi Novo-ProD, Esperaza i Alkalaza, dok je Flavourzyme pokazao najmanju aktivnost. Zanimljivo je kako je za Novo-ProD pokazao solidnu aktivnost s obzirom na to da su i temperatura i pH viši u odnosu na optimalne vrijednosti.



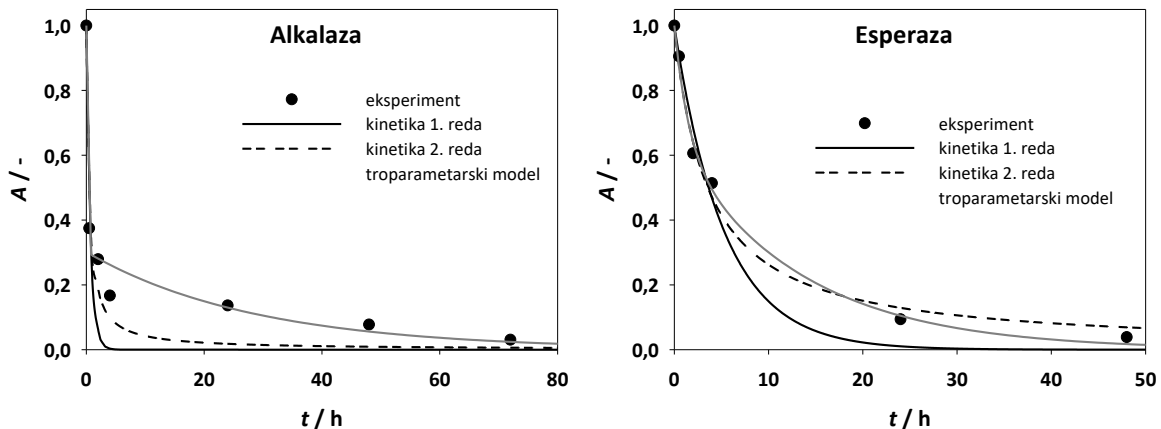
Slika 4.3. Usporedba aktivnosti ispitivanih proteaza ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,05 M Tris-HCl pH 8)

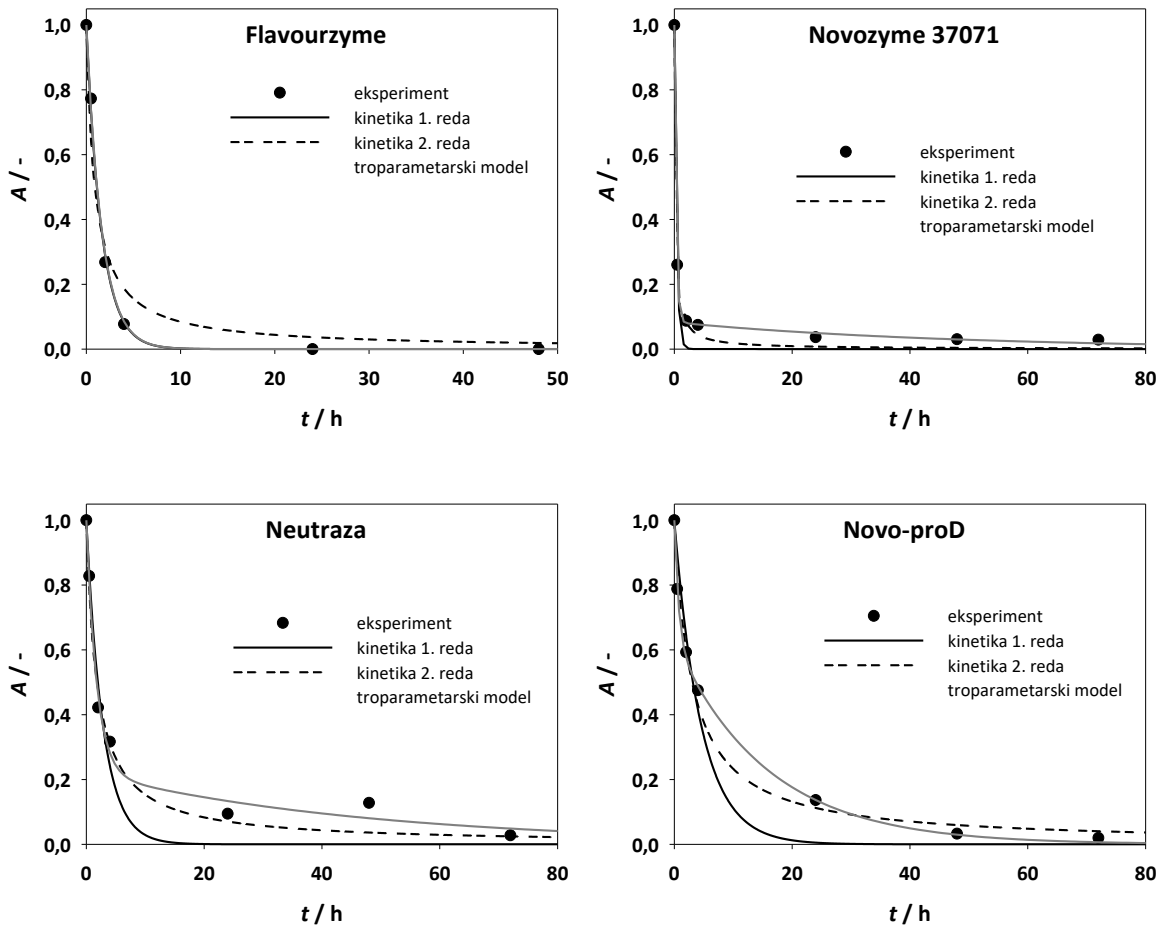
4.2. Operacijska stabilnost proteaza (pH 8, $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Operacijska stabilnost proteaza određena je na temperaturi od $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pH vrijednosti 8. Pritom je praćena aktivnost proteaza, a pad aktivnosti tijekom vremena je opisan pomoću tri modela: kinetika prvog reda, kinetika drugog reda i troparametarski model. Korištenjem programskog paketa *Scientist* su procijenjene konstante brzine inaktivacije za kinetike prvog i drugog reda (k_d), a za troparametarski model je procijenjen udio pojedinog oblika izoenzima (α), te inaktivacijske konstante za svaki od oblika izoenzima, k_{d1} i k_{d2} . Vrijednosti dobivene kao rezultati procjene nalaze se u *Tablici 4.1.*, a grafički prikazi usporedbe modela nalaze se na *Slici 4.4.*

Tablica 4.1. Procijenjeni parametri modela prvog reda, drugog reda te troparametarskog modela inaktivacije u radnim uvjetima

Enzim	Model 1. reda	Model 2. reda	Troparametarski model		
	k_d/min^{-1}	k_d/min^{-1}	α	k_{d1}/min^{-1}	k_{d2}/min^{-1}
Alkalaza	$2,41 \cdot 10^{-2}$	$3,77 \cdot 10^{-2}$	0,70	0,99	$5,85 \cdot 10^{-4}$
Esperaza	$3,17 \cdot 10^{-3}$	$4,69 \cdot 10^{-3}$	0,64	$1,25 \cdot 10^{-3}$	$1,14 \cdot 10^{-2}$
Flavourzyme	$1,03 \cdot 10^{-2}$	$1,81 \cdot 10^{-2}$	0,79	$1,02 \cdot 10^{-2}$	$1,06 \cdot 10^{-2}$
Novozyme	$4,41 \cdot 10^{-2}$	$9,02 \cdot 10^{-2}$	$8,26 \cdot 10^{-2}$	$3,53 \cdot 10^{-4}$	$5,45 \cdot 10^{-2}$
Neutraza	$5,91 \cdot 10^{-3}$	$9,19 \cdot 10^{-3}$	0,22	$3,51 \cdot 10^{-4}$	$9,58 \cdot 10^{-3}$
Novo-pro D	$3,66 \cdot 10^{-3}$	$5,49 \cdot 10^{-3}$	0,63	$1,06 \cdot 10^{-3}$	$2,30 \cdot 10^{-2}$





