

Enzimatska hidroliza proteina iz otpada ljuski rakova

Sabolić, Valentina

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:149:064262>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Valentina Sabolić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Valentina Sabolić

Enzimatska hidroliza proteina iz otpada ljuski rakova

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
2. prof. dr. sc. Elvira Vidović
3. prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić

Zagreb, rujan 2023.

Najljepša hvala prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na posvećenom trudu i vremenu, prenesenom znanju, razumijevanju i strpljenju tijekom izrade ovog završnog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci i razumijevanju tijekom mog dosadašnjeg obrazovanja.

Enzimatska hidroliza proteina iz otpada ljuski rakova

SAŽETAK

Enzimi su biološki katalizatori koji pri definiranim uvjetima ubrzavaju biokemijske reakcije u živim stanicama i izvan njih. Proteaze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu peptidne veze u proteinima. U eksperimentalnom dijelu ovog rada korištene su tri komercijalne proteaze: Alkalaza, Novozyme 37071 i Novo-Pro D, s ciljem hidrolize proteina u otpadu ljuski rakova. Navedeni proces je jedan od koraka izolacije hitina iz ove vrste otpada. Ova biološka metoda uklanjanja proteina ima brojne prednosti ispred kemijskih metoda. Rezultati pokazuju da su sve tri proteaze uspješne u reakciji hidrolize proteina iz otpada rakova, dok je najveći učinak pokazao Novo – Pro D.

Ključne riječi: enzimi, proteaze, hidroliza proteina, otpad ljuski rakova, hitin

Enzymatic hydrolysis of protein in shrimp waste

ABSTRACT

Enzymes are biological catalysts that, under defined conditions, accelerate biochemical reactions inside and outside living cells. Proteases are enzymes that catalyse the cleavage of peptide bonds in proteins. Three commercial proteases were used in this work: Alcalase, Novozyme 37071 and Novo – Pro D, with the aim of hydrolysing proteins in shrimp waste. The mentioned method is one of the steps in the isolation of chitin from this type of waste. This biological method of protein removal has more advantages than chemical methods. The results show that all three proteases are successful in the protein hydrolysis reaction from shrimp waste, while Novo – Pro D showed the greatest effect.

Key words: enzymes, proteases, protein hidrolysis, shrimp waste, chitin

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 2 |
| 2.1. Enzimi | 2 |
| 2.1.1. Enzimi ili biokatalizatori | 2 |
| 2.1.2. Povijest uporabe biokatalizatora | 2 |
| 2.1.3. Nazivlje i struktura | 3 |
| 2.1.4. Prednosti i nedostaci biokatalizatora | 4 |
| 2.1.5. Teorija o djelovanju biokatalizatora | 4 |
| 2.1.6. Kinetika biokataliziranih reakcija | 5 |
| 2.1.7. Stabilnost biokatalizatora..... | 5 |
| 2.1.8. Dobivanje i primjena biokatalizatora | 6 |
| 2.1.9. Proteaze | 7 |
| 2.2. Hitin | 8 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 10 |
| 3.1. Aparatura | 10 |
| 3.2. Analitičke metode | 13 |
| 3.2.1. Postupak određivanja volumne aktivnosti proteaza | 13 |
| 3.2.2. Određivanje koncentracije proteina..... | 14 |
| 3.3. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru | 14 |
| 3.3.1. Ekstrakcija proteina iz krutih uzoraka | 15 |
| 3.3.2. Operacijska stabilnost enzima..... | 15 |
| 3.4. Obrada rezultata | 15 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 17 |
| 4.1. Određivanje aktivnosti proteaza | 17 |
| 4.2. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru | 18 |
| 4.2.1. Operacijska stabilnost enzima..... | 20 |
| 5. ZAKLJUČAK | 25 |
| 6. LITERATURA | 26 |
| 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA | 28 |
| 8. PRILOZI | 30 |
| 9. ŽIVOTOPIS | 32 |

1. UVOD

U preradi rakova za ljudsku prehranu, između 40 – 50 % ukupne mase čini otpad.¹ Nejestivi dio koji zaostaje sastoji se od proteina, hitina, minerala, lipida i ostalih organskih spojeva koji u većim količinama u okolišu mogu uzrokovati problem zbog svoje spore razgradnje. Jedna mogućnost tretiranja ovog otpada je biološka metoda koja podrazumijeva korištenje enzima. Enzimi, ili biokatalizatori, biološke su molekule čija je glavna zadaća ubrzavanje biokemijskih reakcija. Njihova uporaba ekološki je prihvatljiva jer su enzimi biorazgradivi, nastaju iz obnovljivih izvora te stvaraju malo otpada.

Neki sastojci ovog otpada imaju i komercijalnu važnost, a to su hitin i njegov derivat kitosan, koji se međusobno pretvaraju jedan u drugi deacetilacijom. Hitin i kitosan koriste se u raznim granama industrija, a neke su agrokultura, prehrambena industrija i biomedicina. Osim toga, svoju upotrebu pronalaze i u pročišćavanju otpadnih voda pri adsorpciji teških metala i bojila. Kitosan je također vrlo učinkovit u flokulaciji, koagulaciji i dehidraciji aktivnog mulja.² Tradicionalna metoda ekstrakcije hitina podrazumijeva korištenje kemikalija, no ekološki prihvatljiviji izbor je biološka metoda ekstrakcije uz enzime proteaze koji kataliziraju cijepanje proteinske peptidne veze uz prisustvo vode.

U ovom radu ispitivana je primjena tri komercijalne proteaze u reakciji hidrolize proteina iz otpadnih ljusaka rakova. Sve reakcije provedene u eksperimentalnom dijelu ovog rada provodile su se pri uvjetima 50 °C i pH vrijednosti 8.

