

Priprema biokatalizatora

Vrus, Lea

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:149:002930>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lea Vrus

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Lea Vrus

Predala je izrađen završni rad dana: 11. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

doc. dr. sc. Martina Sudar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Monika Šabić Runjavec, znanstvena suradnica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 14. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lea Vrus

Priprema biokatalizatora

ZAVRŠNI RAD

Mentorica: doc. dr. sc. Martina Sudar

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Martina Sudar

doc. dr. sc. Anita Šalić

dr. sc. Monika Šabić Runjavec

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
(zamjena)

Zagreb, rujan 2023.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Martini Sudar na pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, Snježani i Branimiru, na mogućnostima koje su mi pružili i na podršci koja me dovela ovdje.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama FKIT-ovcima na pomoći i suradnji, te posebno kolegi Štrmelju na ogromnoj podršci kroz ove godine.

Za kraj, zahvaljujem se sebi što nisam odustala od ostvarivanja svojih ciljeva.

SAŽETAK

Biokatalizatori, enzimi, se koriste za ubrzavanje biokemijskih reakcija u živim organizmima. Upotrebljavaju se u velikom rasponu industrija, poput farmaceutske, agrokemijske, prehrambene te u raznim znanstvenim granama. Zahvaljujući toj industrijskoj važnosti biokatalizatora razvijene su razne metode njihove pripreme. Mikrobna fermentacija, kultura biljnih i životinjskih stanica, uz DNK rekombinantnu tehnologiju omogućuju olakšanu sintezu specifičnih enzima. Krajnji produkt, biokatalizator, dobiva se tek nakon pročišćavanja koje uključuje izolaciju enzima iz žive stanice i daljnje postupke poput centrifugiranja i isoljavanja. Tako izolirani enzim podvrgava se metodama poput gel elektroforeze i kromatografije kako bi se uklonili svi neželjeni produkti.

ABSTRACT

Biocatalysts, enzymes, are used to accelerate biochemical reactions in living organisms. They are used in a wide range of industries, such as pharmaceutical, agrochemical, food and in various scientific branches. Thanks to this industrial importance of biocatalysts, various methods of their preparation have been developed. Microbial fermentation, the culture of plant and animal cells, along with DNA recombinant technology enable an easier synthesis of specific enzymes. The final product, the biocatalyst, is obtained after purification, which includes the isolation of the enzyme from the living cell and further procedures such as centrifugation and salting out. The isolated enzyme is then subjected to methods such as gel electrophoresis and chromatography in order to remove all unwanted products.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 2 |
| 2.1 Katalizatori..... | 2 |
| 2.1.1 Povijest katalize i katalizatora..... | 2 |
| 2.1.2 Podjela i svojstva katalizatora | 3 |
| 2.2 BOKATALIZATORI | 4 |
| 2.2.1 Povijest biokatalizatora | 4 |
| 2.2.2. Podjela i nomenklatura biokatalizatora | 5 |
| 2.2.3. Struktura biokatalizatora | 6 |
| 2.2.4. Razlike katalizatora i biokatalizatora | 10 |
| 2.2.5 Proces biokatalize | 12 |
| 2.2.6. Imobilizacija | 14 |
| 2.2.7 Industrijski značaj biokatalizatora..... | 16 |
| 3. PREGLEDNI DIO | 17 |
| 3. 1 Priprema biokatalizatora | 17 |
| 3.1.1 Uvod | 17 |
| 3.1.2 Mikrobna fermentacija | 17 |
| 3.1.3 Kultura biljnih stanica | 20 |
| 3.1.4 Kultura životinjskih stanica | 22 |
| 3.1.5 Industrijski uspjesi..... | 24 |
| 3.2. DNK rekombinantna tehnologija..... | 24 |
| 3.2.1. Uvod | 24 |
| 3.2.2. Proces | 27 |
| 3.2.3. Industrijsko gledište..... | 30 |
| 3.3. Metode pročišćavanja proteina | 30 |
| 3.3.1. Uvod | 30 |
| 3.3.2. Metode izolacije | 31 |
| 3.3.3. Isoljavanje | 31 |
| 3.3.4. Ostale metode izolacije..... | 32 |
| 3.3.5. Gel elektroforeza..... | 32 |
| 3.3.7. Kromatografija | 34 |
| 4. ZAKLJUČAK | 36 |
| 5. POPIS LITERATURE..... | 37 |
| 6. ŽIVOTOPIS..... | 43 |

1. UVOD

Kataliza je proces kojeg pokreće mala količina tvari, poznata kao katalizatori. Oni usmjeravaju i ubrzavaju reakciju bez vlastite promjene te ne postaju dio produkta (Zrnčević, 2003). Koristi se svakodnevno u kemijskoj i biokemijskoj industriji, a izuzetno je bitan proces i u živim bićima. Uključuje korištenje tvari koje same po sebi ne sudjeluju u reakciji i nisu dio produkta, već iz nje izlaze nepromijenjeni. Ovisno o cilju reakcije koriste se različite vrste katalize. Ona o kojoj najčešće govorimo jest pozitivna kataliza ili ubrzavanje kemijske reakcije. Međutim, postoji i negativna kataliza, usporavanje reakcije, u kojoj se koriste inhibitori. Ukoliko je potrebna kataliza za specifičnu reakciju govorimo o selektivnoj katalizi, a ukoliko produkt nastao u reakciji preuzme ulogu katalizatora, o autokatalizi. Podijelimo li ih ovisno o agregatnim stanjima postoje heterogene, homogene i enzimске katalize. U heterogenim katalizama katalizator i reaktant nisu u istom agregatnom stanju, u homogenim katalizama jesu. Enzimске katalize uključuju enzime, tvari velike molekulske mase, učesnici su istih agregatskih stanja, a odvijaju se pojave karakteristične za heterogenu katalizu (Bender i sur.,1984).

Katalizatori su, kao što je prije spomenuto, tvari koje ubrzavaju kemijske reakcije, a iz njih izlaze kvantitativno i kvalitativno nepromijenjeni. Bitno je napomenuti kako katalizatori mogu ubrzavati isključivo termodinamički moguće reakcije. Glavni razlozi povećanog/konstantnog korištenja katalizatora su smanjena emisija u okoliš i manji proizvodni troškovi te njihova sposobnost da usmjere reakciju prema željenom produktu (selektivnost). Zbog svojih svojstava katalizatori su postali bitna stavka kemijskih reakcija. Oni pospješuju enantioselektivne procese, stabilni su, toleriraju funkcionalne skupine, nisu im potrebni ligandi i ekonomički su veoma prihvatljivi (Deutschmann i sur.,2011).

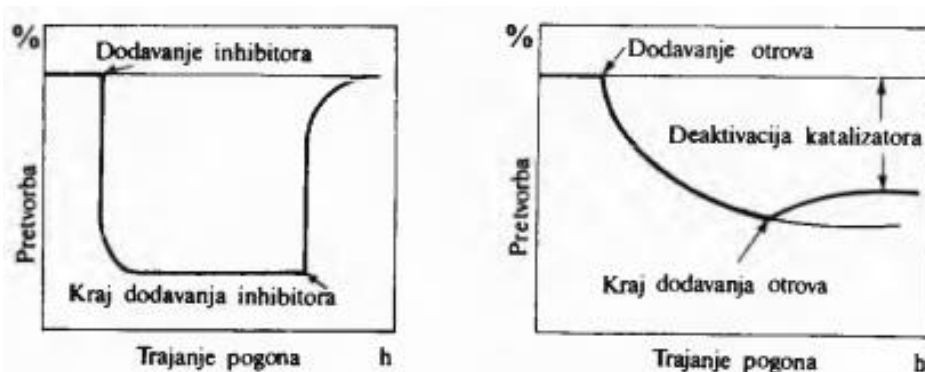
Biokatalizatori su katalizatori biokemijskih reakcija, to jest onih u živim organizmima. Pod biokatalizatorima smatramo enzime, hormone i vitamine koji se nalaze u tijelu u malim količinama. Iako su uloge katalizatora i biokatalizatora iste, reakcije koje ubrzavaju provode se pod drugačijim uvjetima. Iako je sinteza biokatalizatora moguća in vitro, ona nije isplativa i pouzdana te se ne prakticira (Held i sur., 2000.). U ovom radu bit će opisani različiti načini pripreme biokatalizatora za korištenje u daljnjim procesima.

2. OPĆI DIO

2.1 Katalizatori

2.1.1 Povijest katalize i katalizatora

Priča o katalizatorima kreće od davnina kada se nije znalo o kakvoj se tvari radi, kroz povijest, do danas kada se veliki postotak kemijskih procesa izvodi uz katalizatore (Zrnčević, 2003). Kataliza se kroz povijest koristila u mnogim granama naših života i puno prije nego je bila objašnjena. Povijesno se prvo pojavljuje u neolitiku. Tadašnje korištenje enzima bilo je u potpunosti slučajno. Tijekom tog razdoblja najbitniji je bio pronalazak hrane, međutim nesvjesnim korištenjem mikroba i njihovih enzima hrana je imala bolji okus i duže je ostajala sačuvana (Drauz i sur., 2012). Slijedilo je razdoblje antike u kojem su se enzimi koristili za procese fermentacije odnosno proizvodnju octa, vina i piva. Nadalje, smatra se da su se u to doba enzimi koristili i kao pomoć pri probavnim problemima. Njihovo korištenje nastavilo se u srednjem vijeku s potragom za „eliksirom života“. Vjerovalo se da ista tvar može i pomoći zdravlju te osigurati dug život i neplemenite metale pretvarati u zlato. Prva reakcija u kojoj je enzim korišten s namjerom (1525.) bila je reakcija dobivanja etera dehidracijom vinskog špirita pod utjecajem sumporne kiseline. Ta je reakcija dovela do ponovnog pokušaja definicije katalizatora i katalize. Prestley je 1782. provođenjem reakcije dehidracije alkohola kroz užarenu glinenu cijev otkrio heterogenu katalizu, a nakon njega uslijedila su još brojna otkrića različitih katalizatora. Sir Humphry Davy je 1817. godine izučavao zapaljivost gorivih plinova u zraku u prisutnosti različitih metala te ih je poredao po katalitičkoj djelotvornosti: $Ir > Pt > Pd > Ni, Zn, Cu, Ag, Au$ i time pokazao njihovu selektivnu djelotvornost (Bach-Drăgutinović, 2018). S vremenom je otkriveno da neke tvari koje iz reakcija izlaze ne promijenjene (katalizatori) pospješuju određene reakcije, no Michael Faraday je 1834. otkrio da se te tvari mogu i deaktivirati, povratno i nepovratno. Do deaktivacije dolazi korištenjem katalitičkih otrova (Zrnčević i Gomzi, 1982.). Povratna deaktivacija omogućuje regeneriranje katalizatora, dok nepovratna uzrokuje trovanje (Fuderer, 1967) (slika 1.). Uz otrove, reakciju mogu usporiti i inhibitori. Utjecaj inhibitora i otrova prikazan je na slici 1 (Bach-Drăgutinović, 2018).



Slika 1. Povratna deaktivacija (slika 1.- lijevo) omogućuje regeneriranje katalizatora, dok nepovratna (slika 1.- desno) uzrokuje trovanje (Fuderer, 1967)

Prvu definiciju katalize i katalizatora iznio je Jöns Jacob Berzelius, „otac katalize“. Smatrao je kako se u tim reakcijama razvija velika sila koju je prema grčkom kataliein, rastvarati, nazvao katalitičkom silom, a reakcije katalitičkim. Pojavu katalize kroz godine definiralo je još troje znanstvenika, Ostwald (1903.), Bredig (1909.) i Mitasch (1933.). Ostwald je smatrao da dolazi do promjene brzine reakcije za koju su zaslužni katalizatori koji se u istoj ne mijenjaju. Bredig je smatrao da se katalizatori u reakcijama ipak mijenjaju, ali u toliko maloj mjeri da su stehiometrijski nezapaženi naspram produkata. Mitasch je katalizu smatrao pojavom ubrzavanja reakcija, a ujedno i njihovih usmjeravanja prema stvaranju željenih produkata. Za to su zaslužni katalizatori, ali oni sami nisu potrebni u stvaranju tih produkata (Bach-Dragutinović, 2018).

2.1.2 Podjela i svojstva katalizatora

Tijekom godina otkrivene su različite vrste katalizatora koje su podijeljene u kategorije. Dijelimo ih s obzirom na fizičko stanje, kemijski sastav, prirodu katalize i s obzirom na način djelovanja. Podjela s obzirom na fizičko stanje direktno je povezana sa podjelom po prirodi katalize. Katalizatori se mogu pojaviti u stanju plina, tekućine ili krutine, a ovisno o tome koju tvar kataliziraju dolazi do homogene ili heterogene katalize (Kara & Liese, 2019). Heterogena kataliza je najkorištenija vrsta katalize, a danas je baza mnogobrojnih industrijskih procesa, poput polimerizacija, proizvodnje lijekova, hrane i drugo (Védrine, 2017). Obzirom na kemijski sastav razlikujemo anorganske katalizatore od kojih su najčešći plinovi, metali i njihovi oksidi, sulfidi i anorganske kiseline, te organske u koje spadaju organske kiseline i enzimi (Bond i sur., 2006). Korištenje pojedinih katalizatora ovisi o tvari koja se katalizira, primjerice, oksidi se koriste pri oksidaciji. Upravo to dovelo je do ideje da postoji kompatibilnost između tvari koja

se katalizira i njenog katalizatora (Védrine, 2017). Ukoliko govorimo o načinu djelovanja onda su to kiselo-bazne katalize, elektrokatalize, fotokatalize, enzimске i slično. Iako su katalizatori ovisno o svojim podjelama vrlo drugačiji, njihova osnovna svojstva su ista. U većini definicija, katalizatori se prikazuju kao ubrzivači reakcija, međutim jedna od bitnijih uloga im je i sprječavanje stvaranja nepoželjnih nusprodukata zbog njihove selektivnosti (Twigg, 1989). Ubrzavanjem reakcija postiže se mogućnost provođenja onih reakcija koje bi zbog svoje male brzine inače bile neprovedive, a također se ukazuje i mogućnost ekonomičnog provođenja tih reakcija radi većih iskorištenja (Fuderer, 1967). Katalizatori ne pomiču ravnotežu kemijske reakcije i omogućuju rad pri blažim uvjetima kao što su niži tlak i temperatura. Kako bi se katalizator uspješno koristio u industriji mora zadovoljiti niz uvjeta. Treba imati visoku aktivnost, selektivnost i dugi vijek (Kara & Liese, 2019). Selektivnost označava mogućnost katalizatora da preusmjeri reakciju k stvaranju određenog produkta ili većeg postotka tog produkta. Aktivnost pak ukazuje na brzinu reakcije u prisustvu katalizatora (Berg i sur., 2013). Uz to, katalizatori su niske cijene, moguća je njihova reaktivacija, stabilnost pri što većem rasponu određenih uvjeta i tako dalje (Bach-Drăgutinović, 2018). Bitno je nadodati da će katalizatori ubrzavati samo one reakcije koje su termodinamički moguće (Bond i sur., 2006).

2.2 BOKATALIZATORI

Biokatalizatori ili enzimi su zapravo globularni proteini organizirani u četiri strukturalna nivoa. To su organske makromolekule koje nastaju u živim stanicama te su esencijalne za procese u živim bićima (Berg i sur., 2013).