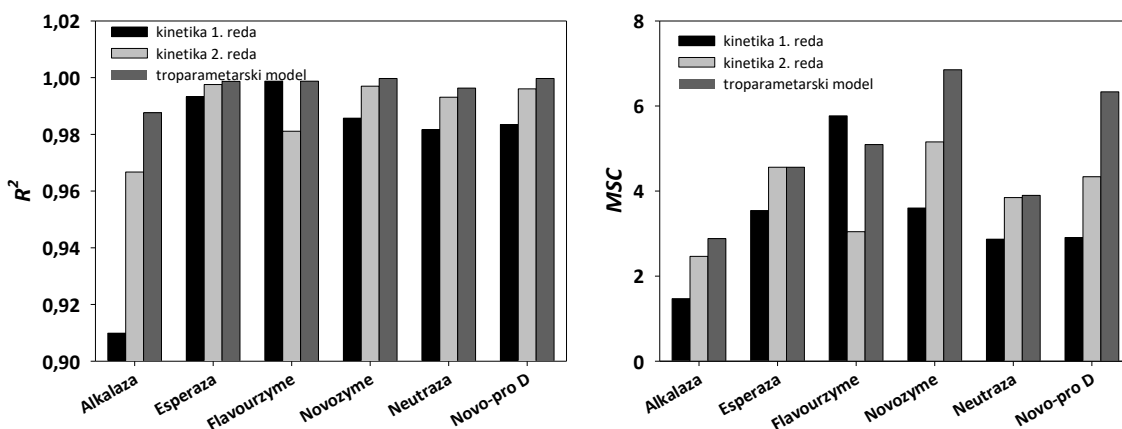
Slika 4.4. Operacijska stabilnost proteaza u radnim uvjetima ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,1\text{ M Tris-HCl pH } 8$)

Pri odabiru modela, jedan od kriterija jest što manji broj parametara, stoga bi kinetika prvog ili drugog reda bile idealne, a uz to je potrebno obratiti pažnju na statističku analizu te uzeti u obzir parametre R^2 i MSC . Vrijednost R^2 se najčešće primjenjuje u statistici u svrhu procjene prilagodbe modela regresijske jednadžbe. Veća vrijednost R^2 označava bolje slaganje s modelom.¹⁸ Vrijednost R^2 je u svih šest slučajeva najveća za troparametarski model. Budući da se R^2 vrijednosti za model drugog reda ne razlikuju mnogo u odnosu na one za troparametarski model, za opisivanje inaktivacije Esperaze, Novozymea, Neutraze i Novo-ProD je prihvatljivija kinetika drugog reda zbog jednostavnosti. Na primjeru Flavourzymea možemo primijetiti da su R^2 vrijednosti jednake za kinetiku prvog reda i za troparametarski model. U tom slučaju je kinetika prvog reda prikladnija, također zbog jednostavnosti. Kao dio programskog paketa *Scientist* vrijednost MSC se koristi za

prihvatanje ili odbacivanje modela.¹⁷ Vrijednosti MSC su u većini slučajeva najviše za troparametarski model, osim u slučaju Flavourzymea, gdje je MSC najviši za kinetiku prvog reda. Za primijetiti je također da su vrijednosti jednake za model drugog reda i troparametarski model u slučaju Esperaze, dok je kod Neutraze MSC za troparametarski model tek malo viši u odnosu na onaj kod modela drugog reda.

Prema grafovima sa *Slike 4.4.* te prema statističkoj analizi prikazanoj na *Slici 4.5.* zaključujemo da se inaktivacija Alkalaze može opisati pomoću troparametarskog modela, inaktivacija Flavourzymea kinetikom prvog reda, dok se eksperimentalni podaci ostalih enzima slažu s kinetikom drugog reda. *Tablica 4.1.* prikazuje vrijednosti konstanti inaktivacije enzima za modele prvog i drugog reda te parametre troparametarskog modela. Općenito vrijedi, što je veća konstanta deaktivacije, enzim brže gubi aktivnost, tj. ima manju stabilnost, stoga je poželjno da te konstante imaju što niže vrijednosti. S obzirom na odgovarajući model i vrijednosti konstanti, primjećujemo da najmanju konstantu deaktivacije ima Esperaza (model drugog reda) ili jedan od dva oblika Alkalaze (prema troparametarskom modelu), dok najveću konstantu deaktivacije ima Novozyme (model drugog reda) ili jedan od dva oblika Alkalaze (troparametarski model).

Statistička analiza modela inaktivacije proteaza prikazana je na *Slici 4.5.*



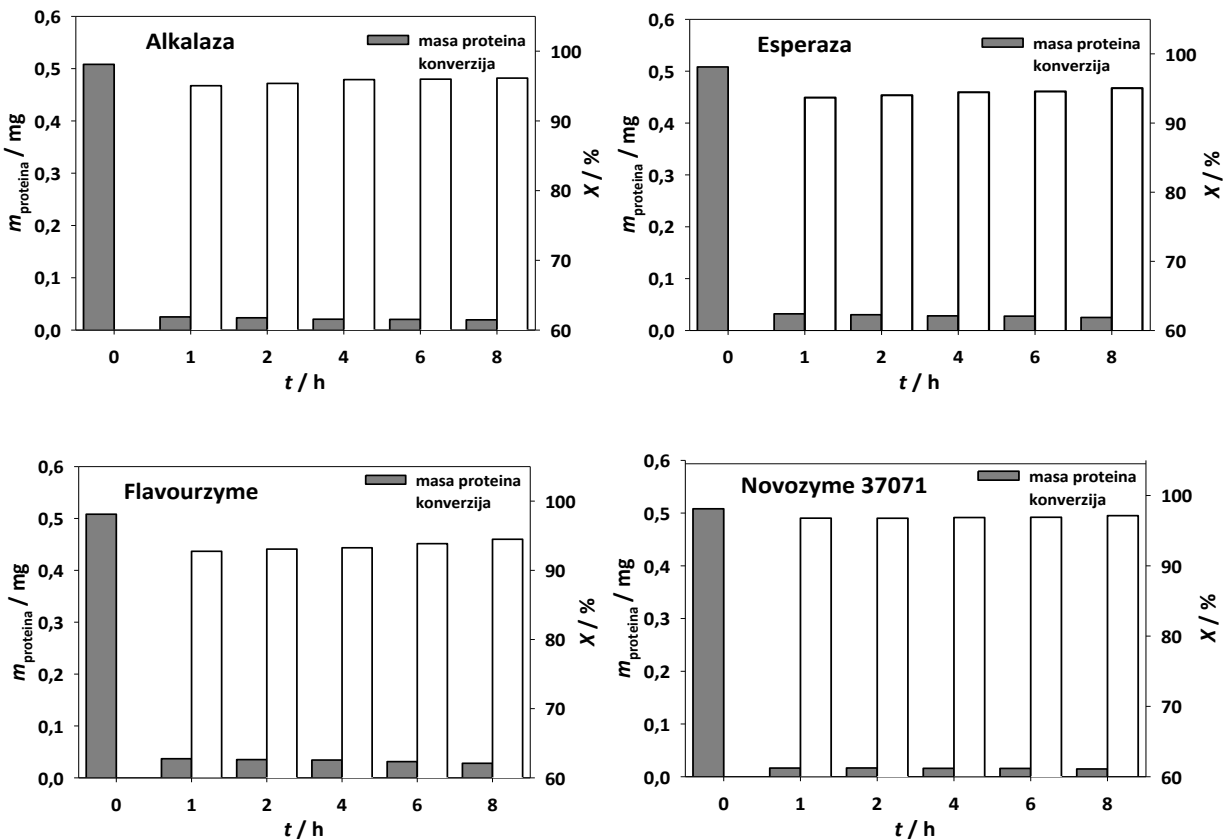
Slika 4.5. Statistička analiza modela inaktivacije proteaza

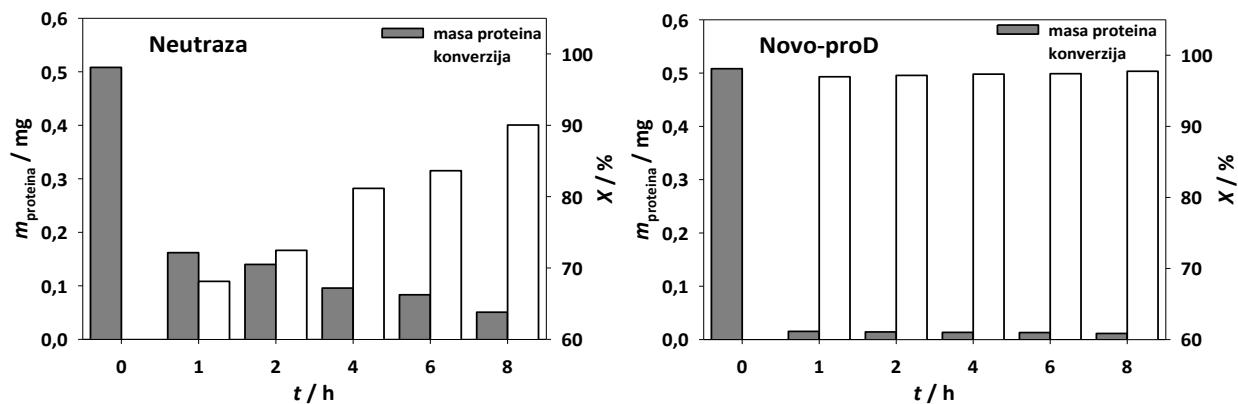
4.3. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru

Hidroliza proteina u ostacima kozica provedena je s dvije različite koncentracije enzima, 5 U / 10 mg i 0,5 U / 10 mg. Pritom je iz supernatanta uzorka određena preostala aktivnost enzima, a iz krutih ostataka kozica određena je koncentracija proteina i konverzija.