2. OPĆI DIO

2.1. Enzimi

2.1.1. Enzimi ili biokatalizatori

Enzimi pripadaju biokemijskoj skupini makromolekula poznatoj kao proteini.³ Enzimsku strukturu čine lanci aminokiselina povezanih peptidnim vezama, koji se zatim preklapaju stvarajući trodimenzionalnu strukturu koja čini enzim biološki aktivnim. Primarna uloga biokatalizatora je ubrzavanje biokemijskih procesa u živim organizmima, te su enzimske reakcije u pravilu brže 10^6 do 10^{12} puta od ne kataliziranih reakcija. Aktivni su i izvan stanice, no samo pri uvjetima sličnim u stanici. Ti uvjeti nazivaju se fiziološki, a odnose se na pH vrijednosti koje su neutralne ili blizu neutralnih, temperature koje su blizu sobnih ($20 - 50$ °C) i razrijeđene vodene otopine.⁴ Glavna podjela biokatalizatora temelji se na reakciji koju kataliziraju: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Katalitičko djelovanje biokatalizatora temelji se na njegovoj strukturi, te se oni nazivaju čisti enzimi. Osim njih, postoje i enzimi koji nisu aktivni bez druge neproteinske komponente, zvane koenzim. U tom slučaju proteinska komponenta naziva se apoenzim. Enzimi u kojima se nalaze atomi metala vezani s proteinom nazivaju se metaloenzimi.⁵

2.1.2. Povijest uporabe biokatalizatora

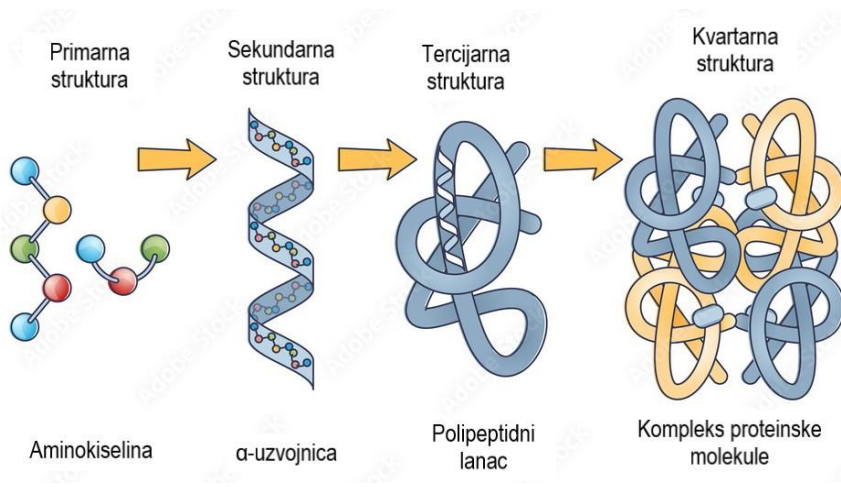
Biokatalizatori upotrebljavaju se još od Antičkog doba, gdje su korišteni za pripremu alkoholnih pića, kiseljenje mlijeka i pripremu sira.⁶ Važno za razumijevanje enzima bilo je otkriće procesa vrenja, za koji je 1857. L. Pasteur utvrdio da ga uzrokuju mikroskopska bića. Od tada su se enzimi nazivali fermentima, dok je njihova uloga otkrivena tek sredinom 19. stoljeća. Njemački fiziolog W. Kühne prvi je upotrijebio izraz enzim 1877. godine pri opisivanju fermentacije, dok je 20 godina kasnije u Njemačkoj otkriveno da u fermentaciji šećera nisu potrebne žive stanice kvasca. Japanski kemičar Jōkichi Takamine prvi je patentirao postupak proizvodnje enzima iz gljivica 1914., no taj postupak ipak nije korišten u industriji zbog neugodnih mirisa i okusa proizvoda (alkohola). Otto Röhm uvelike je utjecao na uporabu enzima u industriji, pa je tako 1908. godine uveo enzime u kožarsku industriju shvativši da se enzimi iz gušterače životinja mogu iskoristiti pri mekšanju sirove kože. Uz to, 1913. godine, Röhm je za uklanjanje mrlja s tekstila počeo koristiti iste enzime koje su nazivali tripsinima. 1930-ih počela je upotreba pektinaza za

bistrenje voćnih sokova, 1950-ih su industrijski proizvedeni enzimi pomoću mikroorganizama uvedeni u pekarstvo, a 1960-ih enzimi izolirani iz gljiva u alkoholnoj industriji zamjenjuju slad.⁷

2.1.3. Nazivlje i struktura

U povijesti, enzimima su se imena davala bez sistema, ali uglavnom završavajući na –in. Neka od tih imena koriste se i danas, na primjer tripsin, pepsin i emulzin. Prema prijedlogu koji je 1898. dao Duclaux, enzimska imena od tada daju se prema vrsti reakcije koju enzim katalizira uz nastavak –aza (oksidaze, reduktaze, izomeraze), ili prema imenu supstrata na koji enzim djeluje, također uz nastavak –aza (proteaze, lipaze, amilaze).⁵

Svi proteini, pa stoga i enzimi, građeni su od 20 aminokiselina, koje izgrađuje samo 5 elemenata periodnog sustava (ugljik, dušik, kisik, vodik i sumpor). Pri nastajanju biokatalizatora, stvaraju se peptidne veze kondenzacijom amino i karboksilne skupine aminokiselina. Struktura biokatalizatora sastoji se od četiri strukturalna nivoa: primarni, sekundarni, tercijarni i kvartarni (*Slika 2.1.*). Primarna struktura načinjena je od aminokiselina povezanih određenim redoslijedom koje čine peptidne lance, a redoslijed povezivanja aminokiselina određuje funkciju biokatalizatora. Sekundarna struktura nastaje kad se peptidni lanci povežu preko vodikovih veza koje stabiliziraju ovu strukturu. Kod sekundarne strukture, postoje dvije mogućnosti: planarna struktura i struktura uzvojnice. Aktivni enzimi mogu biti samo oni tercijarne i kvartarne građe. Tercijarna struktura nastaje preklapanjem peptidnih lanaca. Kvartarna struktura, ujedno i najkompleksnija, izgrađena je od nekoliko podjedinica. Proteini kvartarne strukture su globularni proteini, te ujedno čine i najbolje biokatalizatore.⁶