2.2.1 Povijest biokatalizatora

Povijest biokatalizatora podudara se s onom katalizatora u ranije doba. 1811. godine Kirchoff pokušava objasniti enzimске reakcije i svojstva enzima, a već 1838. Berzelius je razvio teoriju biokatalize (enzimске katalize). Enzimi su svoje ime dobili od grčke riječi “en-zyme” što znači “u kvascu”. Ekstrakcijom prvog enzima iz žive stanice (Büchner) dokazano je da ova vrsta katalizatora zadržava svoje katalitičko djelovanje i van žive stanice. 1926. godine je Sumner uspješno izolirao prvi potpuno čisti enzim te dokazao da je on po strukturi i kemijskom sastavu protein. Istraživanja i razvoj biokatalize počinju 1968. godine prvo sintezom enzima te su i dan danas u punom jeku (Heckmann, i Paradisi, 2020). Tada su ipak bili drugi izbor pri katalizama zbog svojih nedostataka. Velik broj tadašnjih enzima nije bio dostupan u dovoljnoj količini za industrijske procese (Reetz, 2013). Mogli su se koristiti za katalizu jako malog raspona

supstrata, nisu bili stabilni pod uvjetima sinteze, pokazivali su slabu aktivnost pri korištenju niskih koncentriranih supstrata i otopina produkata što je sve dovelo do lošijih rezultata (Drauz i sur., 2012). Međutim, zahvaljujući razvitku DNK rekombinantne tehnologije i ekstenzivnim istraživanjima, danas se proizvode čisti, vrlo specifični enzimi u velikim količinama koji se koriste u velikom broju reakcija, pogotovo u industriji (Zhu i sur., 2011).

2.2.2. Podjela i nomenklatura biokatalizatora

Biokatalizatori mogu biti hormoni, vitamini, ali u većini slučajeva su enzimi. Dijelimo ih prema biokemijskim svojstvima (Tablica 1).

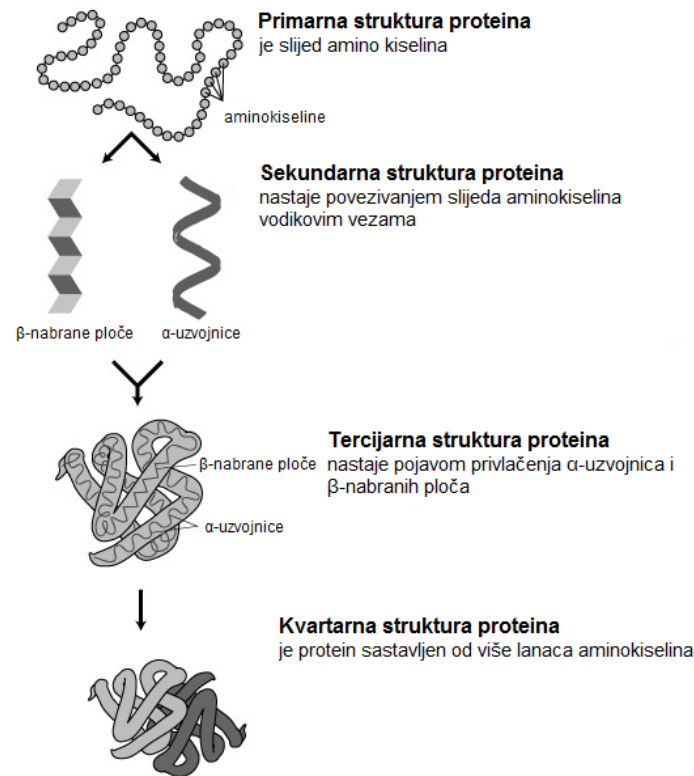
Tablica 1. Podjela biokatalizatora prema biokemijskim svojstvima (Castro i sur., 2012.).

| | <i>Podjela</i> | <i>Biokemijska svojstva</i> |
|----|------------------------|--|
| 1. | <i>oksidoreduktaze</i> | <i>Oksidacija i redukcija supstrata: prijenos atoma vodika sa supstrata kofaktoru ili kisiku, adicija vodika na supstrat</i> |
| 2. | <i>transferaze</i> | <i>Prijenos funkcionalne skupine između molekula donora i akceptora. Kinaze su specifične transferaze koje reguliraju metabolizam prenošenjem fosfata iz ATP-a na druge molekule</i> |
| 3. | <i>hidrolaze</i> | <i>Ireverzibilna hidroliza supstrata: glikozidne, peptidne ili esterske veze</i> |
| 4. | <i>liaze</i> | <i>Reakcije eliminacije i adicije vode, amonijaka ili ugljičnog dioksida na dvostruku vezu, uklanjanje navedenih molekula nastajanje dvostruke veze</i> |
| 5. | <i>izomeraze</i> | <i>Uzrokuju različite vrste izomerizacije: konverzija L- i D-izomera, reakcije mutaze (pomaci kemijskih skupina) i dr.</i> |
| 6. | <i>ligaze</i> | <i>Kataliziraju reakcije u kojima se dvije skupine udružuju pomoću energije iz ATP-a</i> |
| 7. | <i>translokaze</i> | <i>Kataliziraju izmjenu iona i molekula preko membrana ili njihovo razdvajanje unutar membrana</i> |

Enzimi dobivaju svoje ime po reakciji koju kataliziraju uz dodatak nastavka -aza. Primjerice, za reakciju redukcije, enzim je reduktaza. Drugi način raspoznavanja enzima je po njihovom EC broju. EC broj ili komisijski broj enzima, sastoji se od četiri broja koji dodatno specificiraju enzim korišten za određenu reakciju. Prvi broj ukazuje na reakciju koja se katalizira, drugi (podklasa) ukazuje na tvar koja podilazi katalizi, treći (pod-podklasa) daje dodatnu specifičnost reakciji, a četvrti je serijski broj koji služi za identifikaciju enzima u podklasi (Tipton & McDonald, 2018).

2.2.3. Struktura biokatalizatora

Enzimi su proteini organizirani 4 strukturalna nivoa (slika 2.). Imaju veliku molekularnu masu te se sastoje od 20 aminokiselina koje su glavni građevni blok proteina (Sanvictores & Farci, 2022).



Slika 2. Strukturni nivoi proteina (Ogrizek-Tomaš, 2011)

Primarna struktura definirana je kao linearna sekvenca aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Raspored aminokiselina u sekvenci određuje funkciju tog enzima, tako da se i najmanjom promjenom rasporeda značajno može utjecati na strukturu, pa i na samu funkcionalnost enzima (Berg i sur., 2013).

Sekundarna struktura predstavlja prostorni raspored aminokiselinskih ostataka koji su međusobno blizu. Peptidni lanci se pod utjecajem hidrofobnih, Van der Waalsovih, vodikovih ili ionskih veza svijaju u različite, već definirane, strukture. Među njima najčešće su to α -uzvojnica i β -nabrana ploča, a postoje i β -okreti i Ω -omče (Sun i sur., 2004.). α -uzvojnica je spiralna struktura koja se sastoji od najviše 10 aminokiselina koje su međusobno povezane peptidnim vezama. Većina uzvojnica nađenih u globularnim proteinima su amfipatske, te služe kao savršene barijere između proteina i otapala. U središte uzvojnice su orijentirane hidrofobne skupine međusobno povezane Van der Waalsovima silama, dok su na vanjskoj strani, u otapalu,

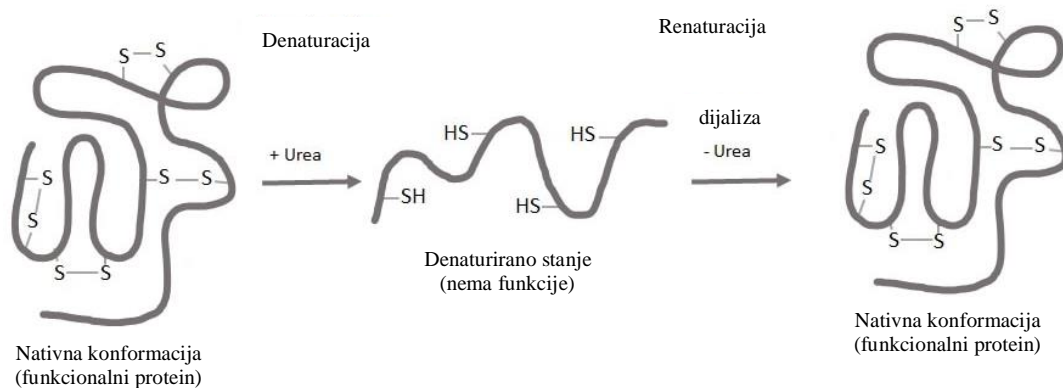
hidrofilne skupine. Ovakav strukturni raspored nužan je za smanjivanje steričkih smetnji među ograncima i okosnicom uzvojnice. Vodikove veze koje nastaju između NH skupine i za 4 baze udaljene CO skupine dovode do stvaranja spiralne strukture. Smjer spirale može biti desni i lijevi, međutim svi proteini sadržavaju jedino desno usmjerene uzvojnice (Langel i sur., 2019). β -listovi kao i α -uzvojnice također imaju prirodnu tendenciju zavijanja udesno, te se sastoje od β -niti. β -niti su, za razliku od uzvojnica, gotovo potpuno izdužene strukture čiji su bočni ogranci aminokiselina međusobno nasuprot. Susjedne niti u β -listovima mogu se spajati vodikovim vezama u različitim smjerovima, mogu biti paralelne i antiparalelne. Antiparalelno povezane niti daju stabilnost strukturi proteina (Berg i sur., 2013).

Sekundarne strukture se nadalje slažu u tercijarne. U tercijarnim strukturama pojavljuju se, uz vodikove, ionske, van der Waalsove i hidrofobne, kovalentne veze, tzv. disulfidni mostovi, koji povezuju dvije aminokiseline cisteina. Sam protein je stabilniji kada su njegove hidrofobne (nepolarne) skupine zbijene u unutrašnjosti, a hidrofilne, odnosno polarne na površini u dodiru s vodom. Iz tog razloga dolazi do nabiranja i stvaranja termodinamički stabilne trodimenzionalne strukture. Struktura membranskih proteina je u ovom slučaju izuzetak, gdje je raspored polarnih i nepolarnih ogranaka obrnut (Berg i sur., 2013). Nabiranje je proces koji započinje spajanjem aminokiselina, preko stvaranja sekundarnih struktura, pa do tercijarnih. Cijeli proces opisuje se metodom pokušaja i pogreške (slika 3.), u kojoj se isprobava nebrojeno mnogo kombinacija vezanja dok se ne dođe do one koja je termodinamički najstabilnija, a nazivamo ju nativna struktura ili nativna konformacija.



Slika 3. Shema nabiranja proteina metodom pokušaja i pogreške (Berg i sur., 2013)

Međutim, ovo nije potpuno pravilan opis. Ako bi se isprobavala svaka moguća kombinacija, to bi oduzelo jako puno vremena, a mjerenje stvarnog vremena nabiranja pokazuje da je ono vrlo kratko. Razlika u vremenima naziva se Levithalov paradoks. Ovaj paradoks dokazuje da nabiranje mora barem donekle slijediti neki određeni put odnosno da se neka međustanja ipak sačuvaju prilikom denaturacije. Denaturacija proteina je proces razbijanja tercijarne i sekundarnih struktura u proteinu, a renaturacija njihovo ponovno stvaranje. Važnost slijeda aminokiselina u primarnoj strukturi dokazao je Anfinsen koji je dodatkom uree i merkaptioetanol razorio tercijarne i sekundarne strukture proteina, a njihovim uklanjanjem nakon nekog vremena ponovno dobio valjanu nativnu konformaciju (slika 4.) (Kresge i sur., 2006).



Slika 4. Anfinsenov eksperiment denaturacije enzima (Supraja, 2022)

Proteini su iznimno osjetljivi, njihovoj denaturaciji mogu pridonijeti visoke pH vrijednosti, visoke temperature, prisustvo nekih denaturanata ili pak jako miješanje (Daniel i sur., 2010).

Također bitni u procesu nabiranja *in vivo* su prateći proteini. Oni se ne uklapaju u završnu konformaciju no pomažu pri biranju pravilnih struktura. Bez ovih proteina proces nabiranja bi bio prespor i nedovoljno učinkovit da bi se provodio u živoj stanici (Schwarzi i sur., 1996).

Tercijarna struktura također može biti i zadnja ukoliko se sastoji od samo jednog polipeptidnog lanca, ali ako ne, onda govorimo o kvaternoj strukturi. Proteini koji postignu kvaternu strukturu ujedno su i najbolji katalizatori. Ona definira prostorni odnos podjedinica (domena) proteina i njihove interakcije, odnosno spaja dva ili više polipeptidna lanca. Jedan polipeptidni lanac predstavlja jednu domenu. One se mogu rekombinirati kako bi stvorile proteine drugačijih funkcija. Svaka domena može funkcionirati zasebno, odnosno dovoljno su stabilne i mogu obavljati određene fizikalne i kemijske zadaće (Berg i sur., 2013).

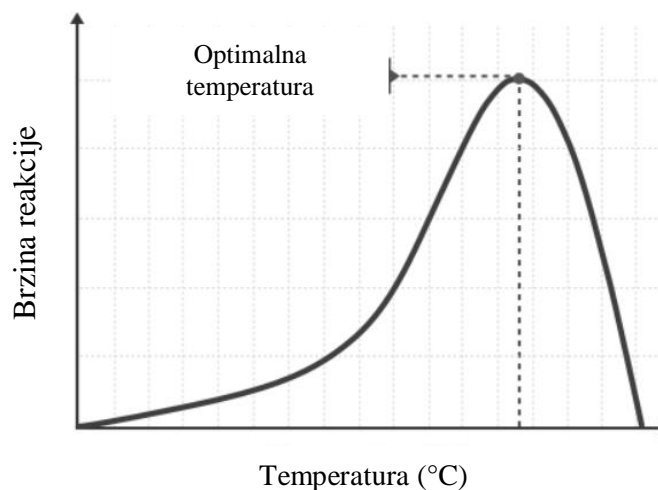
Enzimi u svojoj strukturi sadrže i aktivne centre bez kojih ne bi mogli obavljati svoju katalitičku funkciju. Oni su podijeljeni na dva dijela, vezni i katalitički. Vezni dio sastoji se od lanaca aminokiselina koji vežu molekule reaktanta, produkta ili prijelaznog stanja, a katalitički dio sastoji se od grupe aminokiselina koje su uključene u mehanizam biokatalize. Također u sastavu enzima možemo naći kofaktore. Oni su esencijalni za aktivnost biokatalizatora, a ujedno i razlog zašto nam je potrebna raznovrsna prehrana iz koje ih i dobivamo. Kofaktori mogu biti ioni, organske molekule ili derivati vitamina. Oni enzimi kojima su kofaktori potrebni za rad, bez njih ostaju u svojoj neaktivnoj formi tzv. apoenzimi, tek pri spajanju prelaze u aktivnu formu holoenzima (Berg i sur., 2013).

2.2.4. Razlike katalizatora i biokatalizatora

Pod kemijskim katalizatorima smatramo mineralne ili anorganske elemente. Služe za katalizu kemijskih reakcija van živog sustava. Najčešći katalizatori su metali, s obzirom da imaju veliki broj elektrona koji se mogu koristiti za stvaranje međuprodukata (Su i sur., 2015). Uz ubrzavanje kemijskih reakcija, jedno od bitnijih svojstava katalizatora je njihova selektivnost. To je mogućnost tvari da stvori željene, a smanji količinu neželjenih produkata tako što bira jedan supstrat naspram drugog (Kuo i sur., 2016). Također, nisu toliko osjetljivi na pH, temperaturu ili tlak što omogućuje rad pri velikom rasponu tih varijabli (Bommarius & Riebel-Bommarius, 2004).