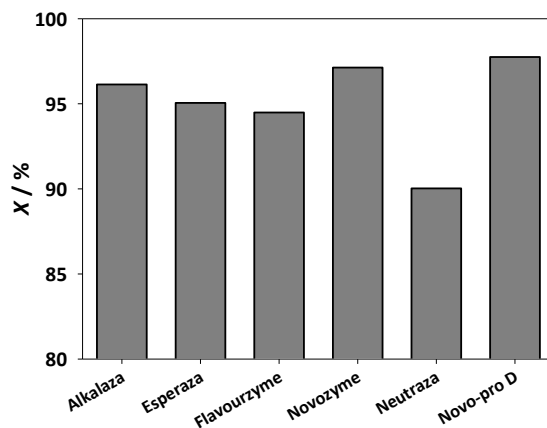
4.3.1. Koncentracija enzima 5 U / 10 mg

Grafovi koji prikazuju mase proteina u ostacima kozica po završetku hidrolize katalizirane proteazama u kotlastom reaktoru, te pritom postignute konverzije nalaze se na *Slici 4.6*.





Slika 4.6. Masa proteina i konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,05\text{ M Tris-HCl pH } 8$, $V_{\text{reaktor}} = 100\text{ }\mu\text{L}$, $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$, $A_{\text{protease}} = 5\text{ U}$).

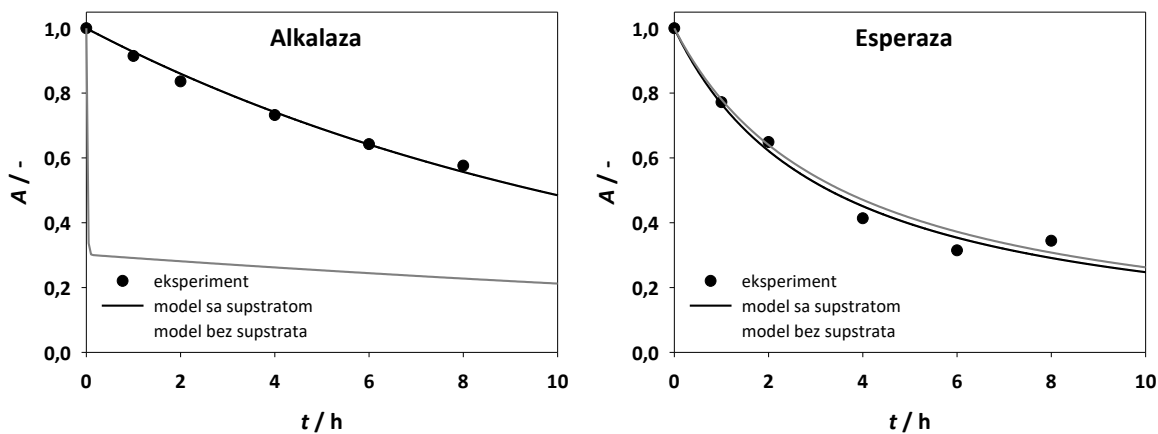


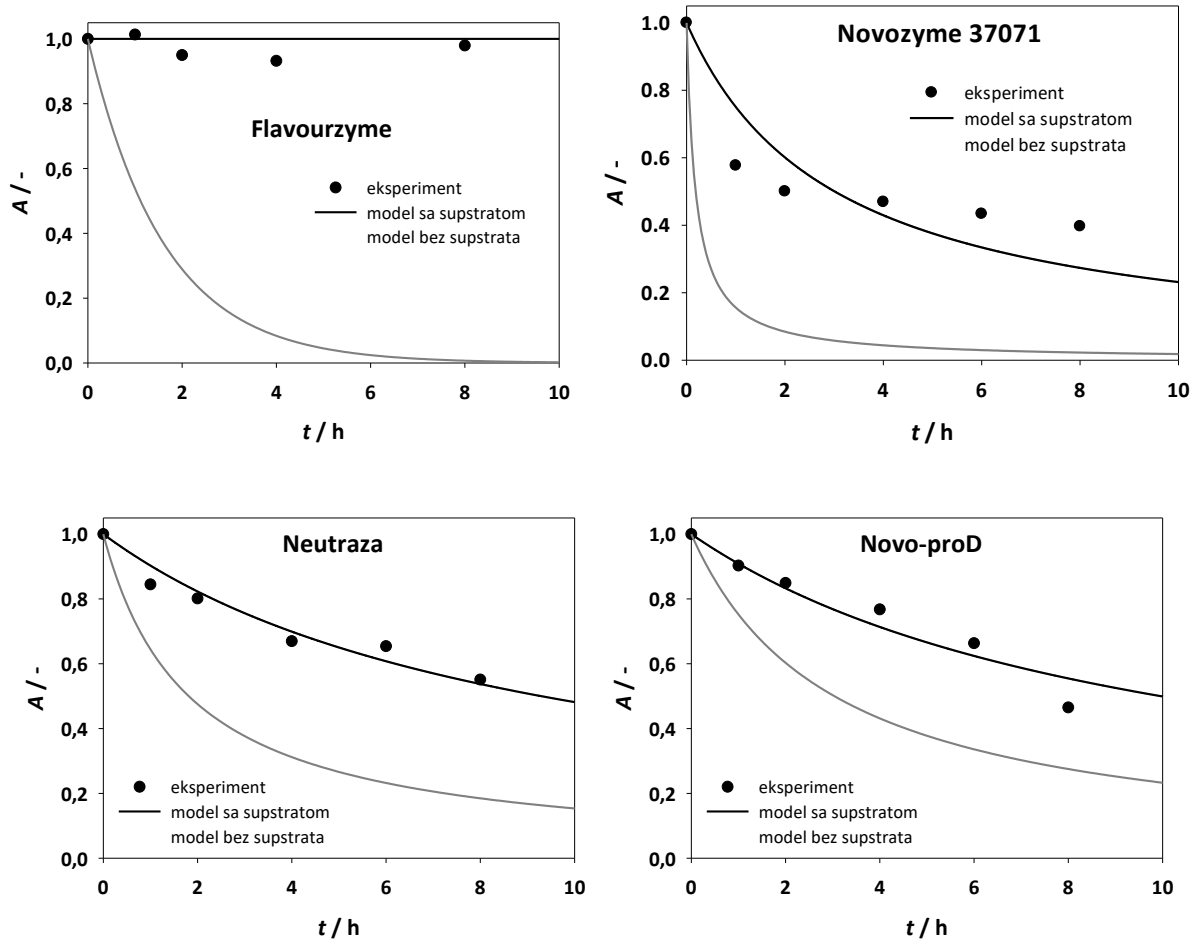
Slika 4.7. Usporedba konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ($t = 8\text{ h}$, $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,05\text{ M Tris-HCl pH } 8$, $V_{\text{reaktor}} = 100\text{ }\mu\text{L}$, $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$, $A_{\text{protease}} = 5\text{ U}$).

Može se primijetiti kako su postignute visoke konverzije kod svih enzima, te u većini slučajeva iznose preko 90% već nakon prvog sata, osim kod Neutrage gdje je nakon osmog sata

postignuta konverzija od 90%. Uz to, vidljivo je kako su mase proteina već u prvom satu pale na manje od 0,05 mg, osim kod Neutraze gdje je u prvom satu masa pala na nešto manje od 0,2 mg te se postupno smanjivala idućih sati, da bi u osmom satu pala na otprilike 0,05 mg. Iako su se svi enzimi pokazali učinkovitima u hidrolizi proteina, uspoređujući visoke konverzije (*Slika 4.7.*) i preostale male mase proteina mogu se izdvojiti Alkalaza, Novozyme i Novo-ProD.

Slika 4.8. prikazuje operacijsku stabilnost enzima, te je prikazan model koji je opisao eksperimentalne podatke dobivene u eksperimentima tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica (model sa supstratom), te model koji je korišten prilikom ispitivanja operacijske stabilnosti enzima opisan u *Poglavlju 4.2.* (model bez supstrata). Može se primijetiti da je kod svih enzima došlo do povećanja stabilnosti osim kod Esperaze kada je enzim bio u dodiru sa supstratom. Razlog leži u činjenici da produkti hidrolize proteina stabiliziraju sami enzim. Kao najstabilniji enzim se u ovim eksperimentima se pokazao Flavourzyme kod kojeg uopće nije uočen pad aktivnosti. Mogući razlog tome je što je ovaj enzim u reakciji korišten bez dodatka pufera odnosno nije razrjeđivan, a također je poznato da proteini kao takvi stabiliziraju enzim. Obzirom da je enzim korišten koncentriran za pretpostaviti je da je koncentracija proteina u tom reaktoru bila najviša.