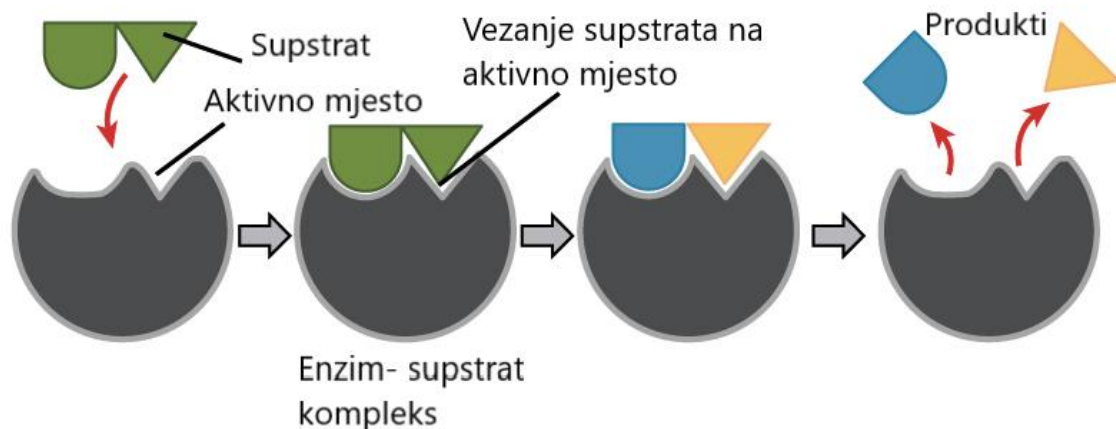
Slika 2.1. Struktura biokatalizatora⁸

2.1.4. Prednosti i nedostaci biokatalizatora

Najvažnija svojstva biokatalizatora su njegova specifičnost i aktivnost. Aktivnost biokatalizatora odnosi se na mogućnost učinkovite katalize uz vrlo malu količinu biokatalizatora, dok se specifičnost očituje u reakcijama sa određenim supstratima. Upravo zbog specifičnog reagiranja enzima, dobiveni produkti su vrlo visokog stupnja čistoće, što je vrlo važno u farmaceutskoj i medicinskoj tehnologiji. Promatrajući s ekološkog stajališta, biokatalizatori su prihvatljiviji za okoliš jer nastaju iz obnovljivih izvora, biorazgradivi su te stvaraju malo otpada. Uz navedeno, reakcije katalizirane biokatalizatorima ne zahtijevaju ekstremne uvjete temperature, tlaka i pH vrijednosti. No ipak, to može postati i nedostatak ako uvjeti nisu točno određeni, jer na taj način može doći do inaktivacije biokatalizatora. Također, neki biokatalizatori su nestabilni izvan svog okruženja ili su ovisni o kofaktoru. Poznato je i da može doći do inhibicije njihovog djelovanja reaktantima ili produktima reakcije.

2.1.5. Teorija o djelovanju biokatalizatora

Teorija biokatalize, ili biokataliza opisuje put reakcije katalizirane biokatalizatorom. Temeljna teorija, koju je 1894. dao Fischer, pretpostavlja da pri vezanju supstrata na aktivno mjesto nastaje međukompleks enzim-supstrat (ES). Naime, da bi se supstrat mogao vezati na aktivno mjesto, strukture aktivnog mjesta enzima i molekule reaktanta moraju si odgovarati kao brava i ključ. Shema nastajanja međukompleksa ES prikazan je na *Slici 2.2*.



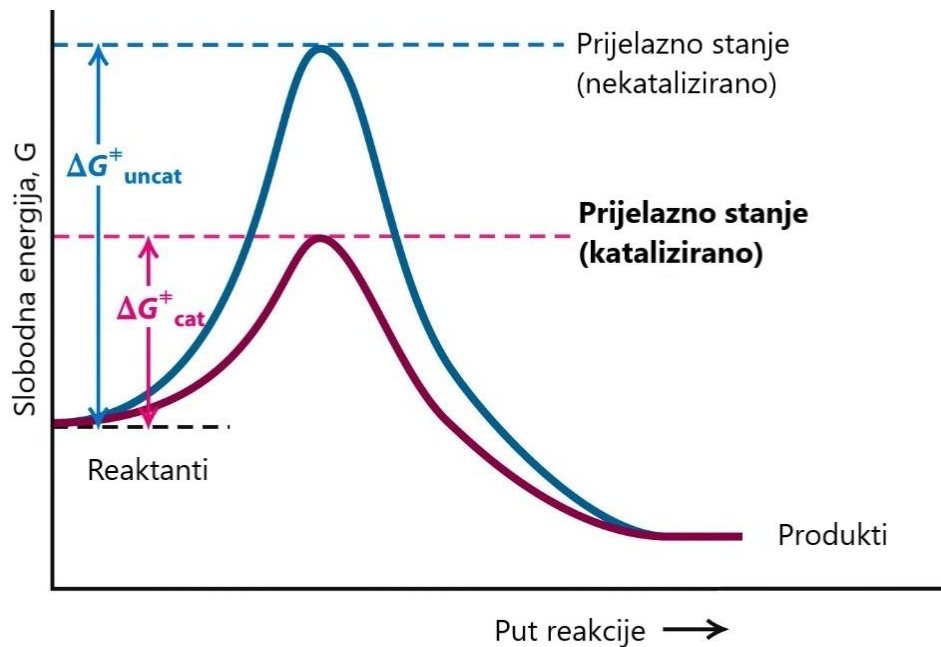
Slika 2.2. Stvaranje ES međukompleksa (prilagođeno iz ⁹⁾)

Pri daljnjim istraživanjima, nastale su nove teorije koje su nadopunjavale temeljnu. Koshland je primijetio da Fischerov model brava ključ ne može objasniti zašto je enzim manje efektivan kad

je određeni dio molekule supstrata uklonjen.¹⁰ 1958. iznio je svoju teoriju prilagođavanja, prema kojoj se enzim aktivira mijenjajući svoj oblik pri vezanju za supstrat. Ova teorija dokazana je nizom ispitivanja strukture enzim – supstrat rendgenskom kristalografijom. Zadnja teorija biokatalize je teorija deformacije, koju je predstavio Jencks. Prema toj teoriji, kataliza se odvija destabilizacijom uz povećanje energije enzim – supstrat kompleksa.¹¹

2.1.6. Kinetika biokataliziranih reakcija

Brzina reakcije postignuta djelovanjem enzima mjera je za njegovu aktivnost.⁵ Biokatalizatori utječu na brzinu reakcije tako što smanjuju energiju aktivacije potrebnu za prijelaz reaktanata u produkte (*Slika 2.3.*). U prisutnosti enzima, taj prijelaz događa se povezivanjem supstrata i enzima u već spomenuti međukompleks, koji se zatim vrlo brzo raspada na nepromijenjeni enzim i produkte reakcije. Taj enzim odmah se može vezati na drugu molekulu supstrata.



Slika 2.3. Smanjenje energije aktivacije (prilagođeno iz ¹²)

2.1.7. Stabilnost biokatalizatora

Stabilnost biokatalizatora je jedan od temeljnih parametara za postizanje visoke volumne produktivnosti u reaktoru.⁴ Definirana je kao ostatak enzimске aktivnosti nakon određenog

vremena. Razlikuju se dvije vrste stabilnosti: operacijska stabilnost i stabilnost biokatalizatora u uvjetima skladištenja. Operacijska stabilnost u obzir uzima aktivnu enzimsku konformaciju, koja ovisi o vezama i interakcijama koje stabiliziraju strukturu enzima, dok stabilnost u uvjetima skladištenja ovisi o fizikalnom stanju biokatalizatora i o uvjetima u kojima se čuva. Operacijska stabilnost važan je parametar kod uporabe biokatalizatora jer je definirana kao vrijeme poluživota biokatalizatora, što označava njegovu stabilnost tijekom kontinuirane uporabe. Kako bi biokatalizator bio isplativ u industrijskom procesu mora biti izrazito stabilan, pa se ne rijetko enzimi prevode u stabilne oblike (*Slika 2.4.*).