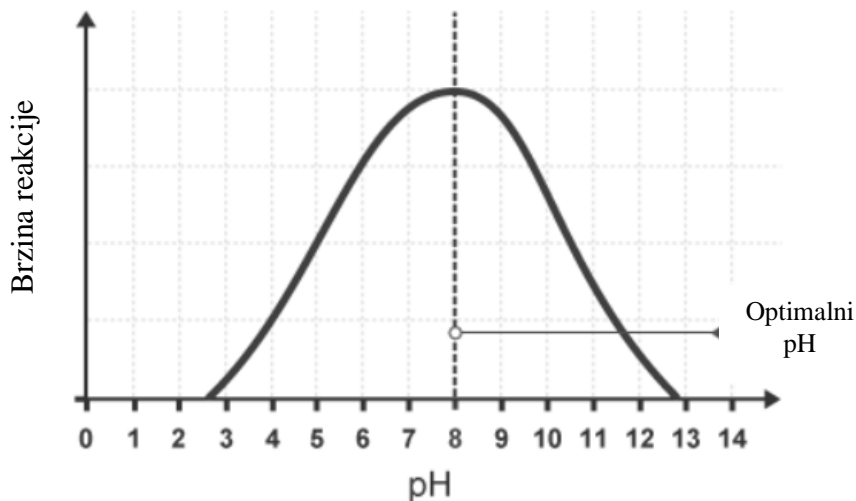
Biokatalizatori su osjetljiviji na mnoge varijable procesa te je zbog toga tijekom provođenja biokemijskih reakcija u bioreaktorima potrebno koristiti posebne senzore te prilagoditi uvjete poput temperature, pH i tlaka (Harding i sur., 2008.).

Reakcije pri višim temperaturama povoljne su radi veće količine sudaranja molekula, odnosno većeg broja samih reakcija (slika 5.). Zbog korištenja enzima kao katalizatora te temperature moraju se smanjiti. Enzimi se prirodno nalaze u živim stanicama, što znači da im je optimalna temperatura rada oko 40°C. Pri višim temperaturama dolazi do denaturacije i enzim gubi svoju funkcionalnost (Daniel i sur., 2010). Naravno, uvijek postoje iznimke. Jedna od najpoznatijih je Taq polimeraza, termostabilni enzim čija je optimalna temperatura na 80°C (Chien i sur., 1976). Pronađena je u okruženjima s ekstremno visokom temperaturom.



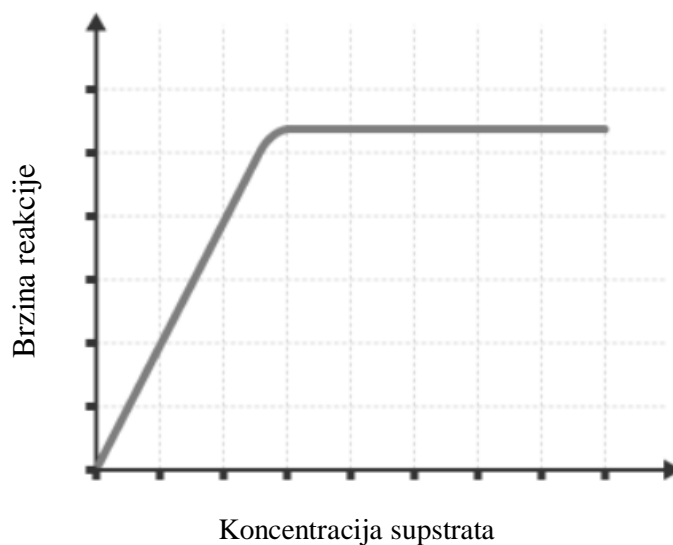
Slika 2. Utjecaj temperature na aktivnost enzima
(<https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/z88hcj6/revision/2>)

Optimalni pH za enzime je oko 8, iznad ili ispod toga dolazi do denaturacije (Daniel i sur., 2010) (slika 6.).



Slika 3. Utjecaj pH na aktivnost enzima
(<https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/z88hcj6/revision/2>)

Na rad biokatalizatora utječe i koncentracija supstrata te reakcije. Što je više supstrata, to će reakcija biti brža, međutim nije tako unedogled. U jednom trenutku dolazi do zasićenja enzima i aktivnost enzima postaje konstantna (Scopes, 2001) (slika 7.).



Slika 4. Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost enzima
(<https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/z88hcj6/revision/2>)

Biokatalizatori su vrlo specifični. S obzirom da se molekule spajaju na aktivni centar enzima, one moraju biti specifične za taj enzim (Bommarius & Riebel-Bommarius, 2004). Dodatne prednosti biokatalizatora su njihova enantioselektivnost i stereospecifičnost. Stereospecifičnost

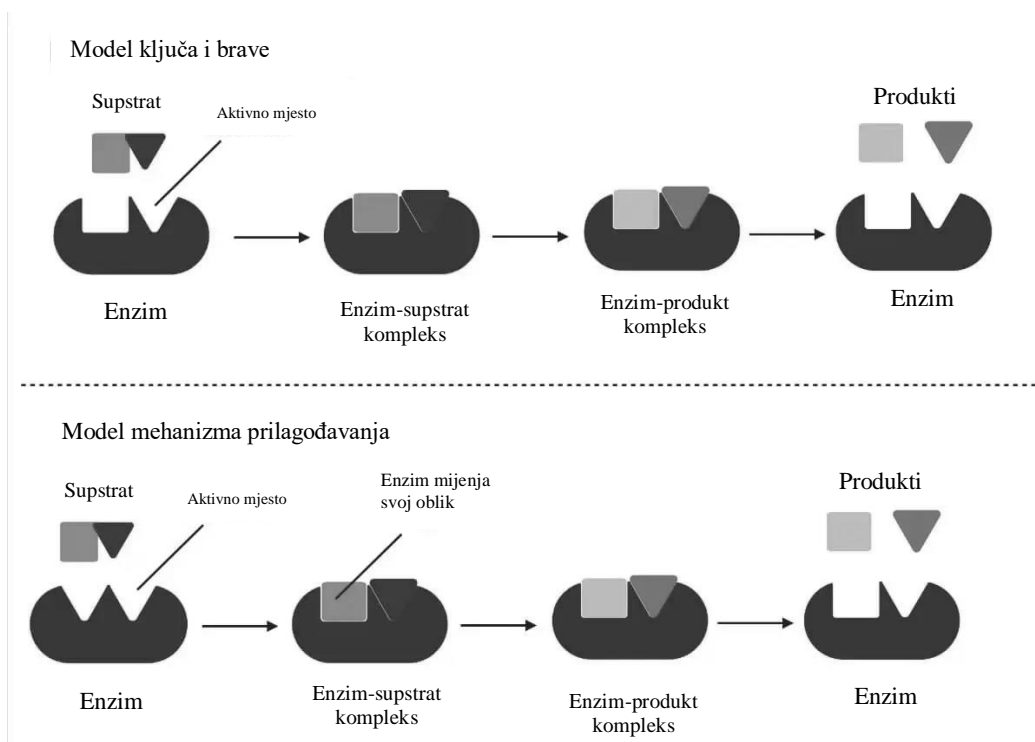
je sposobnost raspoznavanja između cis i trans struktura. Također, enzimi nisu toksični za okoliš i biorazgradivi su (Patil & Rathod, 2021). Prilikom proizvodnje enzima stvara se malo otpada, koriste se obnovljivi izvori i općenito se smanjuje potrošnja toksičnih kemikalija. Zbog blagih uvjeta provedbe reakcija, u procesima kataliziranim enzimima troši se manje vode, sirovina, proizvodi se manje štetnih plinova i općenito ima manje procesnih stupnjeva (Ghisalba i sur., 2010.). Uz sve prednosti postoje i neki nedostaci. Često nisu dovoljno stabilni u određenim medijima, jako malo enzima postoji za specifične reakcije, a proizvodnja novih i poboljšanih enzima traje dugo (Bommarius & Riebel-Bommarius, 2004).

2.2.5 Proces biokatalize

Enzimi kao katalizatori imaju veliku katalitičku moć, a još bitnije visoku specifičnost. Proces biokatalize odvija se na jedinstvenom mjestu enzima, aktivnom mjestu. Specifičnost enzimskih reakcija posljedica je rasporeda aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu. Iako aktivna mjesta nisu na svakom enzimu jednaka, postoje određena zajednička svojstva. Strukturno, aktivno mjesto je malena trodimenzionalna udubina nastala od aminokiselinskih ostataka. Upravo su one odgovorne za stvaranje i kidanje veza između supstrata i enzima, odnosno za stvaranje prijelaznog stanja, te za specifičnost enzimskih reakcija. U unutarnjem dijelu aktivnog mjesta nalaze se nepolarne, a na vanjskom polarne skupine, iako naravno ima iznimki. Ukoliko se polarni ostatak nađe u udubini dobiva posebna svojstva bitna za katalizu. Vezanje enzima i supstrata odvija se pomoću van der Waalsovih, elektrostatskih sila, H-veza i hidrofobnih interakcija. Također, enzim može imati i više od jednog aktivnog mjesta, te svako može imati svoju ulogu. Primjerice jedno veže supstrat, a drugo kofaktor (Berg i sur., 2013). Povezivanje enzima i supstrata objašnjava se teorijom ključa i brave ili teorijom induciranog pristajanja (Koshland, 1994).

1894. godine Emil Fischer predložio je „teoriju biokatalize“, koja je kasnije nazvana „teorija ključa i brave“, kojom pokušava objasniti interakcije na aktivnom mjestu enzima. Temelj teorije objašnjava kako bi enzim i supstrat međusobno trebali pristajati kao ključ i brava. Ova je teorija ispitivana i dokazana te je jedna od najvažnijih teorija biokatalize već preko 100 godina. Prema navedenoj teoriji, enzimsko aktivno mjesto ima veoma specifičan oblik, to jest, strukturu koja podrazumijeva raspored aminokiselinskih ostataka. Da bi se supstrat mogao vezati na vezni dio aktivnog mjesta on mora biti točnog oblika i komplementarne strukture kako bi se to obistnilo. Prema tome, samo mali broj supstrata može se povezati na aktivno mjesto i zbog toga su enzimske katalize jako specifične (Koshland, 1994) (slika 8.).

Prilikom proučavanja određenih reakcija Daniel Koshland je 1958. došao do zaključka da postoje reakcije u kojima se supstrat kao ključ i brava povezuje s enzimom međutim ne dolazi do reakcije. Daljnjim proučavanjem shvaća da ovoj teoriji nedostaje dinamičnost izmjene enzima i supstrata. Upravo je to dovelo do nastajanja nove teorije, „teorije prilagođavanja“ („induced fit“) (slika 8.). Da bi se katalitička reakcija mogla odvit, ne samo da supstrat i enzim međusobno moraju pristajati, već moraju biti i točne orijentacije. Dopuštajući aktivnom mjestu da prilagodi svoj oblik i kemijska svojstva kako bi čvršće pristajao uz supstrat, enzim se može selektivno vezati samo na određene supstrate i katalizirati specifične reakcije (Koshland, 1994). Na taj se način katalitičke grupe mogu orijentirati na način da olakšaju reakciju.

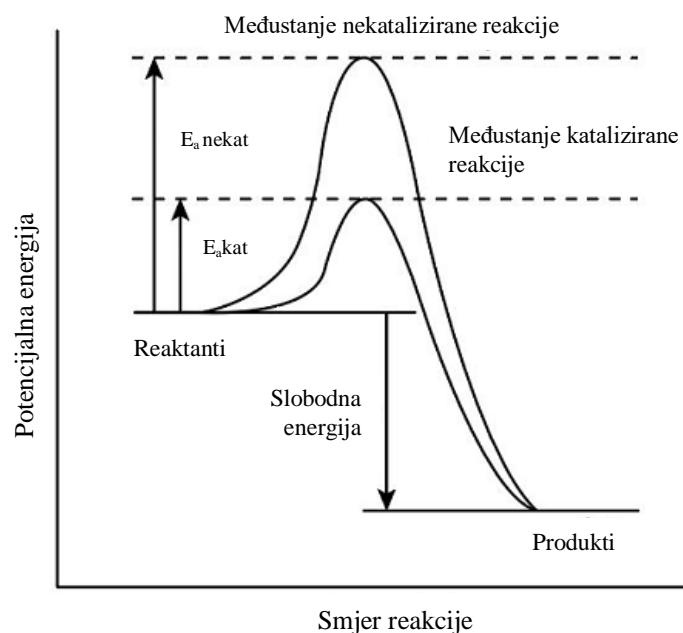


Slika 5. Prikaz mehanizma ključa i brave i mehanizma prilagođavanja (<https://microbenotes.com/enzymes-properties-classification-and-significance/>)

Posljednja teorija, koja se još uvijek proučava je teorija deformacije. Ona smatra da enzim može utjecati na stvaranje i razbijanje veza u supstratu što dovodi do promjene oblika i energije samog supstrata, a time dolazi do stabilizacije međustanja.

Sve do sada navedene teorije podrazumijevaju nastajanje međukompleksa enzim-supstrat (ES).

Stvaranjem međustanja (slika 9.) dolazi do prijelaza elektrona s molekule reaktanta na molekulu enzima i smanjuje se energija aktivacije potrebna za odvijanje reakcije.



Slika 6. Shema reakcija sa stvaranjem međustanja bez i sa katalizatorom (<https://homework.study.com/explanation/explain-transition-state-theory-and-draw-a-transition-state-diagram-for-a-non-catalyzed-and-an-enzyme-catalyzed-reaction-including-multi-step-reactions.html>)

Kako bi se pospješilo stvaranje ES međukompleksa možemo dovesti reaktivne grupe supstrata i katalitički centar u međusobnu blizinu (efekt približavanja) ili pak desolvatizirati molekule reaktanta čime opada polarnost otapala u blizini površine enzima (efekt površine). Smanjivanjem energije aktivacije dolazi do bržeg izvođenja reakcije i kao posljedicu, stvaranje produkta. Produkt se na kraju katalize odvajaju od enzima koji je spreman ponovno učiti u novi katalitički ciklus (<https://www.britannica.com/science/enzyme>).

2.2.6. Imobilizacija

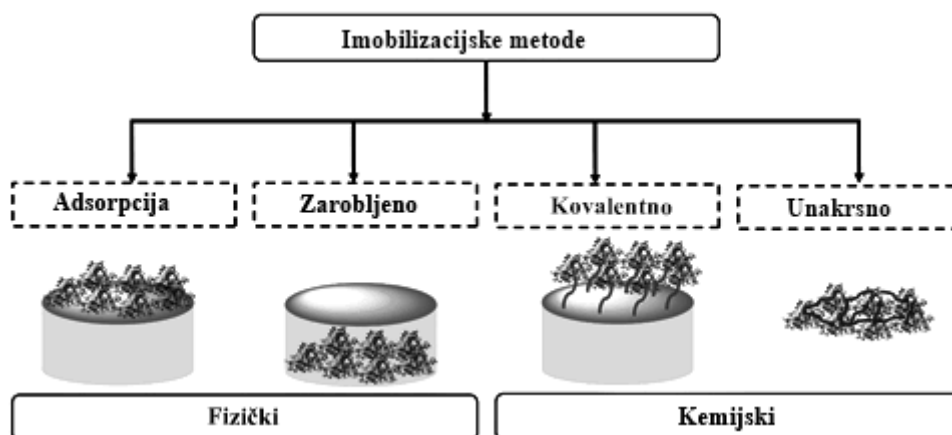
Imobilizacija uključuje pričvršćivanje ili ograničavanje enzima na čvrstu podlogu ili matricu. Ova metoda omogućila je korištenje unutarstaničnih enzima koji su manje stabilni i nehidrolitički kao procesne katalizatore u organskim medijima (Castro i sur., 2012). Čvrste podloge mogu biti anorganske, organske ili od sintetskih polimera. Imobilizirani enzimi zadržavaju svoju katalitičku aktivnost dok su fizički odvojeni od reakcijskog medija što omogućuje jednostavno obnavljanje.