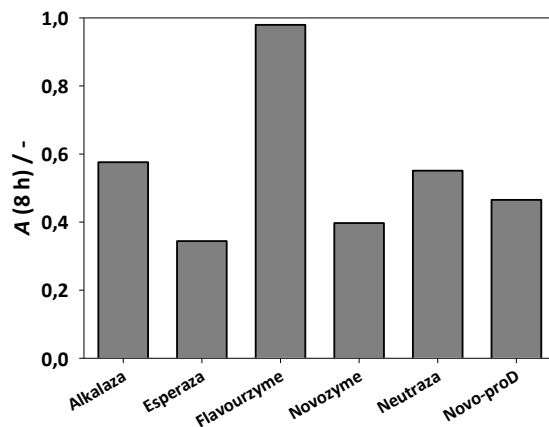
Slika 4.8. Operacijska stabilnost enzima tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,05\text{ M}$ Tris-HCl pH 8, $V_{\text{reaktor}} = 100\text{ }\mu\text{L}$, $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$, $A_{\text{proteaze}} = 5\text{ U}$).

U Tablici 4.2. dan je prikaz procijenjenih parametara za oba modela prikazana na Slici 4.8. Iz navedenih parametara može se također odmah vidjeti da su konstante inaktivacije niže u modelima sa supstratom nego u model bez supstrata, osim za enzim Esperazu za kojega su konstante otprilike jednake za oba slučaja. Iz navedenog se može zaključiti da produkti hidrolize proteina nemaju stabilizacijski učinak na ovaj enzim.

Tablica 4.2. Procijenjeni parametri modela inaktivacije proteaza u radnim uvjetima sa supstratom ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,05\text{ M Tris-HCl pH } 8$, $V_{\text{reaktor}} = 100\text{ }\mu\text{L}$, $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$) i bez supstrata ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,05\text{ M Tris-HCl pH } 8$).

Enzim	Model	Konstante modela	Sa supstratom	Bez supstrata
Alkalaza	Troparametarski model	α	0,70	0,70
		k_{d1}/min^{-1}	$1,57 \cdot 10^{-3}$	0,99
		k_{d2}/min^{-1}	$5,85 \cdot 10^{-4}$	$5,85 \cdot 10^{-4}$
Esperaza	kinetika 2. reda	k_d/min^{-1}	$5,07 \cdot 10^{-3}$	$4,69 \cdot 10^{-3}$
Flavourzyme	kinetika 1. reda	k_d/min^{-1}	0	$1,03 \cdot 10^{-2}$
Novozyme	kinetika 2. reda	k_d/min^{-1}	$5,53 \cdot 10^{-3}$	$9,02 \cdot 10^{-2}$
Neutraza	kinetika 2. reda	k_d/min^{-1}	$1,79 \cdot 10^{-3}$	$9,19 \cdot 10^{-3}$
Novo-pro D	kinetika 2. reda	k_d/min^{-1}	$1,67 \cdot 10^{-3}$	$5,49 \cdot 10^{-3}$

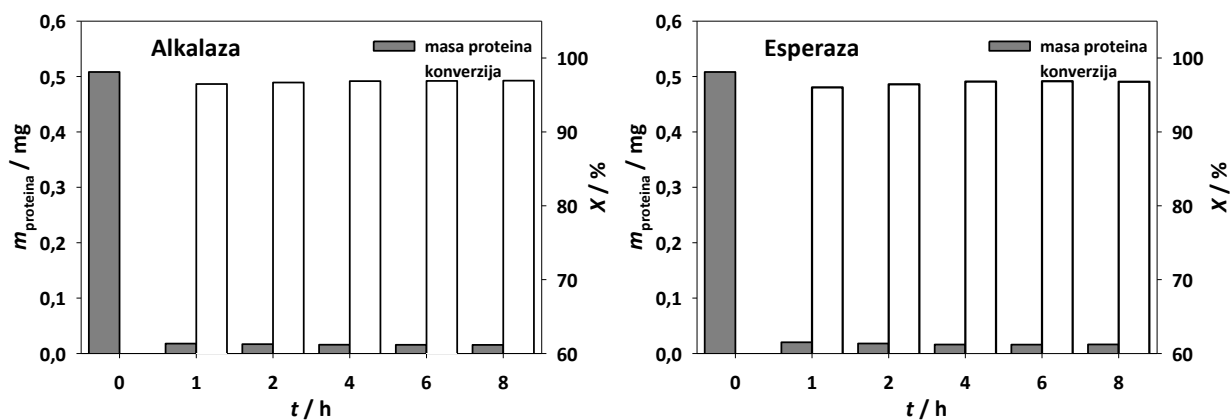
Usporedba preostale aktivnosti enzima nakon hidrolize proteina nalazi se na *Slici 4.9.* te potvrđuje komentare za *Sliku 4.8.*, odnosno, pokazuje da Flavourzyme nakon reakcije od 8 sati i dalje ima najveću aktivnost 100%. Aktivnosti Alkalaze i Neutraze su nešto manje od 60%, slijedi Novo-ProD čija je aktivnost nakon 8 sati pala na polovinu početne vrijednosti. Novozymeu je preostalo oko 40% aktivnosti, dok je Esperaza pokazala najmanju aktivnost nakon 8 sati reakcije.

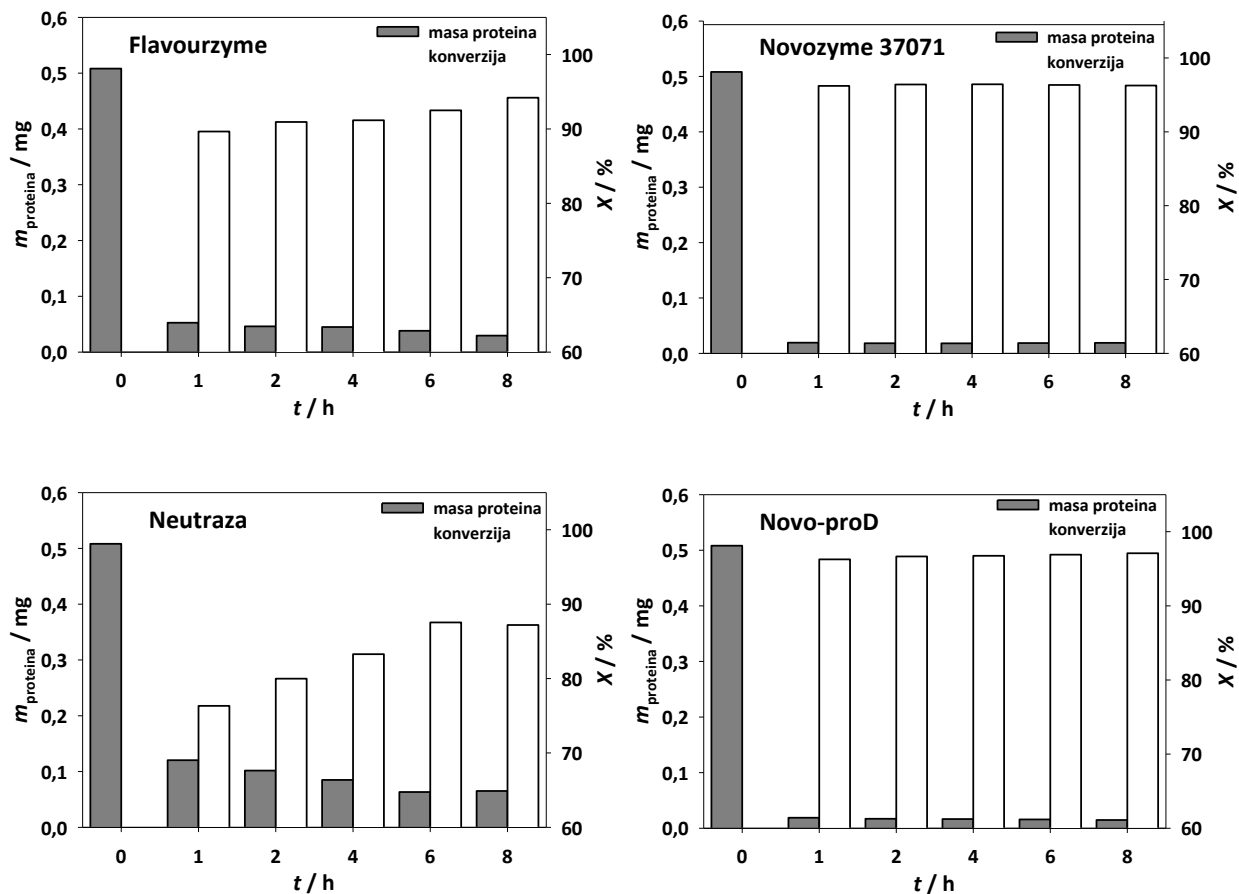


Slika 4.9. Usporedba preostale aktivnosti enzima nakon hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirane proteazama u kotlastom reaktoru ($t = 8$ h, $T = 50$ °C, 0,05 M Tris-HCl pH 8, $V_{\text{reaktor}} = 100$ μ L, $m_{\text{kozica}} = 10$ mg, $A_{\text{proteaze}} = 5$ U).