Slika 2.4. Metode stabilizacije biokatalizatora⁴

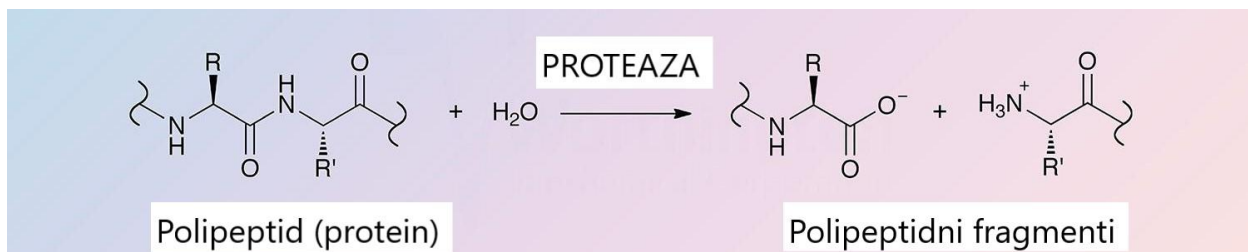
2.1.8. Dobivanje i primjena biokatalizatora

Biokatalizatori se najčešće dobivaju industrijski u procesima biotehnoške proizvodnje. Mogu se dobiti iz mikroorganizama, biljnih ili životinjskih stanica, a svojstva dobivenih enzima mogu se poboljšati primjenom genetičkog i proteinskog inženjerstva. Biokatalizirani procesi jedni su od najvažnijih u prehrambenom inženjerstvu, zbog svoje visoke učinkovitosti i velike čistoće proizvoda. Za dobivanje 1 g pročišćenog enzima potrebno je 100 kg biljnog materijala, 10 kg životinjskog tkiva ili 1 kg mikrobiološke mase, koju je moguće proizvesti u fermentoru od 20 L.⁶

Porastom potražnje i uporabe enzima, danas se najviše enzima industrijski proizvodi iz mikroorganizama, zbog mogućnosti dobivanja velike količine enzima u kratkom vremenu kontrolom hranjenja, rasta i razmnožavanja mikroorganizama. Stoga se enzimi iz biljnih i životinjskih stanica zamjenjuju mikrobnim enzimima. Amilaze, biljni enzimi dobiveni iz žitarica, korišteni su u proizvodnji alkohola vrenjem iz škrobnih sirovina, no danas se umjesto žitarica kao izvor tog enzima koristi bakterija *Bacillus subtilis*. Enzimi životinjskog podrijetla proizvode se iz gušterače svinje, goveda i ovce, a njihova primjena u industriji je mekšanje sirove kože. No danas se i oni zamjenjuju proteazama proizvedenim uz plijesni *Aspergillus flavus oryzae* i bakterije *Bacillus subtilis*. Enzimi pektinaze, industrijski dobiveni iz plijesni rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, koriste se u industriji voćnih sokova pri bistrenju, filtriranju i koncentriranju sokova. Enzimi svoju upotrebu pronalaze i u medicini, gdje se mogu primjenjivati za razgradnju tkiva ili se izravno daju pacijentu kao enzimi koje tijelo samo proizvodi, ali u nedovoljnim količinama. ⁵

2.1.9. Proteaze

Proteaze čine sve enzime koji kataliziraju hidrolizu peptidne veze, tj. djeluju na manje fragmente bjelančevina zvane peptidi (Slika 2.5.). Iz tog razloga, poznate su i pod nazivima peptidaze i proteolitički enzimi. Proteaze su važni enzimi u probavi bjelančevina te dovršavaju njihovu razgradnju do aminokiselina. Podjela proteaza se temelji na području koje enzim katalizira, pa se tako razlikuju endopeptidaze (hidroliza unutar proteina) i egzopeptidaze (hidroliza na krajevima proteina). Neke peptidaze su važne pri imunološkoj aktivnosti organizma jer kataliziraju razgradnju stanične stijenke bakterija, dok su neke programirane u genomima virusa (npr. HIV) te su važne za njihovu reprodukciju, a danas se ispituje inhibicija tih proteaza u terapijama bolesti izazvanih tim virusima. ^{12,13}



Slika 2.5. Reakcija proteaza ¹⁴

Proteaze predstavljaju jednu od tri grupe enzima najčešće produciranih u industriji. Skoro 66% proteaza proizvode mikroorganizmi, a oni koji se najčešće koriste za proizvodnju proteaza u

industriji su iz roda *Bacillus sp.* Proteaze su vanstanični enzimi, što znači da ih tijekom uzgoja stanica izlučuje u svoju okolinu, te stoga nakon provedenog uzgoja određene vrste mikroorganizama one mogu biti izolirane i pročišćene u relativno kratkom vremenu.^{15,16} Proteaze imaju široku primjenu te se koriste u stabilizaciji piva, kod proizvodnje sira koaguliraju kazein što omogućava zrenje sira, pri obradi kože koriste se za omekšavanje kože i čine važne sastojke deterdženata jer imaju mogućnost kataliziranja razgradnje mrlja na bazi proteina.¹⁷