Prednosti imobilizacije jesu poboljšana stabilnost, mogućnost ponovne uporabe, olakšano odvajanje i intenzifikacija procesa. Zaštitom od oštrih reakcijskih uvjeta i proteolitičke razgradnje poboljšava se stabilnost enzima. Činjenica da se ovakvi enzimi koriste više puta smanjuje potrebu za njihovom zamjenom, te je puno isplativije. S obzirom da su u ovakvom

stanju omogućeni uvjeti viših koncentracija enzima, reakcije su brže i učinkovitije (Truppo, 2017).

Imobilizacija se provodi na četiri različita načina ovisno o uvjetima postupka, primjerice vrsta čvrste podloge, pH, temperatura i mnogi drugi (slika 10). Također, ovise i o vrsti enzima, njegovoj veličini, stabilnosti i mogućnosti stvaranja veza. Fizičkom adsorpcijom se preko slabih sila poput van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija enzimi adsorbiraju na čvrste nosače. Metoda je jednostavna, ali posljedica može biti ispiranje enzima. Kovalentna vezanja omogućuju čvršće vezanje, ali za to su potrebne odgovarajuće funkcionalne skupine i na enzimu i na nosaču. Pomoću porozne matrice ili gela, enzimi se mogu fizički uhvatiti u nastalu barijeru koja propušta difuzijski sve osim enzima. Zadnja opcija je unakrsno umrežavanje. Enzimi uz pomoć sredstava za umrežavanje stvaraju stabilnu matricu oko sebe čime sprječavaju ispiranje (Imam i sur., 2021).

Imobilizirani enzimi se najčešće koriste u procesima biokatalize, bioremedijacije, kao biosenzori i u biomedicinskoj primjeni, kao i u mnogim povezanim industrijama.



Slika 10 Imobilizacijske metode
(<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/gc/d1gc01852c>)

2.2.7 Industrijski značaj biokatalizatora

Biokatalitički procesi pronalaze sve više i više primjena u današnjoj industriji, pogotovo farmaceutskoj i agrokemijskoj zbog potrebe za optički čistim spojevima (<https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-organsku-kemiju-i-biokemiju/Laboratorij-za-stereoselektivnu-sintezu-i-biokatalizu/Clanci/Istrazivanja/Biokataliza>).

U industriji je jako bitna cijena, to jest ekonomska isplativost. S obzirom da je cijena biokatalizatora izražena po količini nastalog produkta, biokatalizatori su skuplji od katalizatora, kao i materijali i oprema za njihovo dobivanje. Kako bi enzim bio iskoristiv u industriji mora zadovoljiti listu zahtjeva. Treba biti lako izdvojiv iz reakcijske smjese, višekratno upotrebljiv, stabilan i održiv u kontinuiranoj provedbi procesa.

Enzimi se koriste u preradi hrane, primjerice dječja hrana, kuhanje piva, voćni sokovi, te proizvodnji mliječnih proizvoda. Također se koriste u industriji škroba, papira i biogoriva, osim toga i u proizvodnji šminke, tekućine za čišćenje kontaktnih leća, guma i fotografija te u molekularnoj biologiji i mnogim drugim granama znanosti (Kirk & Fuglsang, 2002).

Kako bi se enzimi mogli više i kvalitetnije koristiti u industriji istražuju se najbolji načini za njihovu imobilizaciju. Trenutno, enzimi se ne mogu koristiti u svim procesima, pogotovo ne u onim u kojima su temperature previsoke, u kojima dolazi do turbulentnog strujanja ili u toksičnim medijima. Ukoliko se biokatalizatori imobiliziraju, mogli bi biti korišteni u većem rasponu uvjeta. Dodatna prednost bila bi mogućnost smanjenja broja procesnih koraka (Chapman i sur., 2018).

3. PREGLEDNI DIO

3. 1 Priprema biokatalizatora

3.1.1 Uvod

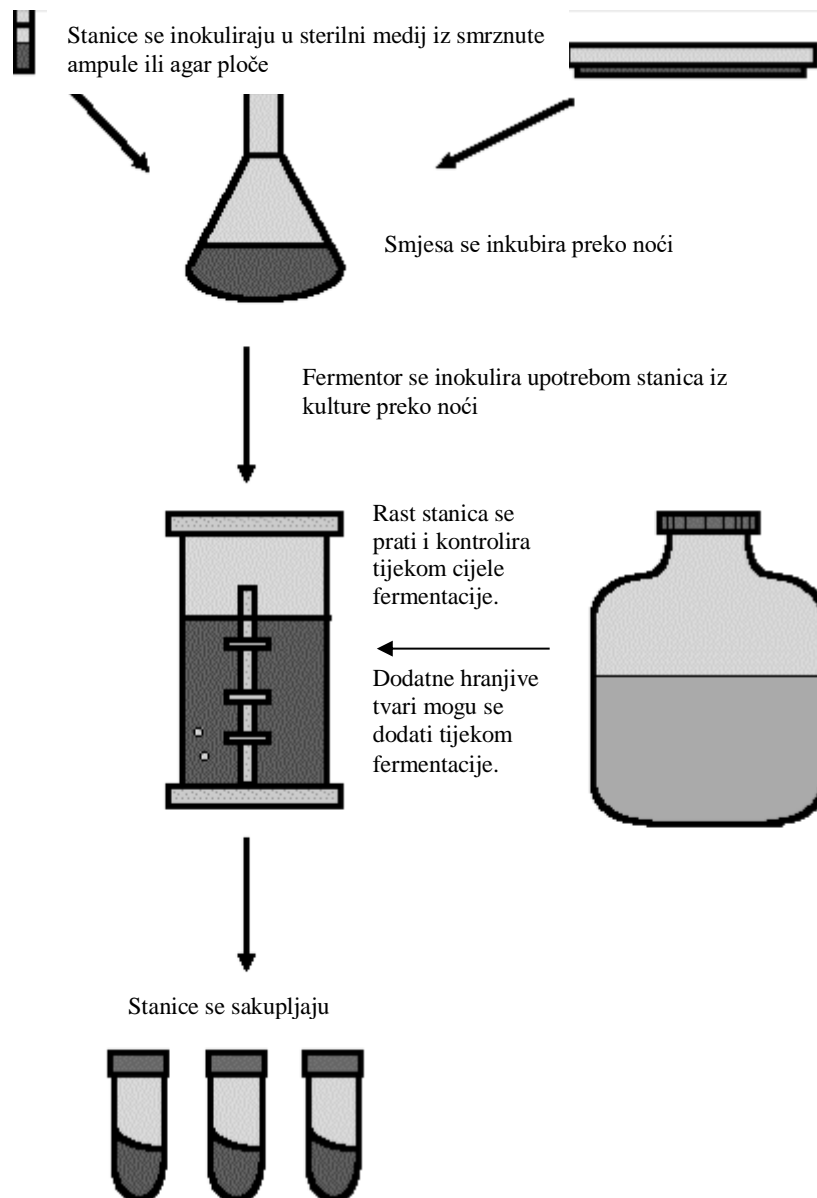
Enzimi su se pojavili kao svestrani i nezamjenjivi alati u brojnim industrijama, nudeći ekološki prihvatljive i učinkovite alternative tradicionalnim kemijskim metodama. Posjeduju izvanrednu sposobnost ubrzavanja kemijskih reakcija, povećanja učinkovitosti i omogućavanja specifičnih transformacija u blagim procesnim uvjetima. U farmaceutskoj industriji enzimi se koriste u proizvodnji lijekova kao što su antibiotici i sredstva protiv raka. U industriji hrane i pića igraju ključnu ulogu u procesima poput pivarstva, pečenja i proizvodnje mliječnih proizvoda. Enzimi su se također pojavili kao ključne komponente u razvoju održivih rješenja, uključujući biogoriva, bioremedijaciju zagađivača i senzore temeljene na enzimima za praćenje okoliša. Proizvodnja enzima mikrobnom fermentacijom, biljnom proizvodnjom i kulturom životinjskih stanica omogućuje sintezu enzima s različitim svojstvima i primjenama. Međutim, uspješna proizvodnja enzima ovisi o čimbenicima kao što su izbor organizma domaćina, tehnike genetskog inženjeringa, uvjetima uzgoja i daljnja obrada. Tehnike daljnje obrade, uključujući pročišćavanje i karakterizaciju, bitne su za dobivanje čistih i aktivnih enzima (Brady & Sheldon, 2021). Kako potražnja za održivim rješenjima nastavlja rasti, tako i potražnja za enzimima specifičnih svojstava raste. Njihova proizvodnja nesumnjivo će igrati ključnu ulogu u daljnjim istraživanjima i inovacijama.

3.1.2 Mikroba fermentacija

Ovaj proces uključuje uzgoj mikroorganizama, poput bakterija, kvasaca ili gljivica, u velikim spremnicima za fermentaciju koji su kvalitetno opremljeni za praćenje svih procesnih uvjeta. Mikroorganizmi imaju hranjivi medij koji im omogućuje proizvodnju željenog enzima. Sadržaj medija optimiziran je kako bi se osigurao visok doprinos enzima i minimiziralo stvaranje neželjenih nusproizvoda. Medij sadržava potreban ugljik, dušik, minerale i vitamine. Izvori ugljika su najčešće šećeri poput glukoze i saharoze, a dušika kvasac ili amonijeve soli (Al-Maqtari i sur., 2019).

Prvi korak u samom procesu fermentacije je odabir prikladnog mikroorganizma koji može proizvesti željeni enzim, jer različiti organizmi posjeduju različite sposobnosti za njihovu sintezu i sekreciju (Truppo, 2017.). Uz mogućnost mikroorganizma za proizvodnju određenog

enzima razmatraju se i karakteristike poput rasta enzima i mogućnost genetske manipulacije (Chen i sur., 2010). Nakon što se odabere mikroorganizam, provodi se optimizacija uvjeta fermentacije što uključuje podešavanje parametara kao što su temperatura, pH, razine kisika i koncentracije hranjivih tvari kako bi se stvorilo idealno okruženje za sintezu (slika 11.) (Du i sur., 2009). Nakon završene fermentacije, fermentacijska smjesa koja sadrži enzime koristi se za pročišćavanje i izolaciju koji će biti opisani u poglavlju 3.3.



Slika 71. Shema procesa mikrobne fermentacije
 (<https://www.biologicscorp.com/blog/bacterial-fermentation-definition/>)

Mikrobna fermentacija jedna je od najkorištenijih metoda. Vrlo je učinkovita s obzirom da se pomoću nje može proizvesti velika količina enzima, zadovoljavajući industrijske uvjete.

Također, trošak proizvodnje je relativno nizak u usporedbi s drugim metodama, budući da mikroorganizmi mogu koristiti jeftine izvore ugljika i hranjive medije. Osim toga, mikrobnna fermentacija može se optimizirati za povećanje produktivnosti enzima pomoću tehnika genetskog inženjeringa ili metoda poboljšanja soja (Ibrahim, 2008.).

Mikroorganizmi mogu proći proces fermentacije i preko čvrstog supstrata, takozvana fermentacija u čvrstom stanju (Ibrahim, 2008.). Za razliku od tradicionalne tekuće fermentacije, fermentacija u čvrstom stanju uključuje uzgoj mikroorganizama na krutim supstratima s minimalnom količinom ili u potpunosti bez slobodne vode. Ova metoda oponaša prirodno okruženje u kojem mikroorganizmi napreduju u prirodnim čvrstim sustavima, kao što su poljoprivredni ostaci, prehrambeni nusproizvodi i lignocelulozni materijali. Ona nudi nekoliko prednosti, uključujući isplativost, korištenje supstrata i proizvodnju enzima s jedinstvenim svojstvima (Carboué i sur., 2017).

Supstrati bi trebali osigurati povoljno okruženje za rast mikroorganizama i podržati sintezu enzima, zato je njihov odabir jako bitan. Poljoprivredni ostaci, kao što su pšenične mekinje, rižine ljuske ili bagasa šećerne trske, obično se koriste kao čvrsti supstrati (Carboué i sur., 2017). Supstrati u ovoj metodi zahtijevaju predobradu. To mogu biti neke fizikalne tehnike poput mljevenja i prosijavanja, kemijske, tipa kiseli/alkalni tretmani ili pak biološke, mikrobnna razgradnja. Prethodna obrada ključna je kako bi se poboljšala njihova pristupačnost, uklonio lignin ili prilagodila njihova fizikalna i kemijska svojstva.

Na čvrsti supstrat se prije početka fermentacije nanosi pripremljeni sloj mikroorganizama. Može se dobiti iz čistih kultura ili spora, a priprema se uzgojem mikroorganizama u tekućem ili čvrstom mediju pod odgovarajućim uvjetima. Ponovno, ovisno o ciljanom enzimu, podešavaju se parametri fermentacije poput temperature, pH i dostupnosti hranjivih tvari. Supstrat se navlaži kako bi se osigurao potreban sadržaj vlage za rast mikroba i proizvodnju enzima, bez pretjerane dostupnosti vode. Sustav fermentacije održava se pod kontroliranim uvjetima, uključujući temperaturu, vlažnost i prozračivanje. Mikrobni metabolizam i sinteza enzima odvijaju se unutar matrice čvrstog supstrata, koristeći hranjive tvari supstrata i stvarajući metaboličke nusprodukte (Mishra i sur., 2019.).

Tijekom fermentacije mikroorganizmi proizvode i izlučuju enzime u okolinu, na čvrsti supstrat (Buhler i sur., 2002.). Proizvedeni enzimi razgrađuju složenije organske spojeve prisutne u supstratu u jednostavnije spojeve koje mikroorganizmi mogu iskoristiti (Larroche i sur., 2008.).

Vrste i količine proizvedenih enzima ovise o specifičnom mikroorganizmu, sastavu supstrata, uvjetima fermentacije i ciljanom enzimu. Enzimi mogu biti hidrolitički, kao što su proteaze, amilaze, celulaze ili ligninaze, i imaju primjenu u raznim industrijama.

3.1.3 Kultura biljnih stanica

Ova metoda uključuje genetski inženjering biljaka za proizvodnju i akumulaciju specifičnih enzima. U zadnjim godinama postaje sve popularnija metoda proizvodnje enzima. Do danas najveći problem ove metode su zapravo biljni bioreaktori, to jest stvaranje malih količina produkata nekontinuirane kvalitete (Christou i sur., 2004.).