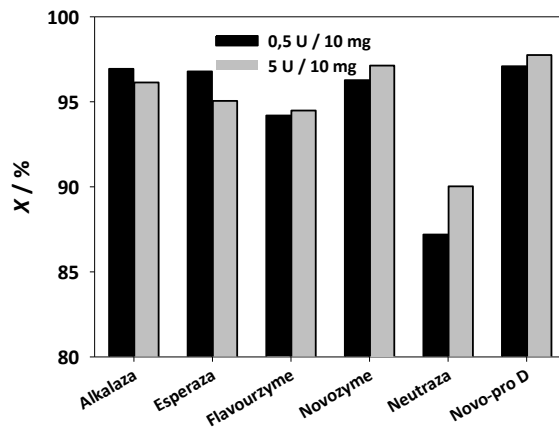
4.3.2. Koncentracija enzima 0,5 U / 10 mg

Grafovi koji prikazuju preostale mase proteina i konverzije nakon provedbe hidrolize s koncentracijom enzima od 0,5 U / 10 mg nalaze se na Slici 4.10.





Slika 4.10. Masa proteina i konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,05 \text{ M Tris-HCl pH } 8$, $V_{\text{reaktor}} = 100 \text{ } \mu\text{L}$, $m_{\text{kozica}} = 10 \text{ mg}$, $A_{\text{protease}} = 0,5 \text{ U}$).

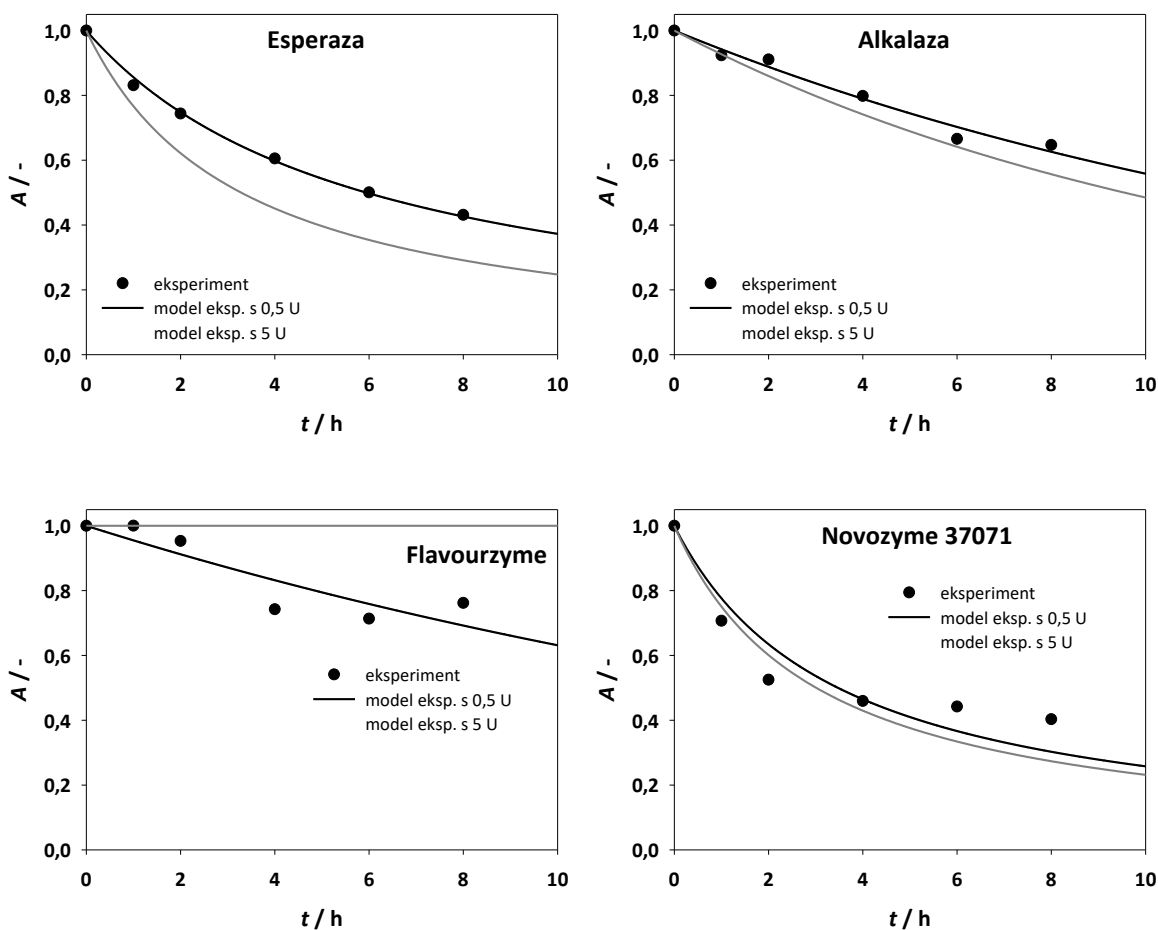


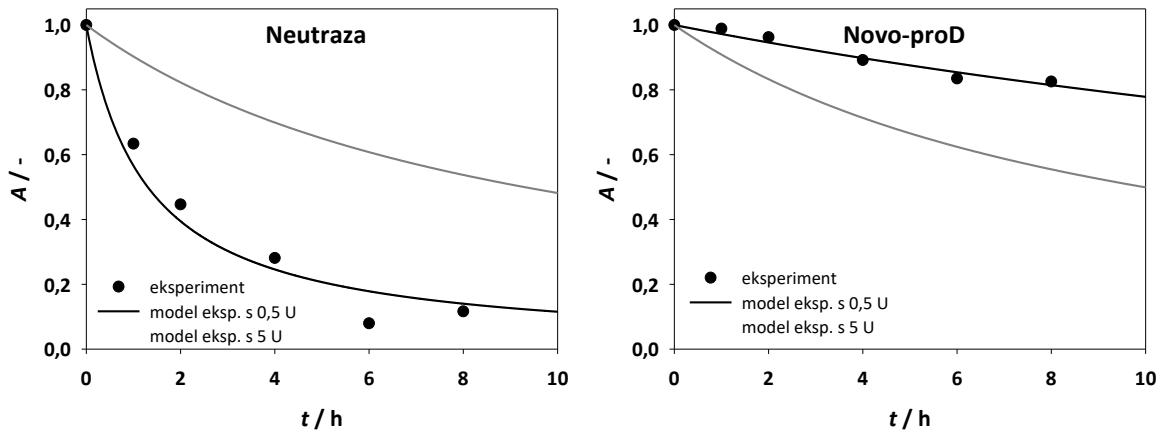
Slika 4.11. Usporedba konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ($t = 8$ h, $T = 50$ °C, 0,05 M Tris-HCl pH 8, $V_{\text{reaktor}} = 100$ μ L, $m_{\text{kozica}} = 10$ mg, $A_{\text{protease}} = 5$ U; 0,5 U).

Prema grafičkim prikazima sa *Slike 4.10.* te njihovom usporedbom s prikazima na *Slici 4.6.* mogu se donijeti određeni zaključci. Općenito gledano, enzimi su pokazali visoku učinkovitost i na 10 puta manjoj koncentraciji. *Slika 4.11.* prikazuje usporedbu konverzija za koncentracije od 0,5 U / 10 mg i 5 U / 10 mg. Novozyme i Novo-ProD su pokazali jednako dobre rezultate s konverzijama preko 95% u oba slučaja. Konverzija do 95% je postignuta u hidrolizi sa Flavourzymeom u oba slučaja. Razlike možemo primijetiti kod enzima Alkalaze i Esperaze koji su na 10 puta manjoj koncentraciji pokazali nešto veću učinkovitost što je suprotno očekivanjima. Značajne razlike vidljive su kod Neutraze (*Slika 4.10.*, *Slika 4.6.*). Po uzoru na ostale slučajeve, za očekivati je podjednaka ili neznatno niža konverzija, no, u ovom slučaju je konverzija pala ispod 90% kod niže koncentracije enzima. Kod većine enzima su već u prvom satu postignute konverzije oko 90% i preko toga, dok se kod Neutraze hidroliza odvijala stupnjevito te je prema tome i rasla konverzija s vremenom. Usporedbom toka reakcija primjećujemo da je u prvom satu pri nižoj koncentraciji enzima postignuta veća konverzija u odnosu na konverziju pri višoj koncentraciji. U oba slučaja je konverzija dalje rasla, ali je kod niže koncentracije enzima dosegla vrhunac već u šestom satu (koji je manji nego kod više koncentracije enzima), te je istu vrijednost imala i nakon osmog sata. Zaključujemo kako pri tim uvjetima nije bilo potrebno voditi reakciju svih 8 sati, budući da je maksimalna konverzija postignuta prije. O takvim stvarima je bitno voditi računa

ukoliko se proces vodi u industrijskom mjerilu, budući da može doprinijeti smanjenoj potrošnji energije.