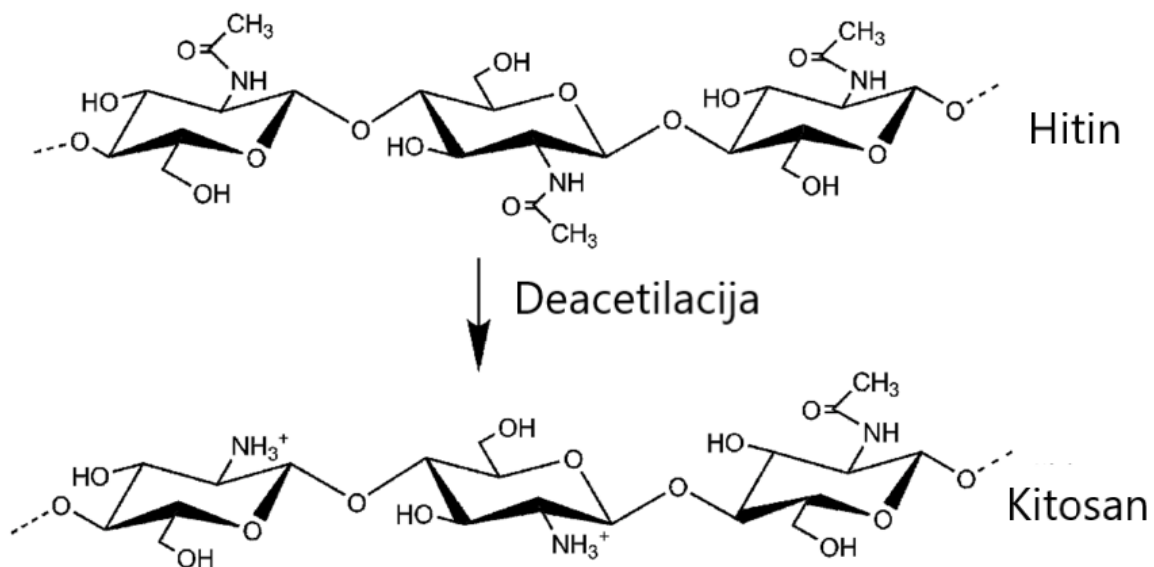
2.2. Hitin

Hitin je najrasprostranjeniji biopolimer u prirodi nakon celuloze. To je linearan polisaharid koji se sastoji od amino šećera N-acetil glukozamina, i čini izvanstanične kosture beskralježnjaka (spužve, mekušci, člankonošci) te zaštitne i stabilizirajuće strukture rakova, jastoga i škampa. 40% ukupnog otpada u preradi rakova za ljudsku prehranu čini upravo hitin, čiji se manji dio suši i koristi za prehranu kokoši, dok se ostatak vraća u more gdje uzrokuje onečišćenje zbog svoje vrlo spore razgradnje.

Hitin se može ekstrahirati iz rakova, kukaca i mikroorganizama, no glavni komercijalni izvori su ljuštore rakova, škampa i jastoga. Ekstrakcija hitina provodi kemijski ili biološki. Kemijska ekstrakcija provodi se u dva koraka, gdje se u prvom koraku odvajaju proteini korištenjem baza (NaOH). Drugi korak kemijske ekstrakcije je demineralizacija, tj. uklanjanje kalcij karbonata i kalcij fosfata kiselinama (HCl). Biološka ekstrakcija koristi mikroorganizme, te se uz proteolitičke bakterije koje služe uklanjanju proteina, najčešće koriste bakterije mliječne kiseline u svrhu demineralizacije, jer reakcijom mliječne kiseline s kalcijevim karbonatom nastaje kalcijev laktat.

^{1,2}

Uz hitin, derivat kitosan također je široko upotrebljavan te ima veliku komercijalnu važnost. Hitin i kitosan međusobno se pretvaraju jedan iz drugoga deacetilacijom (*Slika 2.6.*). Kitosan, za razliku od hitina, ima slobodnu aminoskupinu koja ga čini topljivijim u kiselim uvjetima jer se može protonirati.



Slika 2.6. Strukture hitina i kitosana (prilagođeno iz ¹⁸)

Neka svojstva hitina i kitosana koja ih čine vrijednima pri uporabi u biomedicini, prehrambenoj industriji i agrokulturi su netoksičnost, biorazgradnja u ljudskom tijelu, kompatibilnost te antibakterijski i imunološki učinak. Hitin i kitosan pronalaze svoju upotrebu i u pročišćavanju otpadnih voda pri adsorpciji teških metala i bojila, a kitosan je vrlo učinkovit kod flokulacije, koagulacije i dehidracije aktivnog mulja korištenog pri obradi otpadne vode.¹⁹

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Prvi dio eksperimentalnog dijela rada bio je određivanje volumne aktivnosti za tri proteaze, nakon čega se provela hidroliza proteina i određivanje njihove koncentracije. Na kraju se ispitivala preostala aktivnost proteaza nakon hidrolize.

3.1. Aparatura

U svrhu otapanja kazeina korištena je miješalica u sklopu koje je uključen i grijač, prikazana na slici 3.1. Kazein se grijao u vodenoj kupelji koja se zagrijava pomoću grijača, a temperatura vodene kupelji provjeravala se termometrom koji je bio postavljen u čašu.



Slika 3.1. Miješalica s magnetom

Za vaganje otpada kozica korištena je analitička vaga proizvođača *Shimadzu*, prikazana na *Slici 3.2.*



Slika 3.2. Analitička vaga Shimadzu AUW 120

Termostatirana tresilica prikazana na *Slici 3.3.* korištena je kod inkubacije uzoraka na definiranim temperaturama pri kojim su se provodile analitičke metode u ovom radu.



Slika 3.3. Tresilica Thermo Scientific™

Za odvajanje taloga i supernatanta korištena je centrifuga s rotorom za male kivete (*Slika 3.4. a) i b).*



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

Dva spektrofotometra prikazana na *Slici 3.5. a) i b)* korištena su za mjerenje apsorbancije (ABS).



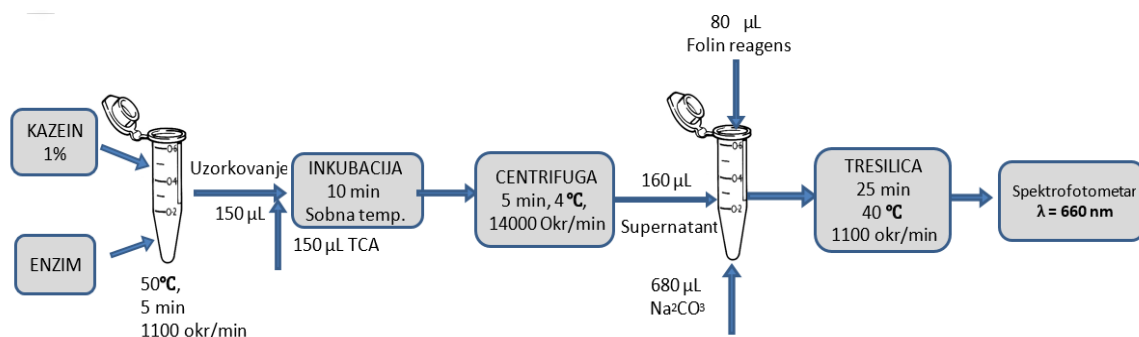
Slika 3.5. Spektrofotometar Shimadzu a) UV-1601 i b) UV-1800

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Postupak određivanja volumne aktivnosti proteaza

Aktivnost proteaza se određivala u reakciji hidrolize kazeina, pri čemu kao produkt nastaje tirozin. Na početku određivanja aktivnosti napravljen je baždarni pravac za tirozin, koji se nalazi u poglavlju *Prilozi (Slika 8.1.)*. Kod pripreme baždarnog pravca mjerene su apsorbancije za poznate koncentracije otopine tirozina. Koncentracija tirozina određivala se uz Folin reagens i mjerenje apsorbancije na spektrofotometru pri valnoj duljini od 660 nm.