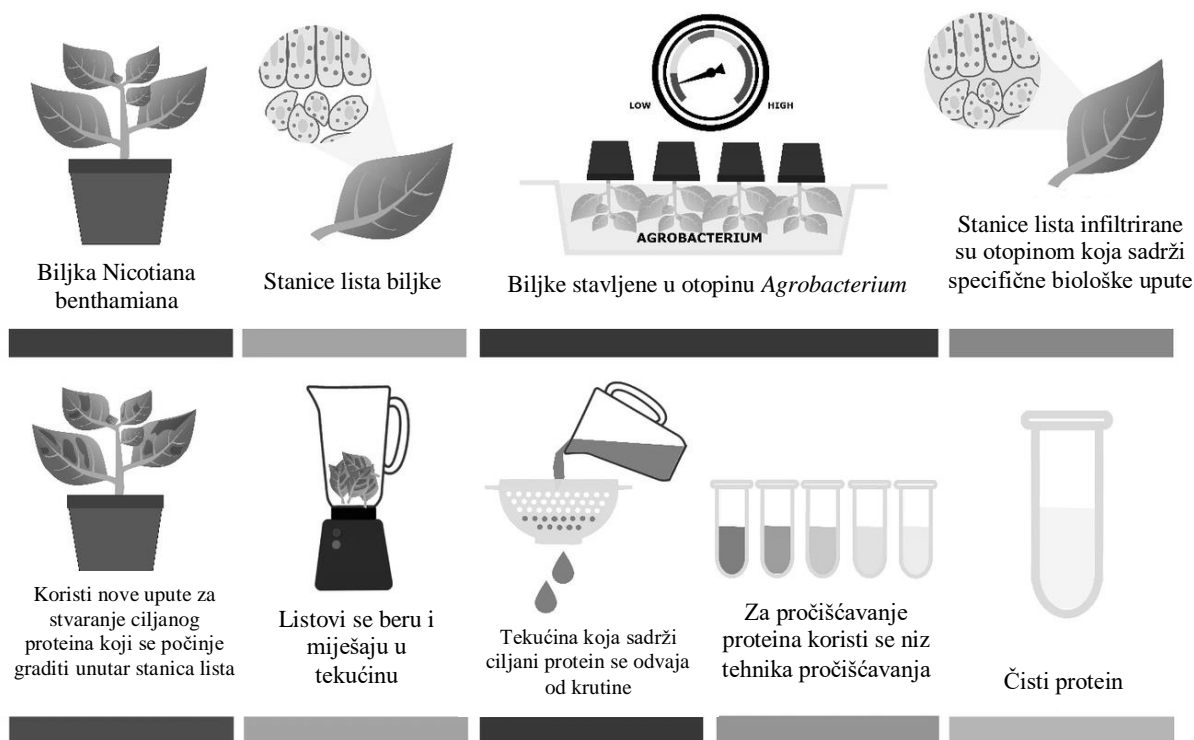
Biljke imaju mogućnost fotosinteze, korištenja sunčeve svjetlosti kako bi je pretvorili u kemijsku energiju. Iz tog razloga smatraju se održivim i obnovljivim izvorom. Kao i kod mikrobne fermentacije, prvi korak je odabir odgovarajuće biljne vrste. Prilikom odabira pazi se na karakteristike rasta te vrste, prinosa biomase te podložnosti genetskoj manipulaciji (Goldstein & Thomas, 2004). Genetičko inženjerstvo omogućava uvođenje određenog gena enzima u genom biljke. To se može postići metodama kao što je transformacija posredovana bakterijom *Agrobacterium* ili isporuka genskog pištolja, omogućujući biljci da proizvodi enzim od interesa. Metoda transformacije posredovana bakterijom *Agrobacterium* koristi prirodnu sposobnost *Agrobacterium tumefaciens*, bakterije tla, da prenese segment svoje DNK, poznat kao T-DNK, u genom biljke domaćina (slika 12.). Isporuka genskog pištolja, također poznata kao biolistička metoda ili metoda bombardiranja česticama, često je korištena tehnika za dostavu stranih gena u biljne stanice. Uključuje fizičku dostavu čestica obloženih DNK u biljna tkiva korištenjem projektila velike brzine (Bortesi i sur., 2019).

Kako bi se osiguralo stvaranje željenog gena koriste se promotori, sekvence DNK, koji služe za poticanje ekspresije prije uvedenog gena (Bortesi i sur., 2019). Također, mogu usmjeriti enzime u specifične dijelove biljke, primjerice u kloroplaste ili endoplazmatski retikulum, kako bi se poboljšala akumulacija i stabilnost enzima.

Uzgoj genetički modificirane biljke provodi se u staklenicima ili komorama za rast i razvoj. Osigurani su optimalni uvjeti za rast, kao što su temperatura, vlažnost, intenzitet svjetlosti, te hranjivi medij (Towler i sur., 2018).

Kada biljke dosegnu željeni stadij rasta i akumulacije enzima, ubiru se radi ekstrakcije enzima. Biljno tkivo koje sadrži enzim skuplja se i obrađuje kako bi se enzim oslobodio iz stanica. Metode ekstrakcije mogu uključivati mehanički poremećaj (fizičko razbijanje biljnog tkiva),

enzimsku probavu (specifični enzimi razgrađuju stijenke biljnih stanica) ili kemijske tretmane (otapala/kemikalije razbijaju stanične stijenke). Sirovi ekstrakt se zatim podvrgava tehnikama pročišćavanja (Altman & Hasegawa, 2011.). Enzimi proizvedeni ovom metodom generalno se dijele ovisno o njihovoj funkciji na biopolimere, industrijske enzime i terapijske enzime.



Slika 82. Shema biljne proizvodnje enzima metodom transformacije korištenjem *Agrobacterium* (<https://gott.blog.gov.uk/2020/11/23/leaf-expression-systems-how-harnessing-the-power-of-plants-is-changing-the-future-of-our-medicines/>)

Biljna proizvodnja enzima nudi nekoliko prednosti kao metoda. Kao što je već spomenuto, biljke služe kao samoreplicirajuće zelene tvornice, sposobne proizvesti velike količine biomase i enzima, čime smanjuju ovisnost o neobnovljivim izvorima energije (Kara & Liese, 2019). One također mogu izvesti složene obrade, koje su ključne za funkcionalnost i stabilnost određenih enzima. Nadalje, biljnom proizvodnjom mogu se proizvesti enzimi koje je teško proizvesti korištenjem mikrobnih sustava (Finnern & Schillberg, 2021.).

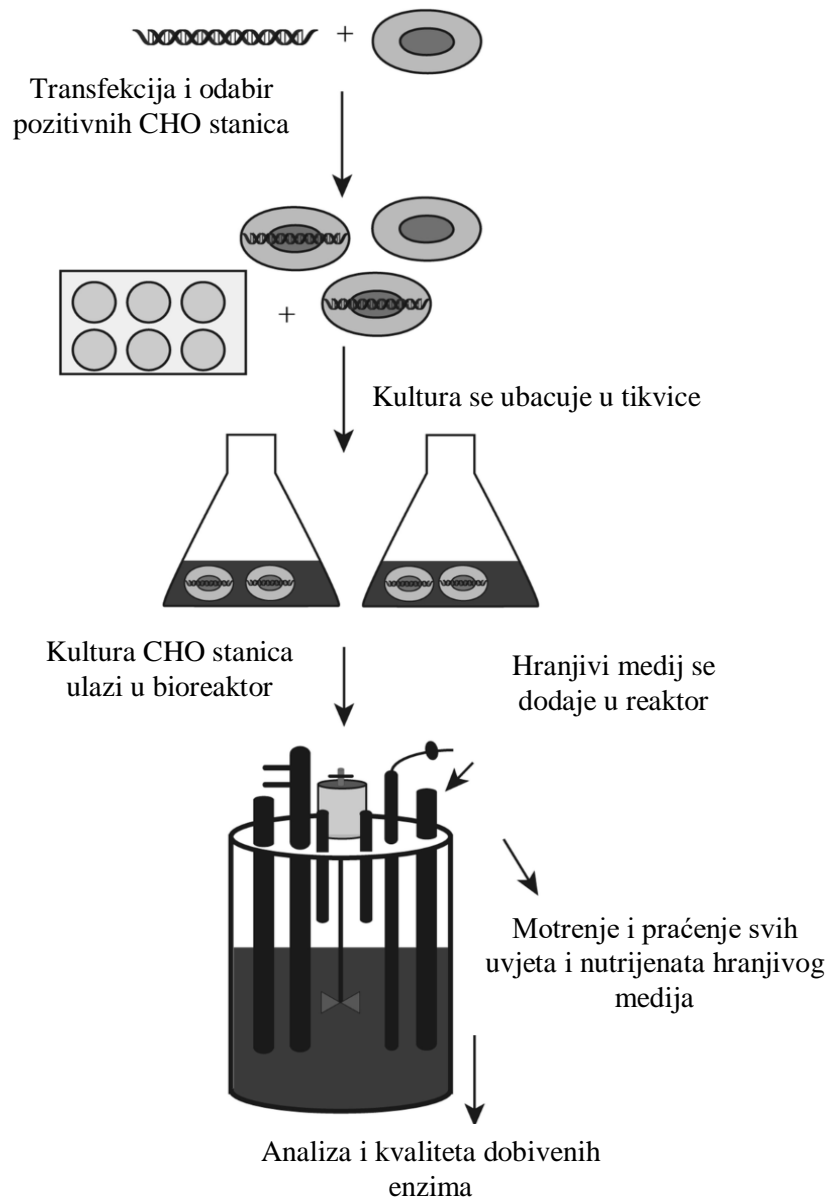
3.1.4 Kultura životinjskih stanica

Ova metoda uključuje rast i razmnožavanje životinjskih stanica *in vitro*, omogućujući sintezu i izlučivanje željenih enzima. Stanice su izvedene iz specifičnih tkiva životinja, a mogu biti primarne (direktno izvedene iz životinje) ili besmrtne stanice (neograničena dioba). Kulture životinjskih stanica nude prednosti poput sposobnosti proizvodnje složenih posttranslacijskih modifikacija i održavanja stanične funkcionalnosti. (Fujita & sur., 2022).

Kao i u prošlim metodama, početak je odabir kulture stanica, te pregled njenih karakteristika rasta, produktivnosti i mogućnosti proizvodnje u velikim razmjerima. Najčešće korištene kulture stanica su stanice jajnika kineskog hrčka (CHO) (slika 13.). One su se pokazale jako učinkovitima s obzirom da su vrlo slične ljudskim stanicama, odnosno sposobne su proizvesti funkcionalne enzime koji zahtijevaju posttranslacijske modifikacije, koje znatno utječu na aktivnost i stabilnost. Moguće ih je genetski modificirati i prikladne su za industrijsku proizvodnju (Kim i sur., 2011).

Hranjiv medij potreban za rast i razvoj kulture stanica mora sadržavati aminokiseline, vitamine, minerale i faktore rasta. Optimizacija hranjivog medija uključuje prilagođavanje njegovog sastava i koncentracije na optimalne uvijete za kvalitetniju proizvodnju. Ovisno o potrebi, u medije se mogu dodati suplementi u obliku seruma (Butler, 2004).

Reakcije se obično odvijaju u bioreaktorima koji osiguravaju kontrolirano okruženje za rast stanica i proizvodnju enzima. Proces započinje u malim sustavima, kao što su tikvice ili Petrijeve zdjelice, tek nakon stvaranja suspenzije kultura prebacuju se u veće sustave, bioreaktore različitih vrsta. Parametri uzgoja, uključujući temperaturu, pH, razine otopljenog kisika i brzine miješanja, pažljivo se prate i kontroliraju kroz cijeli proces kako bi se postigli bolji rezultati, u ovom slučaju veći rast i bolja produktivnost (Pörtner, 2021.)



Slika 93. Shema procesa kulture životinjskih (CHO) stanica (<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-022-12342-x>)

Nakon završetka rasta i proizvodnje enzima, oni se odvajaju iz smjese i pročišćuju na isti način kao i kod prošlih metoda. Jednom kada se uspostavi učinkovit proces za proizvodnju enzima u manjoj mjeri, on se može uvećati kako bi se zadovoljile industrijske potrebe. Uvećanje uključuje prilagođavanje različitih aspekata proizvodnog procesa, uključujući dizajn bioreaktora, formulaciju medija kulture i daljnju obradu. Krajnji cilj je poboljšati produktivnost, iskorištenje i isplativost uz održavanje kvalitete i dosljednosti proizvoda (Fujita i sur., 2022).

3.1.5 Industrijski uspjesi

Uspješnom optimizacijom uvjeta ove se metode danas značajno koriste u raznim industrijskim granama. Proizvodi korišteni u industriji hrane i pića služe u procesima pečenja, pivarstva ili proizvodnji mliječnih proizvoda, za poboljšanje okusa i obogaćivanje hranjivim tvarima. U tekstilnoj industriji većinom služe za obradu tekstila i preradu vlakana, također služe za proizvodnju deterdženata, sanaciju okoliša, bioremedijaciju, proizvodnju biogoriva, kozmetike i mnoge druge (Castro i sur., 2012.). Enzimi su od velike važnosti u farmaceutskoj industriji. Pomažu u sintezi lijekova, za proizvodnju terapijskih proteina i bioaktivnih spojeva, antitijela ili su dio dijagnostičkih testova (Davis i sur., 2015.).

Prilikom korištenja bilo koje od gore navedenih metoda, jedan od glavnih ciljeva je dodatno poboljšanje soja koji koristimo za uzgoj enzima. Uobičajene tehnike poboljšanja jesu mutageneza, DNK rekombinantna tehnologija, inženjerstvo metaboličkih puteva i usmjerena evolucija. Poboljšanje uključuje veću produktivnost, učinkovitost i stabilnost u proizvodnji, optimizaciju genetskih čimbenika i uvjeta fermentacije. (Castro i sur., 2012.).

Mutageneza uključuje izazivanje genskih mutacija koje dovode do genske raznolikosti. Mutacije se mogu postići kemijskim ili fizičkim mutagenima (zračenje, kemijski agensi). Mutageni s poželjnim svojstvima se biraju procesom probiranja ili selekcije (Theodorakis, 2008.). Mijenjanjem regulacije metaboličkih puteva stanični resursi se preusmjeravaju prema proizvodnji enzima. Ovom tehnikom osiguravaju se veće količine određenog enzima (Hou i sur., 2011). Usmjerena evolucija je tehnika kojom se oponaša prirodni proces evolucije soja s poboljšanim mogućnostima proizvodnje enzima. Također, uključuje stvaranje baze genetskih varijanti putem nasumične mutageneze ili miješanja DNK (Dalby & Hibbert, 2005). DNK rekombinantna tehnologija omogućuje manipulaciju molekule DNK i smatra se najkorištenijom metodom.

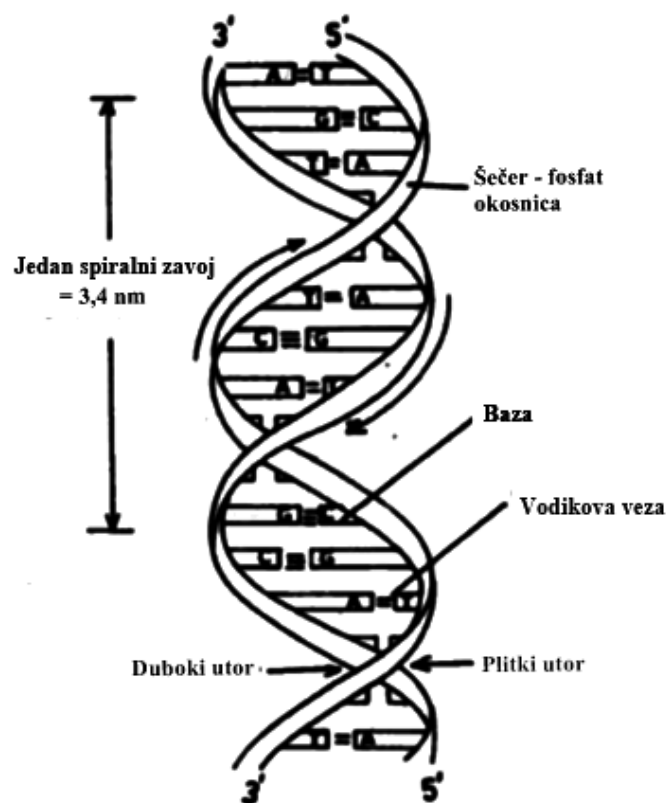
3.2. DNK rekombinantna tehnologija

3.2.1. Uvod

Rekombinantna DNK tehnologija, također poznata kao genetski inženjering ili spajanje gena, revolucionirala je polje biotehnologije te značajno promijenila aspekte znanstvenih istraživanja, medicine, poljoprivrede i općenito industrije. Ova tehnologija omogućuje znanstvenicima

manipulaciju i konstrukciju molekule DNK, omogućujući prijenos genetskih informacija preko vrsta i stvaranje novih genetskih kombinacija (May & Vogel, 2019.).