Operacijska stabilnost pri koncentraciji enzima od 0,5 U / 10 mg prikazana je na grafovima aktivnosti na *Slici 4.12*. Eksperimentalni podatci opisani su modelom, a vrijednosti procijenjenih konstanti inaktivacije dani su *Tablici 4.3*. Također, na *Slici 4.12*. je dana usporedba simulacije pomoću modela za eksperimente proveden s višom koncentracijom enzima (model eksperimenta s 5 U), a koji su prikazani na *Slici 4.8*. Može se zaključiti da su produkti hidrolize proteina iz ljuštura kozica doprinijeli povećanju stabilnosti razrijeđenijih koncentracija slijedećih enzima: Alkalaza, Esperaza, Novozyme i Novo-ProD. Navedeno se može objasniti činjenicom da je 10 x manja količina enzima bila u doticaju s otprilike istom koncentracijom produkta hidrolize jer promjena u konverziji nije bila značajna. Za enzim Neutrazu razrjeđenje je imalo posebno izražen negativan učinak jer je hidroliza u njegovom slučaju najsporija, te je manja koncentracija produkta hidrolize prisutna u njegovom okruženju.





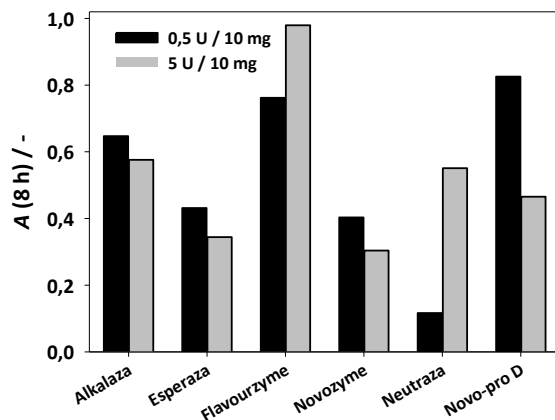
Slika 4.12. Operacijska stabilnost enzima tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,05\text{ M Tris-HCl pH } 8$, $V_{\text{reaktor}} = 100\text{ }\mu\text{L}$, $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$, $A_{\text{protease}} = 0,5\text{ U}$).

Na temelju grafičkih prikaza može se primijetiti kako se eksperimentalni podaci slažu s modelom eksperimenta s $0,5\text{ U}$ uz određena odstupanja, odnosno, rasipanja eksperimentalnih podataka, što je osobito vidljivo kod Flavourzymea i Novozymea. Također, primjećujemo kako najveću aktivnost i nakon 8 sati ima Novo-ProD, čak veću od 80%, dok je aktivnost Neutrage značajno pala već tijekom prvog sata, da bi do kraja provedbe eksperimenta pala na manje od 20% početne aktivnosti. Najmanju vrijednost konstante inaktivacije je procijenjena u eksperimentima uz enzim Novo-ProD što upućuje na njegovu stabilnost, dok Neutraza ima najveću konstantu deaktivacije koja upućuje na nestabilnost enzima.

Tablica 4.3. Procijenjeni parametri troparametarskog modela inaktivacije proteaza u radnim uvjetima sa supstratom ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,05\text{ M Tris-HCl pH } 8$, $A_{\text{protease}} = 0,5\text{ U}$)

Enzim	Model	Konstante modela	Vrijednosti
Alkalaza	Troparametarski model	α	0,70
		k_{d1}/min^{-1}	$1,17 \cdot 10^{-3}$
		k_{d2}/min^{-1}	$5,85 \cdot 10^{-4}$
Esperaza	kinetika 2. reda	k_d/min^{-1}	$2,81 \cdot 10^{-3}$
Flavourzyme	kinetika 1. reda	k_d/min^{-1}	$7,66 \cdot 10^{-4}$
Novozyme	kinetika 2. reda	k_d/min^{-1}	$4,80 \cdot 10^{-3}$
Neutraza	kinetika 2. reda	k_d/min^{-1}	$1,28 \cdot 10^{-2}$
Novo-pro D	kinetika 2. reda	k_d/min^{-1}	$4,74 \cdot 10^{-4}$

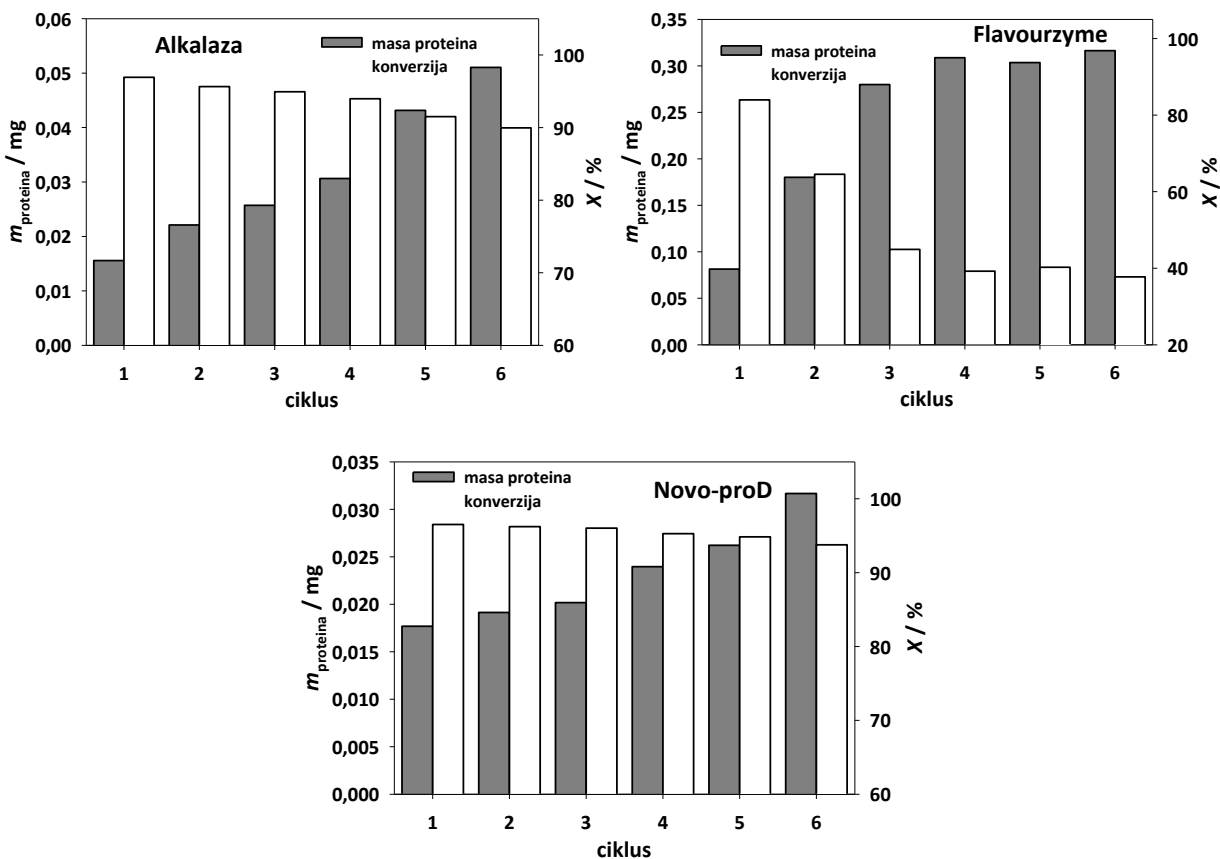
Na *Slici 4.13.* je prikazana usporedba aktivnosti enzima određenih po provedbi hidrolize proteina u ostacima kozica za dvije različite koncentracije enzima. Može se vidjeti kako pri koncentraciji od $5\text{ U} / 10\text{ mg}$ najveću aktivnost pokazuje Flavourzyme, a najmanju Novozyme. Pri nižoj koncentraciji enzima ($0,5\text{ U} / 10\text{ mg}$) najveću aktivnost pokazuje Novo-ProD, a najmanju Neutraza. Na temelju grafova se može zaključiti kako po završetku reakcija veću preostalu aktivnost u većini slučajeva imaju razrijeđeni enzimi. Ukoliko se usporede rezultati sa *Slike 4.13.* s onima sa *Slike 4.11.* na kojima je prikazana usporedba konverzija za različite koncentracije enzima, zaključujemo kako se rezultati podudaraju. Odnosno, enzimi Alkalaza i Esperaza su kod niže koncentracije pokazali veću aktivnost, a uz to je tijekom hidrolize postignuta i veća konverzija. U slučaju Novozymea i Novo-ProD se može primijetiti kako su kod nižih koncentracija enzima zabilježene veće aktivnosti, ali je konverziju ipak nešto viša u slučaju više koncentracije enzima. Navedeni zaključci su bitni za primjenu enzima.