Shematski prikaz određivanja volumne aktivnosti prikazan je na *Slici 3.6.*



Slika 3.6. Prikaz određivanja volumne aktivnosti

Prije početka određivanja aktivnosti enzima, pripravljena je 1%-tna otopina kazeina. Dok se ta otopina zagrijavala na miješalici u vodenoj kupelji pri temperaturi od 75 °C, priređeno je zadano razrjeđenje enzima. Aktivnost se određivala u šaržnom reaktoru na tresilici na 50 °C i 1100 o/min. U reaktoru je pomiješano 900 µL otopine kazeina i 900 µL otopine enzima. Iz reaktora su uzimani uzorci tijekom prvih pet minuta reakcije. Za zaustavljanje reakcije korištena je trikloroocetna kiselina (TCA), čiji se volumen od 150 µL prethodno pripremio u epruvete. Iz reaktora je uziman uzorak od 150 µL i stavljan u epruvete koje u sadržavale TCA. Nakon toga uslijedila je inkubacija uzoraka 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim su uzorci centrifugirani na 14 000 o/min, 4 °C tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja, 160 µL supernatanta miješa se s 680 µL 0,5 M otopine natrijevog karbonata, te 80 µL 2 M Folin reagensa. Dodatkom Folin reagensa uzorak je stavljen na inkubaciju na tresilicu, pri uvjetima od 40 °C i 1100 o/min. Nakon inkubacije od 25 minuta, uzorak je prebačen u kvarcnu kivetu te je mjerena apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 660 nm. Volumna aktivnost određivala se iz promjene apsorbancije u vremenu prema sljedećoj jednadžbi:

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

Oznaka V_r predstavlja ukupni volumen reaktora, izražen u mL. ε_{660} je ekstincijski koeficijent pri valnoj duljini od 660 nm, izražen u $\text{cm}^2\mu\text{mol}^{-1}$, a njegova je vrijednost jednaka vrijednosti nagiba baždarnog pravca za tirozin (*Prilozi, Slika 8.1.*). Oznaka d je promjer kivete (1 cm), a V_{enzim} volumen dodanog enzima, izražen u mL. Vrijednost omjera $\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$ predstavlja promjenu apsorbancije u vremenu, te je izražena u min^{-1} . U poglavlju *Prilozi na Slici 8.2.* dan je primjer rezultata mjerenja aktivnosti proteaze.

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u krutim uzorcima određivana je primjenom Bradfordove metode. Prvi korak ove metode bio je pripremiti Bradfordov reagens na sljedeći način: 100 mg bojila Commassie Brilliant blue otapa se u smjesi 50 mL 95% etanola i 100 mL 85% ortofosforne kiseline te se do volumena od 1 L dodaje ultra čista voda. Dobivena smjesa se zatim višestruko filtrira kroz 0,45 μm šprica filter do smeđe boje. Pripremljeni reagens se čuvao u hladnjaku na 4 °C u staklenj boci omotanoj folijom. Reagens se otprilike sat vremena prije korištenja stavio na sobnu temperaturu uz lagano miješanje na magnetskoj miješalici. Mjerenje se provodi u plastičnim kivetama na spektrofotometru na dvije različite valne duljine, 450 nm i 595 nm. U kivetu se pripremi 500 μL uzorka u koji se doda 500 μL Bradfordovog reagensa, nakon čega slijedi inkubacija od 10 minuta na sobnoj temperaturi, te se zatim provodi mjerenje. Baždarni pravac korišten kod određivanja koncentracije proteina nalazi se na *Slici 8.3.* u poglavlju *Prilozi.*

3.3. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru

Hidroliza proteina odvijala se s tri enzima (Alkalaza, Novo-ProD i Novozyme) u kotlastim reaktorima volumena $V_{reaktor} = 100 \mu\text{L}$ pri 50 °C. Koncentracija enzima bila je podešena na 0,5 U / 10 mg otpada kozica. U reaktor se dodao određeni volumen 50 mM Tris-HCl pufera pH 8 i 20 mg otpada kozica. Reakcija je zatim pokrenuta dodatkom definiranog volumena 10 puta razrijeđenog enzima. Reaktori su stavljeni na tresilicu (50 °C, 1100 o/min) te je reakcija za svaki enzim praćena svakih 15, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta. Nakon proteklog vremena, reakcija je zaustavljena tako što se reaktor prebacio u centrifugu podešenu na 4 °C, 14 000 o/min tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja, odvojeni su supernatant i talog. Aktivnost proteaze odredila se u supernatantu

prema načinu opisanom u *Poglavlju 3.2.1*. Talog se isprao s 50 mM Tris-HCl puferom pH 8 te se iskoristio za određivanje koncentracije proteina, čiji je postupak opisan u sljedećem poglavlju.

3.3.1. Ekstrakcija proteina iz krutih uzoraka

Ekstrakcija proteina provođena je dodatkom 366 μL ultra čiste vode, 10%-tne otopine NaCl i 60 μL NaOH u isprane taloge. Reaktori su zatim stavljeni na inkubaciju na tresilicu pri 40 $^{\circ}\text{C}$ i 1100 o/min tijekom 1 sata. Nakon inkubacije slijedilo je centrifugiranje tijekom 5 minuta na 4 $^{\circ}\text{C}$ na 14 000 o/min. U odvojenom supernatantu određena je koncentracija proteina Bradford metodom, opisanom u *Poglavlju 3.2.2*.

3.3.2. Operacijska stabilnost enzima

Iz izmjerenih aktivnosti enzima procjenjivala se njihova operacijska stabilnost. Za opis inaktivacije enzima korištena su tri modela inaktivacije: kinetika 1. i 2. reda (Jedn. 2 i 3), te troparametarski model (Jedn. 4).

Kinetika prvog reda opisana je sljedećom jednadžbom:

$$\frac{dA}{dt} = -k_D A \quad (2)$$

Kinetika drugog reda prikazana je sljedećom jednadžbom:

$$\frac{dA}{dt} = -k_d A^2 \quad (3)$$

Troparametarski model prikazuje se sljedećim izrazom:

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

Ovaj model se temelji na pretpostavci da se enzim sastoji od dva izoenzima koji se inaktiviraju različitim brzinama. U jednadžbi A_0 predstavlja početnu aktivnost enzima, α prikazuje udio izoenzima, a k_{d1} i k_{d2} su inaktivacijske konstante za svaki izoenzim.