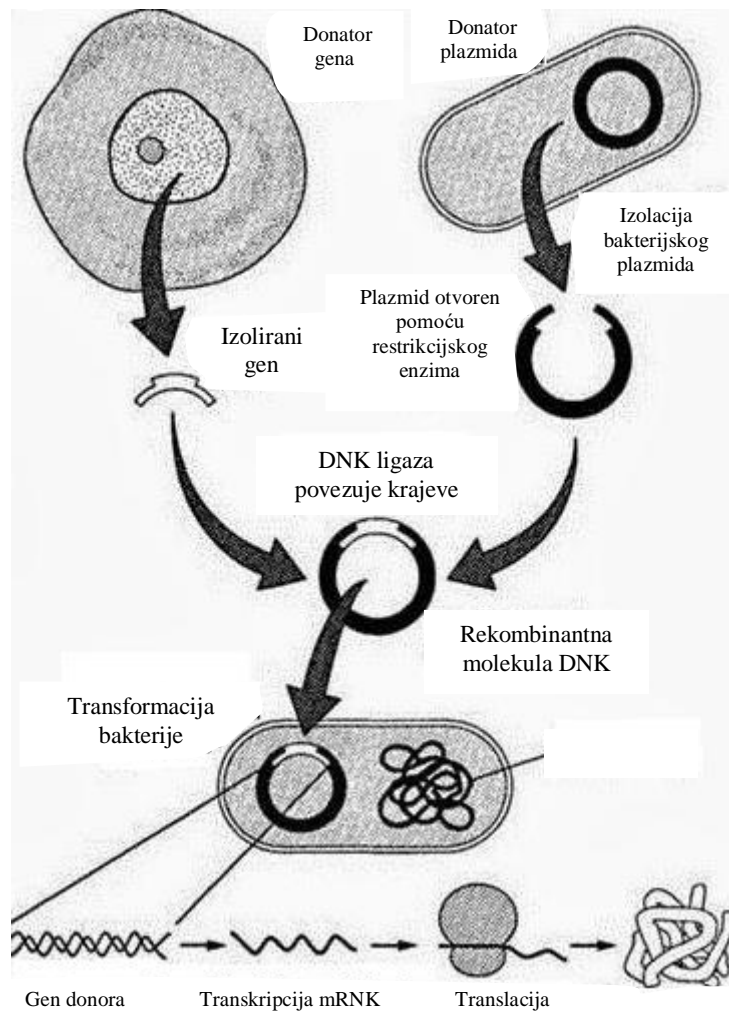
Temelj rekombinantne DNK tehnologije leži u razumijevanju strukture i funkcije DNK, nasljednog materijala koji prenosi genetske upute svih živih organizama. Istraživanja vezana za DNK započela su Watson i Crickovim otkrićem strukture dvostruke uzvojnice DNK (slika 14.) 1953. godine. Ovo otkriće postavilo je temelj za daljna istraživanja njenih svojstava, te naravno, moguće manipuliranje. 1973. godine rad Stanleja Cohena i Herberta Boyera predstavio je koncept ove tehnologije koja je uključivala mogućnost rezanja, kopiranja i lijepljenja specifičnih sekvenci DNK i njihova prijenosa između različitih organizama (May & Vogel, 2019.).



Slika 14. Model dvostruke uzvojnice DNK po Watsonu i Cricku
(<https://gkscientist.com/watson-and-crick-model-of-dna/>)

Ključni alat je DNK restrikcijski enzim, ili endonukleaza, koji djeluje kao molekularne škare koje mogu prepoznati i cijepati DNK na određenim sekvencama za prepoznavanje (Truppo, 2017.). Ovi enzimi, izolirani iz različitih mikroorganizama, omogućuju znanstvenicima precizno rezanje DNK na željenim mjestima, stvarajući fragmente s definiranim krajevima. Uz

restriksijski enzim važno je spomenuti i DNK ligazu, enzim koji može spajati fragmente DNK zajedno katalizirajući stvaranje fosfodiesterskih veza između njihovih krajeva (slika 15).



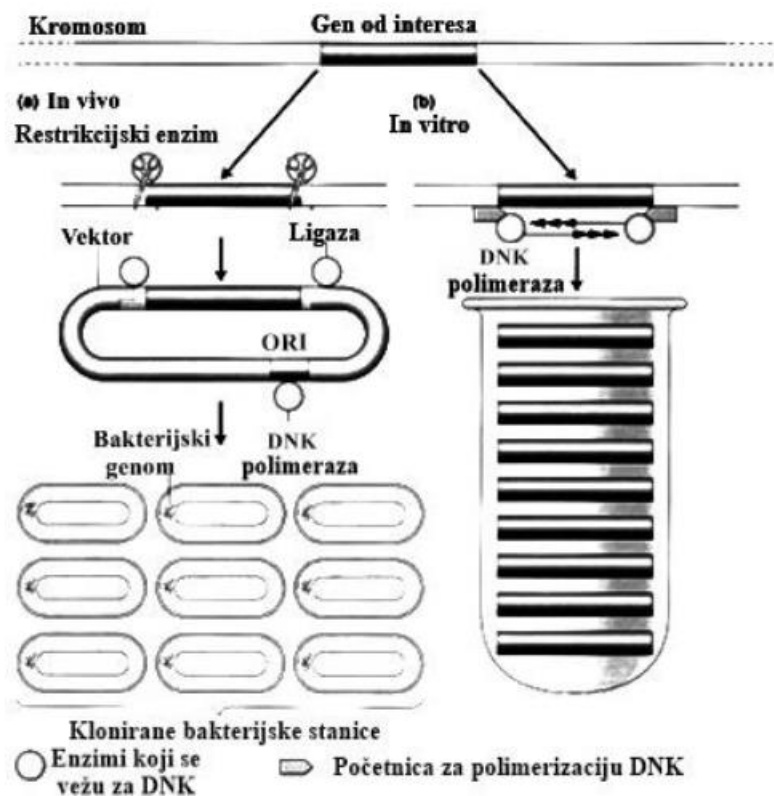
Slika 15. Prikaz funkcije restriksijskog enzima i DNK ligaze
(<https://www.biologyexams4u.com/2013/10/steps-in-recombinant-dna-technology.html>)

Ovaj princip omogućuje znanstvenicima da manipuliraju i proučavaju specifične gene uvođenjem mutacija ili brisanjem sekvenci gena, pružajući uvid u funkciju i regulaciju gena. Primjerice, tehnike kao što su izbacivanje i ubacivanje gena bile su ključne u razumijevanju uloge specifičnih gena u razvoju, fiziologiji i bolesti (Hou i sur., 2016.).

Ključne tehnike uključuju razgradnju restriksijskim enzimima, lančanu reakciju polimerazom (PCR), kloniranje DNK, sintezu gena, sekvenciranje DNK i transformaciju DNK (slika 16). Restriksijski enzimi režu DNK na određenim mjestima prepoznavanja, omogućujući preciznu manipulaciju fragmentima DNK. PCR pojačava specifične sekvence DNK, omogućujući stvaranje velikih količina za daljnju analizu ili manipulaciju. Kloniranje DNK uključuje umetanje fragmenata DNK u vektore, koji su nosači koji olakšavaju replikaciju i ekspresiju

umetnute DNK u organizmima domaćina (Castro i sur., 2012.). Sinteza DNK omogućuje stvaranje prilagođenih sekvenci DNK, uključujući gene ili čitave genome. Tehnike sekvenciranja DNK omogućuju određivanje preciznog redoslijeda nukleotida u molekuli DNK, pružajući neprocjenjive informacije za genetsku analizu i manipulaciju. Transformacija DNK je proces uvođenja egzogene DNK u stanice domaćina, omogućujući im da preuzmu i ekspimiraju strani genetski materijal (May & Vogel, 2019.).

Kloniranje vs. PCR-a



Slika 16. Usporedba procesa kloniranja i PCR
<http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture23.html>

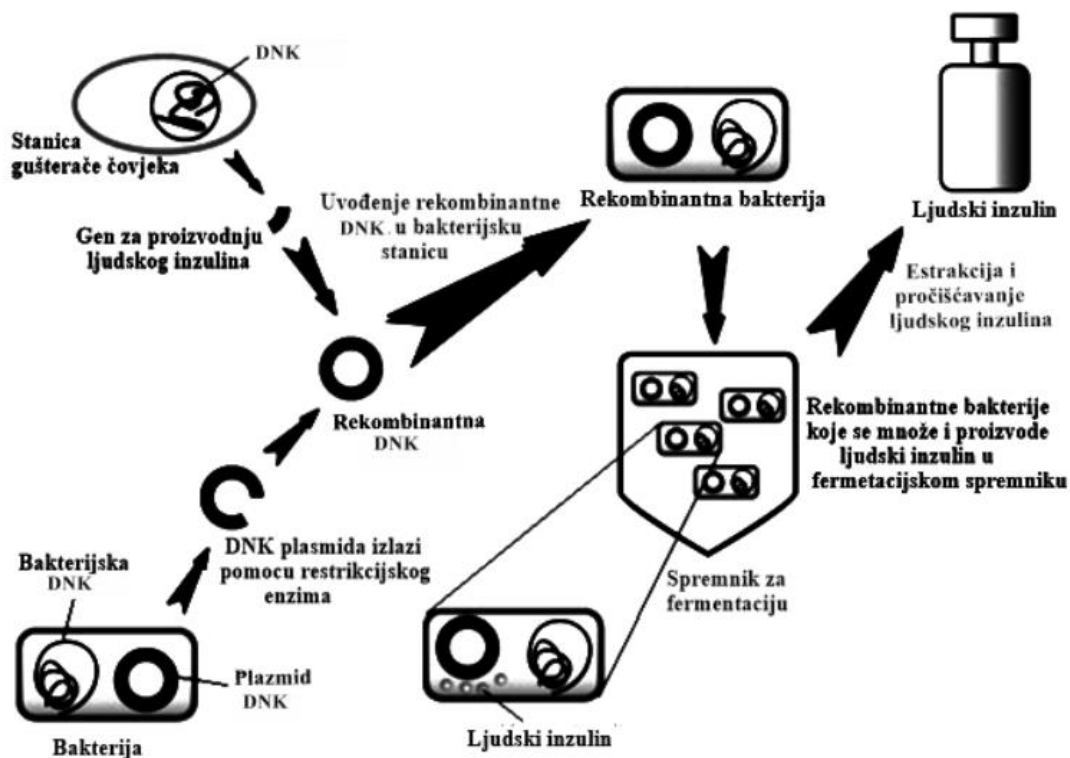
3.2.2. Proces

Prvi korak u korištenju tehnologije rekombinantne DNK (slika 17.) za proizvodnju enzima je identifikacija i izolacija gena od interesa. To uključuje identifikaciju organizma koji prirodno proizvodi željeni enzim i izolaciju njegovog genetskog materijala, obično u obliku DNK. To se može postići različitim metodama, kao što je ekstrakcija DNK iz stanica ili tkiva, ili korištenjem tehnika molekularne biologije kao što je lančana reakcija polimeraze (PCR) za umnožavanje specifičnih sekvenci DNK. Potom slijedi izolacija gena koji kodira željeni enzim. To se može postići različitim metodama, kao što je sekvenciranje genoma, probir knjižnica gena ili sinteza

gena. Nakon što se gen identificira, izolira se i priprema za daljnju manipulaciju (Ghisalba i sur., 2010.).

Nakon što je gen od interesa izoliran, potrebno ga je umetnuti u odgovarajući vektor za kloniranje. Vektori za kloniranje su molekule DNK, često izvedene iz plazmida ili virusa, koje se mogu neovisno replicirati unutar stanica domaćina. Gen od interesa povezuje se u vektor za kloniranje pomoću restrikcijskih enzima. Rezultirajuća molekula rekombinantne DNK, koja sadrži gen od interesa i vektor za kloniranje, zatim se uvodi u stanice domaćina za replikaciju i ekspresiju (May & Vogel, 2019.).

Rekombinantna molekula DNK, sada u vektoru za kloniranje, uvodi se u stanice domaćina kroz proces koji se naziva transformacija. To se može postići različitim metodama, uključujući kemijsku obradu, elektroporaciju ili korištenje virusnih vektora. Stanice domaćini mogu biti bakterije, kvasci, stanice kukaca ili stanice sisavaca, ovisno o željenom enzimu i njegovoj složenosti. Jednom kada uđe u stanicu domaćina, rekombinantna DNK se replicira zajedno s vlastitom DNK stanice domaćina. Stanice domaćini zatim izražavaju gen od interesa, sintetizirajući enzim kodiran tim genom. Nakon toga dolazi do ekspresije gena od interesa, što rezultira sintezom željenog enzima. Stanični strojevi organizma domaćina čitaju genetski kod u genu i proizvode molekule mRNA, koje ribosomi zatim prevode u proteine. Sintetizirani enzim može biti unutarstanični (prisutan unutar stanice domaćina) ili izlučen u okolni okoliš (Bajpai & Prokop, 1991.).



Slika 17. Dijagram procesa proizvodnje inzulina pomoću DNK rekombinantne tehnologije (<https://cbseacademics.com/chapter-12-biotechnology-and-its-application-class-12-biology-notes-and-questions/>)

Za optimizaciju proizvodnje enzima u stanicama domaćina prate se različita svojstva što uključuje odabir odgovarajućeg sustava stanica domaćina, optimiziranje uvjeta rasta, regulaciju ekspresije gena i pojačavanje lučenja enzima. Izbor stanice domaćina ovisi o čimbenicima kao što su složenost enzima, potrebne posttranslacijske modifikacije i skalabilnost proizvodnje. Optimizacija uvjeta rasta, kao što su temperatura, pH i dostupnost hranjivih tvari, osigurava optimalnu proizvodnju enzima. Ekspresija gena može se regulirati pomoću inducibilnih promotora ili genetskih modifikacija za kontrolu sinteze enzima. Strategije za povećanje izlučivanja enzima uključuju modificiranje signalnih peptida ili inženjering puta izlučivanja stanice domaćina (May & Vogel, 2019.).

Tehnologija rekombinantne DNK revolucionirala je proizvodnju enzima, nudeći brojne prednosti u odnosu na tradicionalne metode. Omogućuje proizvodnju enzima s poboljšanim svojstvima, poput poboljšane katalitičke aktivnosti, stabilnosti ili specifičnosti, putem genetskih modifikacija. Također omogućuje proizvodnju enzima koji nisu lako dostupni u prirodi ili su prisutni u malim količinama (Castro i sur., 2012.).

3.2.3. Industrijsko gledište

Enzimi proizvedeni tehnologijom rekombinantne DNK imaju različite primjene u industrijama kao što su zdravstvena njega, biotehnologija, poljoprivreda i sanacija okoliša. Ova je tehnologija revolucionirala polje poljoprivrede kroz razvoj genetski modificiranih usjeva. Uvođenjem gena koji daju svojstva kao što su otpornost na štetočine, otpornost na herbicide ili poboljšani nutritivni sadržaj, znanstvenici su stvorili usjeve s povećanim prinosom, smanjenim utjecajem na okoliš i povećanom hranjivom vrijednošću. Genetski modificirani usjevi imaju potencijal za rješavanje globalnih izazova sigurnosti hrane i poboljšanje poljoprivredne prakse (Hou i sur., 2016.). Također nalazi primjenu u forenzičkoj znanosti, gdje su analize DNK i tehnike profiliranja postale moćni alati za kriminalističke istrage i identifikaciju pojedinaca. Kroz DNK otiske prstiju, genetske varijacije u specifičnim regijama DNK pojedinca mogu se koristiti za uspostavljanje jedinstvenih genetskih profila, pružajući vrlo precizna sredstva identifikacije. Jedno od najznačajnijih postignuća u polju biotehnologije jest proizvodnja terapijskih proteina, kao što su inzulin, faktori rasta, antitijela i cjepiva, koji su transformirali liječenje raznih bolesti. Uz proizvodnju proteina, tehnologija rekombinantne DNK također je odigrala ključnu ulogu u genetskim istraživanjima, u proizvodnji cjepiva, uključujući ona protiv hepatitisa B, humanog papiloma virusa i gripe. Štoviše, genska terapija, koja uključuje uvođenje funkcionalnih gena u pacijente za liječenje genetskih poremećaja je jedno od trenutno znantno istraživanih polja (Hou i sur., 2016.).