Slika 4.13. Usporedba preostale aktivnosti enzima nakon hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirane proteazama u kotlastom reaktoru ($t = 8$ h, $T = 50$ °C, 0,05 M Tris-HCl pH 8, $V_{\text{reaktor}} = 100$ μ L, $m_{\text{kozica}} = 10$ mg, $A_{\text{protease}} = 0,5$ U; 5 U)

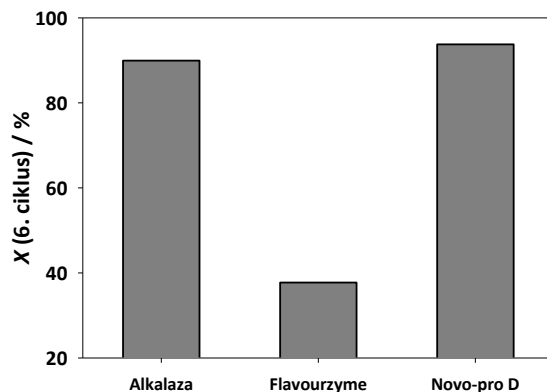
4.4. Hidroliza proteina u ostacima kozica u ponovljivom reaktoru

Svrha provođenja eksperimenata u ponovljivim reaktorima jest ispitivanje učinkovitosti enzima u provedbi hidrolize proteina na način da se po završetku jedne reakcije isti enzim upotrijebi u drugoj reakciji i tako redom. Isti enzim ukupno je upotrijebljen u 6 reaktora, od čega je svaka reakcija trajala po sat vremena. Budući da su po završetku hidrolize proteina Alkalaza, Flavourzyme i Novo-ProD pokazali najveće stabilnosti pri koncentraciji enzima od 0,5 U / 10 mg uz konverziju veću od 90 %, odabrani su za provedbu hidrolize proteina u ponovljivom reaktoru. Grafički prikazi preostalih masa proteina u ostacima kozica, kao i konverzije, prikazane su na *Slici 4.14.*



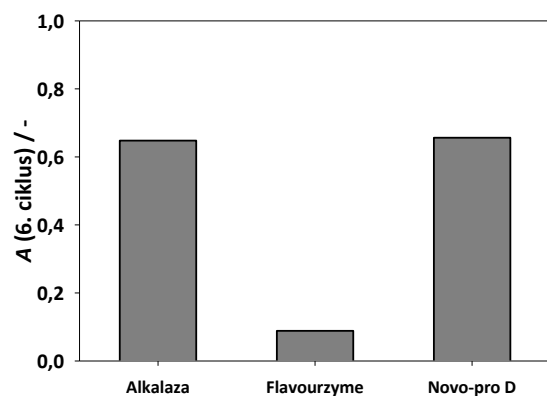
Slika 4.14. Preostala masa proteina i konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama Alkalaza, Flavourzyme i Novo-ProD u kotlastom reaktoru s 6 ciklusa dodavanja supstrata ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,05 \text{ M Tris-HCl pH } 8$, $V_{\text{reaktor}} = 200 \text{ } \mu\text{L}$, $t_{\text{ciklusa}} = 1 \text{ h}$, $m_{\text{kozica}} = 10 \text{ mg}$, $A_{\text{protease}} = 0,5 \text{ U}$)

Prema rezultatima se može zaključiti kako su enzimi pokazali određenu aktivnost tijekom provedbe svih šest ciklusa. Najučinkovitijim se pokazao Novo-ProD koji je i u šestom ciklusu postigao vrlo visoku konverziju od preko 90%. Najmanje učinkovitim može se smatrati Flavourzyme koji je konverziju od oko 90% postigao u prvom ciklusu, dok je od trećeg ciklusa na dalje konverzija iznosila oko 40%. Općenito, konverzije se smanjuju povećanjem broja ciklusa, što je i očekivano, prilikom čega je kod enzima Alkalaze i Novo-ProD primjećen blagi pad, dok je kod Flavourzymea pad dosta izražen. Konverzije utvrđene po završetku šestog ciklusa su prikazane na Slici 4.15.



Slika 4.15. Usporedba konverzija nakon 6. ciklusa hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama Alkalaza, Flavourzyme i Novo-ProD u kotlastom reaktoru ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,05\text{ M Tris-HCl pH } 8$, $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$, $t_{\text{ciklusa}} = 1\text{ h}$, $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$, $A_{\text{proteaze}} = 0,5\text{ U}$)

Slika 4.16. prikazuje preostale aktivnosti enzima utvrđene nakon šestog ciklusa hidrolize proteina. Prema grafovima, enzimi Alkalaza i Novo-ProD su zadržali oko 60% početne aktivnosti, dok je aktivnost Flavourzymea pala na otprilike 10% u odnosu na početnu aktivnost.



Slika 4.16. Usporedba preostale aktivnosti enzima nakon šestog ciklusa hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama Alkalaza, Flavourzyme i Novo-ProD u kotlastom reaktoru ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,05\text{ M Tris-HCl pH } 8$, $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$, $t_{\text{ciklusa}} = 1\text{ h}$, $m_{\text{kozica}} = 10\text{ mg}$, $A_{\text{proteaze}} = 0,5\text{ U}$)

5. ZAKLJUČAK

Ostaci morskih organizama, kao što su ljuske rakova, predstavljaju problem u obliku onečišćenja priobalnih područja prvenstveno zbog velikih količina. Takva vrsta otpada, iako je biološkog podrijetla, nije prikladna za odlaganje na odlagališta biootpada jer sadrži velike količine proteina. Zato je potrebno najprije obraditi takav otpad, po mogućnosti biološkim metodama kako se ne bi stvarao dodatan pritisak na okoliš. U ovom radu je ispitano šest komercijalnih proteaza zbog njihove moguće primjene u tretiranju ostataka morskih organizama. Pritom su utvrđeni optimalni uvjeti za njihov rad, određena operacijska stabilnost, ispitana primjena u hidrolizi proteina iz otpadaka kozica pri različitim koncentracijama enzima te utvrđene konverzije. Osim toga, ispitana je i mogućnost uzastopne primjene istog enzima u reakcijama hidrolize. Na temelju rezultata provedenih eksperimenata mogu se donijeti određeni zaključci:

- Prilikom određivanja optimalnih uvjeta za rad proteaza, pri temperaturi od 40 °C utvrđeno je kako svim korištenim proteazama odgovara alkalna sredina s kompromisnom pH vrijednošću 8. Pri toj pH vrijednosti je određena kompromisna vrijednost temperature od 50 °C. Usporedbom aktivnosti proteaza pri tim uvjetima Novozyme pokazuje najveću aktivnost, što je i za očekivati, jer su to njegovi optimalni uvjeti za rad. Pri tim uvjetima je najmanju aktivnost pokazao Flavourzyme.
- Pri određivanju operacijske stabilnosti kod $T = 50$ °C i $\text{pH} = 8$ utvrđeno je da se kinetika deaktivacije Alkalaze može opisati troparametarskim modelom. Ostali eksperimentalni podaci se također slažu s troparametarskim modelom, ali su na temelju R^2 vrijednosti pokazali gotovo jednako dobro slaganje s jednostavnijim modelima (kinetika prvog reda i kinetika drugog reda) pa je tako deaktivacija Flavourzymea opisana modelom prvog reda, a svi ostali modelom drugog reda.
- Na temelju provedene hidrolize proteina s dvije različite koncentracije enzima utvrđeno je da je i kod niže koncentracije enzima zabilježena gotovo jednako visoka konverzija. Kod obje koncentracije enzima se najveća konverzija postiže u hidrolizi s Novo-ProD. Također, do najvećeg smanjenja mase proteina dolazi unutar prvog sata provedbe hidrolize, osim kod Neutraze gdje se masa proteina smanjuje postupno. Nakon provedbe hidrolize su izmjerene aktivnosti enzima na temelju čega je utvrđeno da je u slučaju određenih enzima

(Alkalaza, Esperaza, Novozyme, Novo-ProD) pri nižoj koncentraciji enzima prisutna veća stabilnost.

- Hidrolizom proteina u ponovljivom reaktoru utvrđeno je da se određeni enzimi mogu koristiti u provedbi reakcija hidrolize na način da se po završetku jedne reakcije enzim prenese u drugi reaktor čime započne nova reakcija i tako redom. Najučinkovitijim se pokazao Novo-ProD koji postiže konverziju preko 90% čak i u šestom ciklusu, Alkalaza pokazuje gotovo jednako dobre rezultate, dok se Flavourzyme pokazao najlošijim odabirom. Ovakve rezultate potvrđuje i aktivnost određena nakon šestog ciklusa prilikom čega su Alkalaza i Novo-ProD zadržali oko 60% početne aktivnosti, dok je aktivnost Flavourzymea pala na oko 10% početne vrijednosti.