3.4. Obrada rezultata

Za obradu rezultata korišten je programski paket *Scientist*, u kojem je moguće procijeniti parametre modela na temelju dobivenih eksperimentalnih rezultata i pretpostavljenih modela. Parametri modela procijenjeni su korištenjem metode najmanjih kvadrata i simpleks metode. Metoda najmanjih kvadrata temelji se na dobivaju najpogodnijih vrijednosti nagiba a i odsjeka

pravca b. Kako inače nije moguće dobiti pravac koji prolazi kroz sve dobivene točke, pronalazi se onaj koji prolazi najbliže svim dobivenim točkama. Dobiveni pravac naziva se regresijski pravac i daje linearnu korelaciju između skupa podataka.²⁰ Druga korištena metoda je simpleks metoda. Simpleks metodom se problem linearnog optimiranja (odabir najboljeg rješenja) rješava iteracijama (uzastopno uvrštavanje približnih rješenja i dobivanje sve točnijih rezultata). Linearno optimiranje svodi se na određivanje dopustivog ekstremnog rješenja, te ako optimalno rješenje nije ostvareno, provode se slijedeće iteracije dok se ne postigne rješenje u skladu s postavljenim ciljem.²¹ Simulacije u programu *Scientist* provode se rješavanjem diferencijalnih jednadžbi, pomoću numeričkih metoda kao što su Runge-Kutta IV, Eulerova metoda i ostale. Standardna devijacija (R^2) i kriterij odabira modela (*Model Selection Criterion, MSC*), često su korišteni za statističku usporedbu modela. *MSC* kriterij prikazan je sljedećom jednadžbom:

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

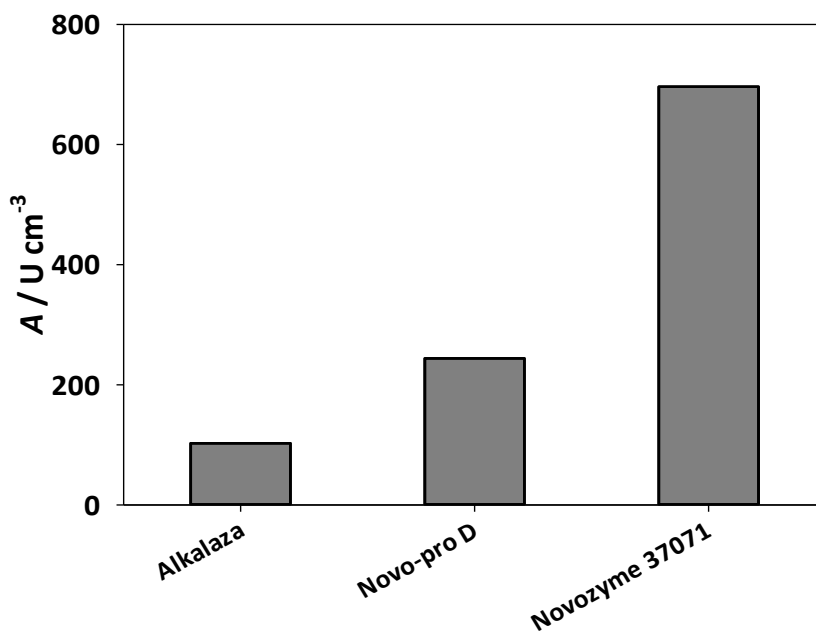
U jednadžbi, w_i odnosi se na parametre za uzorke podataka. $Y_{exp,i}$ su eksperimentalno dobiveni podaci, dok $\overline{Y_{exp}}$ označava aritmetičku sredinu tih vrijednosti. Oznaka n u drugom članu je ukupan broj podataka, dok $2p$ označava ukupan broj procijenjenih parametara.²²

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti mogućnost upotrebe tri komercijalne proteaze u procesu deproteinizacije otpada ljski kozica. Korištene proteaze su Alkalaza, Novo-Pro D i Novozyme 37071, od proizvođača Novozyme. Sva ispitivanja provodila su se pri 50 °C, pri koncentraciji enzima 0,5 U / 10 mg otpada kozica. Kao prvi korak odredila se aktivnost enzima kako bi proces mogao započeti s točno određenom koncentracijom biokatalizatora. Zatim su se provodili eksperimenti u kojima se određivala koncentracija proteina i aktivnost enzima u definiranim vremenskim intervalima.

4.1. Određivanje aktivnosti proteaza

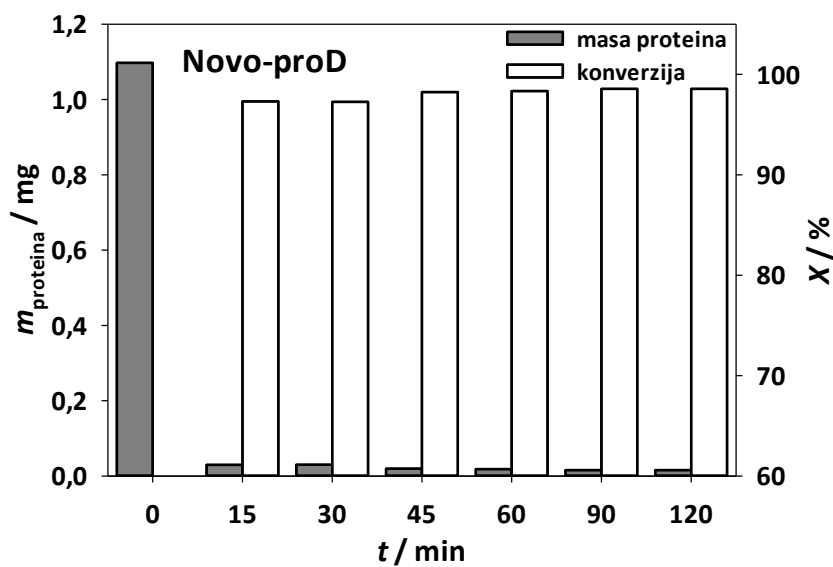
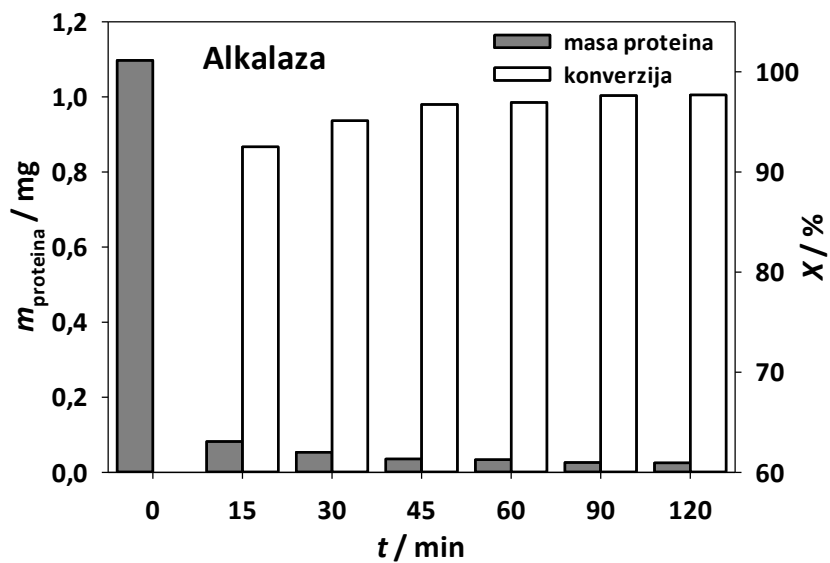
Aktivnost tri proteaze određivala se prema metodi opisanoj u *Poglavlju 3.2.1*. Dobiveni rezultati prikazani su na *Slici 4.1*. Prema dobivenim rezultatima, najveću aktivnost pokazala je proteaza Novozyme 37071, manju aktivnost pokazala je proteaza Novo-Pro D, dok je najmanju aktivnost pokazala Alkalaza.