Široka primjena tehnologije rekombinantne DNK postavlja važna etička i sigurnosna pitanja. Potencijalni rizici povezani s ispuštanjem GMO-a u okoliš, implikacije uređivanja gena kod ljudi te vlasništvo i kontrola genetskih informacija predmet su intenzivne rasprave (May & Vogel, 2019.). Uspostavljanje ravnoteže između znanstvenog napretka i etičke odgovornosti ključno je za osiguranje sigurne i odgovorne upotrebe ove tehnologije (Ghisalba i sur., 2010.).

3.3. Metode pročišćavanja proteina

3.3.1. Uvod

Nakon što stanice domaćina proizvedu enzim, potrebno ga je pročistiti i karakterizirati. Pročišćavanje enzima obično uključuje niz koraka, uključujući pripremu uzorka, staničnu lizu, stabilizaciju, izolaciju i koncentraciju proteina. Ovi koraci pomažu ukloniti neželjene stanične komponente i izolirati enzim od interesa u njegovom čistom obliku (Lee, 2017). Čisti enzim se zatim podlaže karakterizaciji. Ona se provodi kako bi se odredila aktivnost, stabilnost, specifičnost, čistoća, struktura i druga svojstva. Ove informacije su ključne za procjenu prikladnosti enzima za specifične industrijske primjene (Buhler i sur., 2002.). Najčešće

korištene metode pročišćavanja jesu kromatografija, gel elektroforeza i imobilizacija, koje će biti opisane u daljnjem tekstu (May & Vogel, 2019).

3.3.2. Metode izolacije

Izolacija enzima je prvi korak procesa pročišćavanja. On omogućuje ekstrakciju enzima iz njegove prirodne okoline, to mogu biti stanice, tkiva, tekućine, kako bi se osigurala sirova smjesa koja služi kao početni materijal za daljnje pročišćavanje (Lee, 2017). Već procesom izolacije možemo odraditi dio karakterizacije enzima, a čak i modifikacije. Prilikom izolacije metoda se bira u ovisnosti o željenom enzimu. Odnosno, mora se paziti na određene uvjete, poput temperature, pH vrijednosti, ima li i koje su nečistoće u sustavu, kako ne bi dovele do proteinske deaktivacije i mnogi drugi elementi. Metode koje se koriste jesu centrifugiranje, filtracija, ekstrakcija, razbijanje stanica ili najčešće korištena metoda, isoljavanje (Pollard & Woodley, 2007).

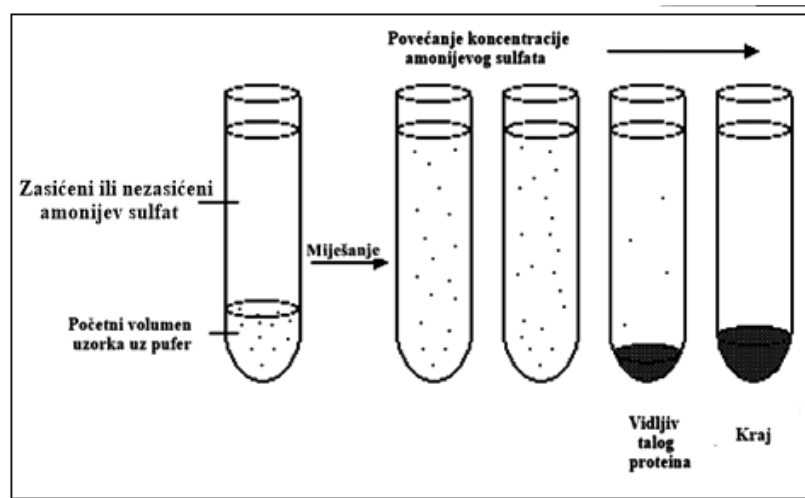
3.3.3. Isoljavanje

Princip metode isoljavanja je smanjenje topljivosti enzima pomoću veće koncentracije soli. Ostale molekule ostaju u otopinu dok se proteini počinju taložiti i tako odvajaju (Duong-Ly & Gabelli, 2014) (slika 18).

Sam proces uključuje nekoliko koraka. Prvo se u pripremljenu otopinu željenog enzima postupno dodaje sol uz konstantno miješanje. Najčešće korištena sol u ovoj metodi je amonijev sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Razlog tomu je njegova velika topljivost i mogućnost taloženja pri umjerenim koncentracijama. Drugi izbori bili bi natrijev (Na_2SO_4) ili kalijev sulfat (K_2SO_4). Sol se postupno dodaje do točke zasićenja. Ona ovisi o proteinu i soli koju smo koristili, ukupna koncentracija se izražava u postotcima zasićenja (npr. 30% zasićenje). Povećanjem koncentracije soli, enzimi se počinju taložiti, a prikupljaju je centrifugiranjem ili filtracijom. Istaloženi enzimi dalje prolaze postupke pročišćavanja kako bi se iz smjese uklonile nečistoće. Tijekom izvođenja isoljavanja bitno je optimirati pH vrijednost i temperaturu otopine kako nebi došlo do denaturacije (Duong-Ly & Gabelli, 2014).

Pomoću ove tehnike iz smjese enzima, mogu se izborom soli i prilagođavanjem uvjeta selektivno taložiti različiti enzimi. Dodatne prednosti ove metode jesu njena jednostavnost, niska cijena i učinkovitost, međutim nije primijenjiva na sve enzime. S obzirom da neki enzimi

prolaze kroz konformacijske promjene tijekom taloženja ili pak pokazuju nisku topljivost, za njih je potrebno odabrati drugačiju metodu (Duong-Ly & Gabelli, 2014).



Slika 10. Postupak isoljavanja (<https://www.slideshare.net/AfraFathima5/ammonium-sulphate-precipitation>)

3.3.4. Ostale metode izolacije

Već prije spomenute, ostale metode izolacije enzima jesu centrifugiranje, filtracija, ekstrakcija i razbijanje stanica. Razbijanje stanica prvi je korak izolacije u kojem se otvaraju same stanice kako bi se oslobodio unutarstanični enzim. Stanice se mogu razbiti mehanički, primjerice mljevenjem, enzimskom razgradnjom ili ciklusima smrzavanja i odmrzavanja. Centrifugiranje se obično koristi za odvajanje staničnih ostataka, organela i drugih netopivih komponenti od topljivog enzima. Diferencijalno centrifugiranje, gdje se uzorci podvrgavaju više krugova centrifugiranja pri rastućim brzinama, omogućuje odvajanje različitih staničnih komponenti na temelju njihove brzine sedimentacije. Mikrofiltracija ili ultrafiltracija koriste se za bistrenje otopine koja sadrži enzime. Koriste se porozne membrane koje uklanjaju veće čestice, a dopuštaju prolaz molekulama enzima. Ekstrakcijom se enzimi dijele između dva otapala koja su međusobno ne mješljiva. Primjenom otapala poželjnih afiniteta, enzim se selektivno ekstrahira u jedno od dva otapala i odvaja (Lorsch, 2013).

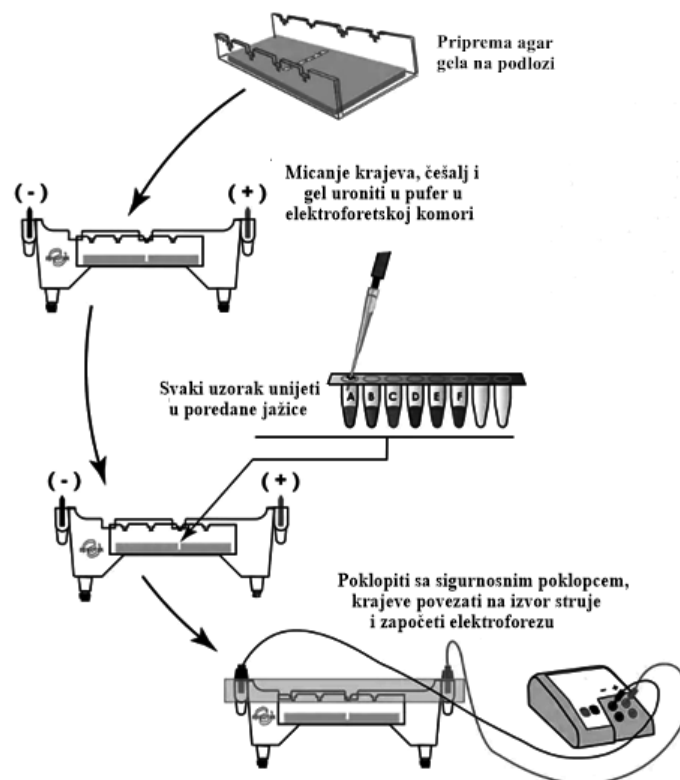
3.3.5. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza je tehnika odvajanja i analize proteina na temelju njihove veličine i naboja. Metoda koristi električno polje za pokretanje nabijenih molekula kroz matricu gela,

omogućujući njihovo odvajanje prema pokretljivosti. Za odvajanje proteina najčešće se koristi poliakrilamidni gel koji stvara mrežu kroz koju molekule mogu migrirati.

Matrica gela priprema se miješanjem akrilamida s otopinom pufera i inicijatorom polimerizacije. Smjesa se zatim izlije u posudu za lijevanje, a češalj se umetne kako bi se napravile jažice za punjenje uzorka. Uzorci koji se analiziraju obično se miješaju s puferom za punjenje koji sadrži boje za praćenje. One pomažu u praćenju napretka elektroforeze. Uzorci su denaturirani i često tretirani redukcijskim sredstvom kako bi se razbile disulfidne veze. Pripremljeni uzorci pažljivo se nanose u jažice gela pomoću mikropipete. Posuda s gelom stavlja se u komoru za elektroforezu ispunjenu vodljivom puferom koja prekriva gel. Na krajevima komore postavljene su elektrode spojene na izvor napajanja. Kada se primijeni električna struja, negativno nabijene molekule migriraju prema pozitivno nabijenoj elektrodi i obrnuto. Na brzinu utječu veličina i naboj (slika 19).

Nakon završenog odvajanja, obojeni enzimi mogu se dalje analizirati (Costumbrado i sur., 2012).



Slika 19. Postupak gel elektroforeze (<https://microbeonline.com/agarose-gel-electrophoresis/>)

3.3.7. Kromatografija

Kromatografska tehnika odvajanja enzima u složenoj smjesi temelji se na razlici u interakciji sa mobilnom (eluens) i stacionarnom fazom. Smjesa prolazi kroz kromatografsku kolonu koja sadrži stacionarnu fazu. Odabir faze ovisi o naboju, afinitetu, veličini i hidrofobnosti željenog enzima. Prolaskom smjese enzimi se zadržavaju u stacionarnoj fazi, dok ostatak prolazi kroz kolonu. Potom pomoću eluensa skupljaju se eluirane frakcije enzima za daljnju analizu. Za pročišćavanje enzima koriste se različite vrste kromatografskih metoda, uključujući afinitetnu kromatografiju, kromatografiju ionske izmjene, kromatografiju sa isključivanjem veličine, kromatografiju hidrofobnih interakcija i afinitetnu kromatografiju imobiliziranih metalnih iona. Ove tehnike nude različitu selektivnost i mogu se koristiti pojedinačno ili u kombinaciji za postizanje visoke čistoće i prinosa ciljanog enzima (De Gonzalo & Lavandera, 2021) (slika 20).

Afinitetna kromatografija koristi interakcije enzima i liganda imobiliziranog na čvrstu fazu. Ligand može biti protutijelo, metalni ion, mala molekula ili supstratni analog koji se selektivno veže na ciljani enzim čime je omogućeno specifično pročišćavanje (De Gonzalo & Lavandera, 2021).

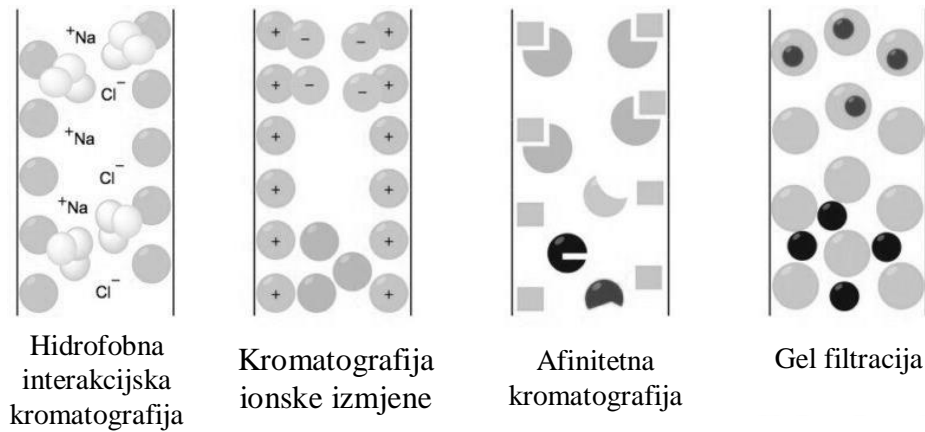
Kromatografija ionske izmjene razdvaja enzime na temelju razlika u naboju. Stacionarna faza kromatografske kolone sadrži ili pozitivno nabijene skupine (kromatografija kationske izmjene) ili negativno nabijene skupine (kromatografija anionske izmjene). Enzimi sa suprotnim nabojem u odnosu na stacionarnu fazu se povežu, dok drugi prolaze kroz kolonu, a nakon se vezani proteini eluiraju (De Gonzalo & Lavandera, 2021)..

Kromatografija sa isključenjem veličine ili takozvana gel filtracija razdvaja proteine na temelju njihove veličine ili molekularne težine. Stacionarna faza sastoji se od porozne matrice ili kuglica gela s definiranom veličinom pora. Manji proteini ulaze u pore i treba im više vremena da se eluiraju, dok veći proteini prolaze kroz međuprostor i eluiraju brže (De Gonzalo & Lavandera, 2021.).

Hidrofobna interakcijska kromatografija razdvaja proteine na temelju njihove hidrofobnosti. Stacionarna faza obično se sastoji od hidrofobnih liganada, kao što su alkilni lanci, koji stupaju u interakciju s hidrofobnim regijama proteina. Elucija se postiže smanjenjem koncentracije hidrofobnih sredstava (De Gonzalo & Lavandera, 2021.).

Afinitetna kromatografija imobiliziranih metalnih iona koristi specifični afinitet ostataka histidina u proteinima za metalne ione, tipično imobilizirane na kromatografskoj matrici.

Metalni ioni vežu se za ostatke histidina, omogućujući selektivno pročišćavanje proteina označenih histidinom (De Gonzalo & Lavandera, 2021).