Prikazani rezultati pokazuju da se svi od navedenih enzima mogu koristiti u hidrolizi proteina iz otpada rakova. Pritom se najučinkovitijim pokazao Novo-ProD. Tome svakako doprinosi činjenica da se i kod nižih koncentracija enzima ostvaruju gotovo jednako dobri rezultati što donosi uštede prilikom provedbe u većem mjerilu. Također, u nekim je slučajevima u prvim satima zabilježena visoka konverzija koja je u daljnjim satima neznatno rasla. U takvim je procesima poželjno skratiti vrijeme provedbe što ukazuje na uštede u smislu potrošnje energije. Eksperimenti u ponovljivom reaktoru su pokazali obećavajuće rezultate s obzirom na visoke konverzije čak i nakon nekoliko ciklusa, kao i na aktivnost po završetku zadnjeg ciklusa, što ukazuje na mogućnost višekratnog korištenja istog enzima. Stoga, biološka metoda obrade otpada ovakve vrste pokazuje veliki potencijal za koji je potrebno provesti detaljnija istraživanja te ispitati mogućnost prebacivanja u veće mjerilo.

6. LITERATURA

1. Bugg, T. DH, *Enzymes: General Properties*, University of Warwick, Coventry, UK
2. Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A., Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods, *Food Technol. Biotechnol.* 51(2013) 12–25.
3. Findrik Blažević, Z., *Bioreakcijska tehnika I*, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2013).
4. Li, Q., Yi, L., Marek, P., Iverson, B.L., Commercial proteases: Present and future, *FEBS Lett.* 587 (2012) 1155-1163.
5. https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Proteases.pdf (28.08.2021.)
6. <https://biosolutions.novozymes.com/en/animal-protein/products/flavourzyme> (28.08.2021.)
7. https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Product_range_Pharma.pdf (28.08.2021.)
8. <https://biosolutions.novozymes.com/en/animal-protein/products/novo-pro-d> (28.08.2021.)
9. Einbu, A., Vårum K. M., Characterization of chitin and its hydrolysis to GlcNAc and GlcN, *Biomacromolecules*, 9 (2008) 1870–1875.
10. Daraghme, N. H., Chowdhry B. Z., Leharne, S. A., Al Omari, M. M., Badwan, A. A., Chitin, Chapter 2
11. Poshina, D. N., Raik, S. V., Poshin, A. N., Skorik, Y. A., Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review, S0141-3910(18)30285-4, Accepted Manuscript
12. Goodrich, J. D., Winter, W. T., α -Chitin nanocrystals prepared from shrimp shells and their specific surface area measurement, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 252–257
13. Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., Jensen, I. J., Protein Determination-Method Matters, *Foods*, 7(1) (2018) 5.

14. 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.
15. <https://hr.earnmoneyfromhometoday.com/least-squares-method-definition> (26.08.2021.)
16. <https://sites.google.com/site/linearnoprogramiranje1/teorija-linearnog-programiranja/metode-rjesavanja-lp/simpleks-metoda> (26.08.2021.)
17. http://www.turkupetcentre.net/petanalysis/model_aic.html (26. 08. 2021.)
18. <https://hr.eferrit.com/linearna-regresijska-analiza/-regresijska-analiza/> (28.08.2021.)

7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli

A - aktivnost enzima

A_0 - početna aktivnost enzima

A_t - aktivnost enzima nakon vremena t

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

α - parametar koji označava udio jednog ili drugog oblika enzima

d - promjer kivete

Da - dalton, unificirana atomska jedinica mase

E_a - energija aktivacije [J/mol]

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

ε_{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}]

λ – valna duljina [nm]

m_{proteina} - masa proteina [mg]

m_{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_{reaktor} - volumen reaktora [μL]

Kratice

ABS - apsorbancija

AMP - adenzin monofosfat

ATP - adenzin trifosfat

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

E - enzim

ES - kompleks enzim-supstrat

EP - kompleks enzim-produkt

FDA - Američka agencija za hranu i lijekove

HCl - klorovodična kiselina

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

NaOH - natrijev hidroksid

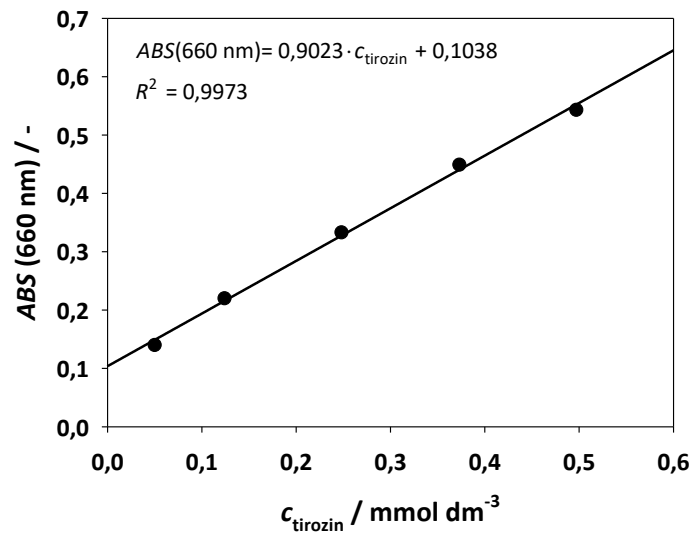
NaCl - natrijev klorid

P - produkt

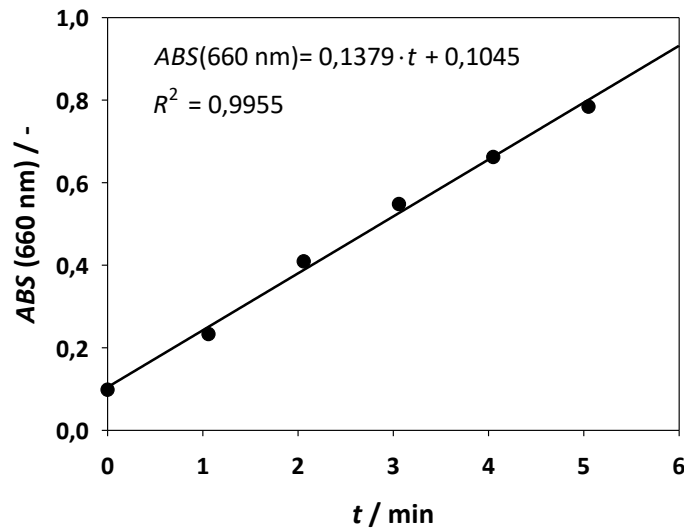
S - supstrat

TCA - trikloroetna kiselina

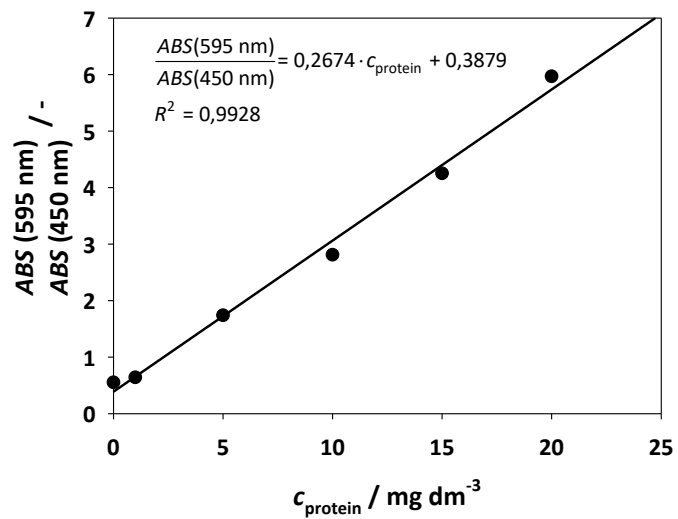
8. PRILOZI



Slika 8.1. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije tirozina



Slika 8.2. Primjer rezultata mjerenja aktivnosti proteaze



Slika 8.3. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije proteina

9. ŽIVOTOPIS

Petra Bingula [REDACTED] Godine 2010.

završava Osnovnu školu Ante Kovačića u Zlataru te iste godine upisuje gimnaziju u Srednjoj školi Zlatar. Po završetku srednje škole, godine 2014. upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, smjer Primijenjena kemija. Tijekom preddiplomskog studija odrađuje stručnu praksu u Končar Institutu za elektrotehniku u fizikalno kemijskom laboratoriju. Preddiplomski studij završava 2019. godine obranom završnog rada pod nazivom „Vektorski prostori“, te iste godine upisuje diplomski studij Ekoinženjerstva na istom fakultetu.