Slika 11. Kromatografske metode (<https://bitesizebio.com/30007/how-chromatography-works/>)

4. ZAKLJUČAK

Biokatalizatori odnosno enzimi i katalizatori koriste za ubrzavanje kemijskih i biokemijskih reakcija. Njihove sposobnosti dovode do znatnog razvitka industrije, poboljšanja životnih uvjeta i svakodnevno korištenih proizvoda. Esencijalni su za žive organizme i njihov opstanak. Svaki enzim izgrađen je od kombinacija 20 različitih aminokiselina, te svaki ovisno o njegovoj trodimenzionalnoj strukturi, nosi određenu funkciju. Potrošnja i potražnja za enzimima znatno raste, što dovodi do razvitka metoda pomoću kojih se preko živih stanica mogu proizvoditi enzimi po njihovoj potrebi. Najkorištenije metode proizvodnje specifičnih enzima jesu mikroba fermentacija, kultura biljnih te kultura životinjskih stanica. Mikroba fermentacija koristi mikroorganizme poput gljivica, kvasaca i bakterija. Kultura biljnih stanica procesom genetičkog inženjeringa biljaka omogućuje uvođenje željenog enzima u genom biljke, najčešće posredstvom bakterije *Agrobacterium*. Kultura životinjskih stanica koristi stanice izolirane iz tkiva životinja, najčešće stanice jajnika kineskog hrčka. Mogućnosti proizvodnje specifičnih enzima znatno je doprinijela DNK rekombinantna tehnologija koja omogućuje manipulaciju molekule DNK. Proces uključuje izolaciju željenog gena, koji se iz vektora za kloniranje transformacijom uvodi u stanice domaćina. Enzim se pročišćava kako bi se uklonile neželjene komponente i zatim karakterizira.

5. POPIS LITERATURE

1. Al-Maqtari, Q. A., Waleed, A. A., & Mahdi, A. A., Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry-A review. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 8(1) (2019) 2319-1473.
2. Altman, A., & Hasegawa, P. M., *Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century*, New York, Academic Press, 2011. str. 213
3. Bach-Dragutinović, G., Kataliza. *Tehnička enciklopedija 1963-97.*, Zagreb, JLZ / LZ Miroslav Krleža, 2018, str. 708-724.
4. Bajpai, R. K. & Prokop, A., *Recombinant DNA technology* (Vol. 1). Allied Publishers, New Delhi, 1991., str. 1-8
5. Bender, M.L., Bergeron R.J. i Komiyama M., *The bioorganic chemistry of enzymatic catalysis*, Wiley-Interscience; New York, 1984, str. 117
6. Berg, J., Tymoczko, J., & Strye, L., *Biokemija*. Zagreb: Školska knjiga, 2013. str. 115-443.
7. Bommarius, A. S., & Riebel-Bommarius, B. R. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Weinheim, John Wiley & Sons., 2004. str. 3-18.
8. Bond, G., Louis, C., & T Thompson, D. Introduction to Catalysis. u *Catalytic science series: Volume 6*, (2006) (1–21).
9. Bortesi, L., Schiermeyer, A., Schillberg, S., Fischer, R., & Jansing, J. Genome Editing in Agriculture: Technical and Practical Considerations. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12) (2019) 2888.
10. Boyington, J. C., Sun, P. D. & Foster, C. E., Overview of Protein Structural and Functional Folds. *Current Protocols in Protein Science*, 35(1) (2004) 35-42
11. Brady, D. & Sheldon, R. A., Streamlining Design, Engineering, and Applications of Enzymes for Sustainable Biocatalysis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(24) (2021) 8032–8052.
12. Bühler, B., Schmid, A., Hollmann, F., Park & J. B., The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4) (2002) 359–366.
13. Butler, M. *Animal Cell Culture and Technology.*, Independence, Taylor & Francis. 2004. str. 37-71
14. Cao, Z., Su, B., & Shi, Z., Exploration of Earth-Abundant Transition Metals (Fe, Co, and Ni) as Catalysts in Unreactive Chemical Bond Activations. *Accounts of Chemical Research*, 48(3) (2015) 886–896
15. Carboue, Q., Trainer, M., Gaimé, I., Roussos, S., Production of Microbial Enzymes by Solid-state Fermentation for Food Applications, Boca Raton, CRC Press eBooks 2017 str. 437–451
16. Castro, G. R., Illanes, A., Wilson, L., & Cauerhff, A., Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115, (2012) 48–57.
17. Chapman, J., Ismail, A., & Dinu, C. Z., Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 8(6) (2018) 238.

18. Chen, H., Modern solid state fermentation. Netherlands, *Springer.*, 2013. str. 64-70
19. Chen, J., Du, G., Liu, L., Wang, Z., Zhang, D. & Li, J., Advances in microbial production of alkaline polygalacturonate lyase and its application in clean production of textile industry *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*, 25(12), (2009) 1819–1828.
20. Chien, A., Edgar, D. B., & Trela, J. M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, (1976). 127(3), 1550–1557.
21. Christou, P., Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S. & Twyman, R. M., Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), (2004) 152–158.
22. Costumbrado, J., Lee, P. C., Hsu, C., & Kim, Y. J., Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (2012) 62.
23. Cui J, Zheng G-W, Black G, Iqbal H.M.N. and Bilal M., Editorial: Enzyme Biocatalysts: Design and Application. *Frontiers in Chemistry* (2022) 10:851857.
24. Dalby, P. A. & Hibbert, E. G., Directed evolution strategies for improved enzymatic performance. *Microbial Cell Factories*, 4(1). 2015 13-22
25. Daniel, R. T., Peterson, M. E., Danson, M. J., Price, N. C., Kelly, S. M., Monk, C. R., Weinberg, C. S., Oudshoorn, M. L., & Lee, C. , The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemical Journal*, 425(2) (2010) 353–360.
26. Davis, R., Narancic, T., Nikodinovic-Runic, J., & O'Connor, K. E., Recent developments in biocatalysis beyond the laboratory. *Biotechnology Letters*, 37(5), (2015) 943–954
27. De Gonzalo, G., & Lavandera, I., *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications.*, Weinheim, John Wiley & Sons, 2021 str. 20-65
28. Deutschmann, O., Knözinger, H., Kochloefl, K. and Turek, T., Heterogeneous Catalysis and Solid Catalysts, 2. Development and Types of Solid Catalysts, u Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim, John Wiley & Sons., 2011. str. 107-132
29. Drauz, K., Gröger, H., & May, O., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, 3 Volume Set.* Weinheim, John Wiley & Sons., 2012 str. 1-39
30. Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B., Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in Enzymology*, (2014) 85–94.
31. Finnern, R. & Schillberg, S., Plant molecular farming for the production of valuable proteins – Critical evaluation of achievements and future challenges. *Journal of Plant Physiology*, 258–259, (2021) 153359.
32. Fuderer, P., Kataliza i katalizatori. Tehnička knjiga, Zagreb, 1967 str. 35-93
33. Fujita, H., Horie, M., Yamano-Adachi, N., Kawabe, Y., Kaneoka, H., Nagamori, E., Iwai, R., Sato, Y., Kanie, K., Ohta, S., Somiya, M., & Ino, K., Recent advances in animal cell technologies for industrial and medical applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (2022), str. 4-76

34. Ghisalba, O., Meyer, H., & Wohlgemuth, R., Industrial Biotransformation. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 2010, str. 23-35
35. Goldstein, D., & Thomas, J. P., Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM: An International Journal of Medicine*, 97(11) (2004) 705–716.
36. Harding, K. G., Dennis, J. E., Von Blottnitz, H., & Harrison, S. P., A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. *Journal of Cleaner Production*, 16(13) (2008) 1368–1378.
37. Heckmann, C. M., & Paradisi, F., Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools. *Chemcatchem*, 12(24) (2020) 6082–6102.
38. Held, M., Schmid, A. K., Van Beilen, J., & Witholt, B., Biocatalysis. Biological systems for the production of chemicals. *Pure and Applied Chemistry*, 72(7) (2000) 1337–1343.
39. Hou, H., Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S. & Yousaf, M. H., Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, (2016), 1–14.
40. Hou, S. R., Wuest, D., & Lee, K. S., Metabolic Engineering. U: Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon (2011) 617–628
41. <http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture23.html> (posjećeno 08. lipnja 2023.)
42. <https://bitesizebio.com/30007/how-chromatography-works/>(posjećeno 15 lipnja 2023)
43. <https://cbseacademics.com/chapter-12-biotechnology-and-its-application-class-12-biology-notes-and-questions/> (posjećeno 08. lipnja 2023.)
44. <https://gkscientist.com/watson-and-crick-model-of-dna/> (posjećeno 08. lipnja 2023.)
45. <https://gott.blog.gov.uk/2020/11/23/leaf-expression-systems-how-harnessing-the-power-of-plants-is-changing-the-future-of-our-medicines/> (posjećeno 08. lipnja 2023.)
46. <https://homework.study.com/explanation/explain-transition-state-theory-and-draw-a-transition-state-diagram-for-a-non-catalyzed-and-an-enzyme-catalyzed-reaction-including-multi-step-reactions.html> (posjećeno 13. svibanj 20)
47. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-022-12342-x> (posjećeno 09. lipnja 2023.)
48. <https://microbenotes.com/enzymes-properties-classification-and-significance/> (posjećeno 13. svibanj 2023)
49. <https://microbenotes.com/enzymes-properties-classification-and-significance/> (posjećeno 13. ožujka 2023)
50. <https://microbeonline.com/agarose-gel-electrophoresis/>(posjećeno 15 lipnja 2023)
51. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/gc/d1gc01852c>(posjećeno 15 lipnja 2023)
52. <https://tehnika.lzmk.hr/bioreaktor/> (posjećeno 12. travnja 2023.)
53. <https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/z88hcj6/revision/2> (posjećeno 12 siječanj 2023.)

54. <https://www.biologicscorp.com/blog/bacterial-fermentation-definition/> (posjećeno 08. lipnja 2023.)
55. <https://www.biologybrain.com/anfinsen-experiment-components-and-conclusion/> (posjećeno 26. travanj 2023.)
56. <https://www.britannica.com/science/denaturation> (posjećeno 24. travnja 2023.)
57. <https://www.britannica.com/science/enzyme> (posjećeno 12. siječanj 2023.)
58. <https://www.britannica.com/science/photoprotein> (posjećeno 11. svibanj 2023.)
59. https://www.creative-enzymes.com/resource/enzyme-definition-and-classification_18.html (posjećeno 23. travanj 2023.)
60. <https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-organsku-kemiju-i-biokemiju/Laboratorij-za-stereoselektivnu-sintezu-i-biokatalizu/Clanci/Istrazivanja/Biokataliza> (posjećeno 16. travanj 2023.)
61. <https://www.slideshare.net/AfraFathima5/ammonium-sulphate-precipitation> (posjećeno 15 lipnja 2023)
62. Ibrahim, C., Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Bioresource Technology*, (2000), str. 22-68
63. Imam, H., Marr, P. C., & Marr, A. C., Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. *Green Chemistry*, 23(14) (2021) 4980–5005.
64. Kara, S., Liese, A., Industrial Enzyme Applications., Weinheim, *John Wiley & Sons, Ltd eBooks.*, 2019 str. 71-93
65. Kim, J. H., Kim, Y., & Lee, G. M., CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3) (2011) 917–930.
66. Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C., Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, (2002), 13(4), 345–351.
67. Koshland, D. E., The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angewandte Chemie*, 33(2324) (1995) 2375–2378.
68. Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. A., The Thermodynamic Hypothesis of Protein Folding: the Work of Christian Anfinsen. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14) (2006) 11–13.
69. Kuo, Y., Henry, R., & Andrews, A. J., Measuring specificity in multi-substrate/product systems as a tool to investigate selectivity in vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(1) (2016) 70–76.
70. Langel, U., Cravatt, B. F., Graslund, A., Von Heijne, N. G. H., Zorko, M., Land, T., & Niessen, S., *Introduction to Peptides and Proteins*. Boca Raton, CRC Press., 2019. str. 29-53
71. Larroche, C., Soccol, C. R., & Pandey, A., *Current developments in solid-state fermentation*. Springer Science & Business Media., 2008 str. 13-38
72. <https://www.biologyexams4u.com/2013/10/steps-in-recombinant-dna-technology.html> (posjećeno 08. lipnja 2023.)

73. Lee, C., A Simple Outline of Methods for Protein Isolation and Purification. *Endocrinology and Metabolism*, 32(1) (2017) 18.
74. Lorsch, J. (2013). *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*. New York, Academic Press. 2013, str. 26-37
75. May, O., Vogel, A., Industrial Enzyme Applications., Weinheim, Weinheim, *John Wiley & Sons, Ltd eBooks.*, 2019 str. 5-398
76. McDonald, A. & Tipton, K., *A Brief Guide to Enzyme Nomenclature and Classification.*, 2018, str. 11-36
77. Mishra, P. C. , Srivastava, M., Ramteke, P. W., & Srivastava, N., Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview. *Elsevier eBooks*, (2019) 345–354.
78. Ogrizek-Tomaš, M., *Evolucija i uspoređivanje.*, Fakultet elektrotehnike i računarstva, seminarski rad, Zagreb, 2011.
79. Patil, S., & Rathod, V. K., Intensification of extraction of biomolecules using three-phase partitioning., *Elsevier eBooks*, (2021) 285–322
80. Pollard, D., & Woodley, J. M. , Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology*, 25(2) (2007) 66–73.
81. Pörtner, R. *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*. New York, Humana, 2021 str. 17-48
82. Reetz, M. T., Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *Journal of the American Chemical Society*, 135(34) (2013) 12480–12496.
83. Sandman, K. M., Willey, J. M., & Wood, D. H. *Prescott's Principles of Microbiology.*, New York, McGraw Hill , 2021., str. 47-65
84. Sanvictores, T., & Farci, F., Biochemistry, Primary Protein Structure. Treasure Island, StatPearls Publishing, 2022. str. 24-35
85. Schwarz, E., Lilie, H., & Rudolph, R., The effect of molecular chaperones on in vivo and in vitro folding processes. *Biological chemistry*, 377(7-8) (1996) 411–416.
86. Scopes, R. K., Enzyme activity and assays. *Encyclopedia of life sciences*, Weinheim, John Wiley & Sons, 2001 str. 3-79
87. Siveri, J., Optimiranje procesa proizvodnje enzima EVOP metodom, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Diplomski rad, Zagreb, 2006
88. Theodorakis, C. W., Mutagenesis. In *Elsevier eBooks* (2008) 2475–2484
89. Towler, M. J., Xu, J., & Weathers, P. J., Platforms for Plant-Based Protein Production. Reference Series in Phytochemistry, (2018) 509–548.
90. Truppo, M. D., Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 8(5), (2017) 476–480.
91. Twigg, M. V., *Catalyst Handbook, Second Edition.*, Boca Raton, CRC Press., 1989., str. 14-432
92. Vedrine, J. C., Heterogeneous Catalysis on Metal Oxides. *Catalysts*, 7(11) (2017) 341.

93. Zhu, D. H., Wu, Q., & Wang, N. , Industrial Biotechnology and Commodity Products. *Comprehensive Biotechnology*. (2011)., 3–13
94. Zrnčević, S., Gomzi, Z., Deaktivacija katalizatora. I. Opće značajke kod projektiranja katalitičkih reaktora, *Kemija u industriji : časopis kemičara i tehnologa Hrvatske*, 31 (1982), 495-503
95. Zrnčević, S., *Kataliza (Catalysis)*., Zagreb, Leksikografski zavod Miroslava krleže, Hrvatska enciklopedija, V svezak , 2003. str. 99-127

6. ŽIVOTOPIS

Lea Vrus [REDACTED] Završila je osnovnoškolsko obrazovanje u Osnovnoj školi Veli Vrh. Pohađala je Gimnaziju Pula, smjer prirodoslovno-matematički. Upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu akademske godine 2019./2020., smjer Primijenjena kemija. U razdoblju od 2020. do 2022. godine bila je učlanjena u studentsku sekciju Hrvatskog društva kemijskih inženjera. Tijekom tog razdoblja sudjelovala je u brojnim projektima te bila dio organizacijske grupe Boje inženjerstva.