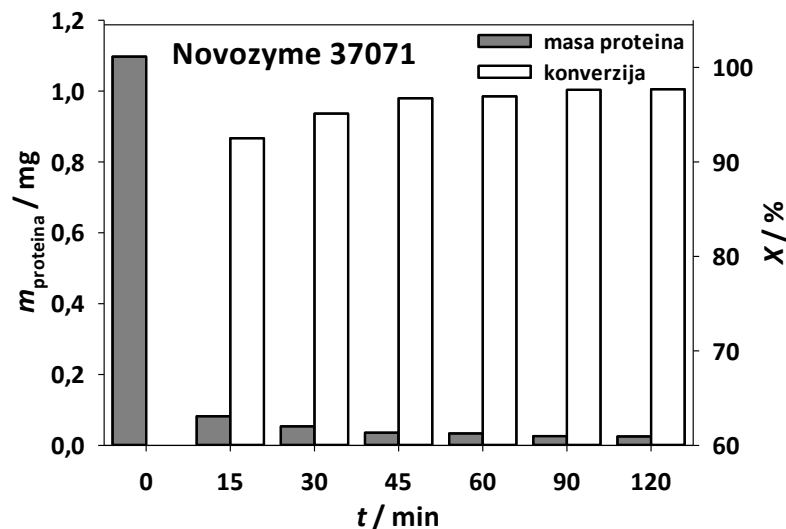


Slika 4.1. Usporedba aktivnosti ispitivanih proteaza

4.2. Hidroliza proteina u ostacima kozica u reaktoru

Hidroliza proteina u ostacima kozica provodila se u šaržnom reaktoru pri koncentraciji enzima od 0,5 U / 10 mg ostataka kozica. Dobiveni rezultati prikazani su na *Slici 4.2*.

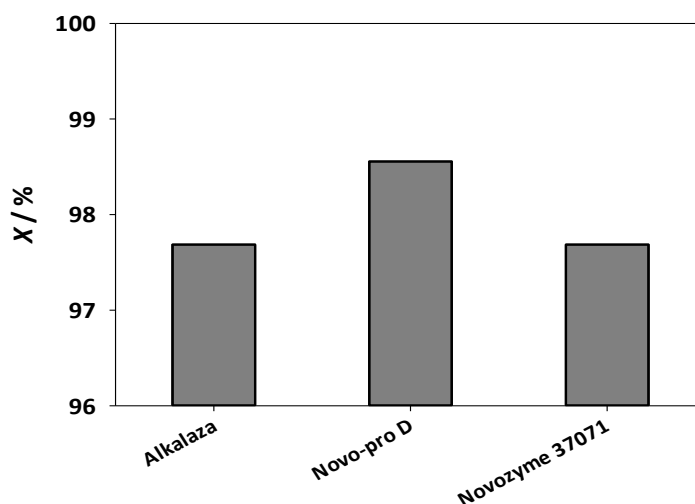




Slika 4.2. Masa proteina i konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH 8, $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$, $m_{\text{kozica}} = 20\text{ mg}$, $A_{\text{proteaze}} = 1\text{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

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su već nakon 15 minuta provođenja ispitivanja dobivene visoke vrijednosti konverzije. Iz toga se može zaključiti da su korišteni enzimi vrlo aktivni u hidrolizi proteina u ostacima kozica.

Na Slici 4.3. dana je usporedba konverzija tijekom hidrolize proteina katalizirana proteazama.

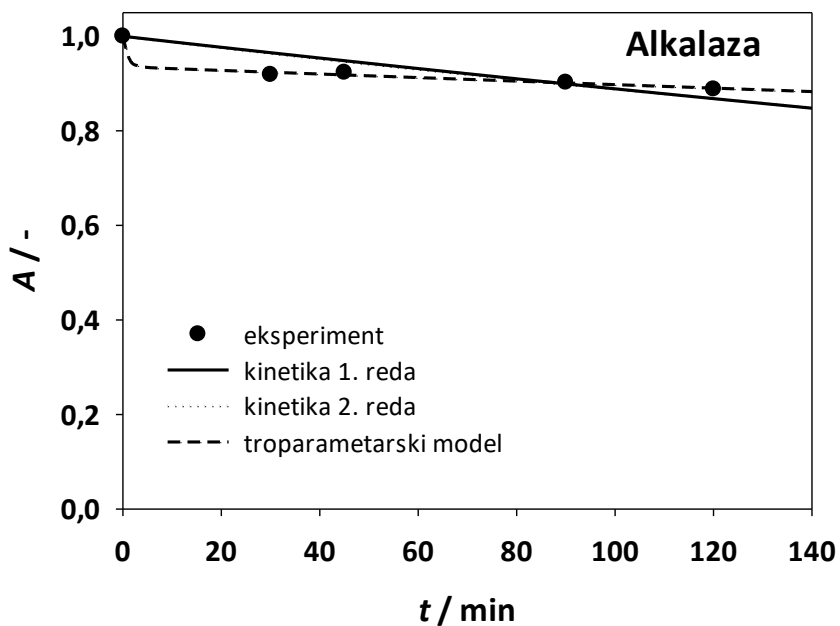


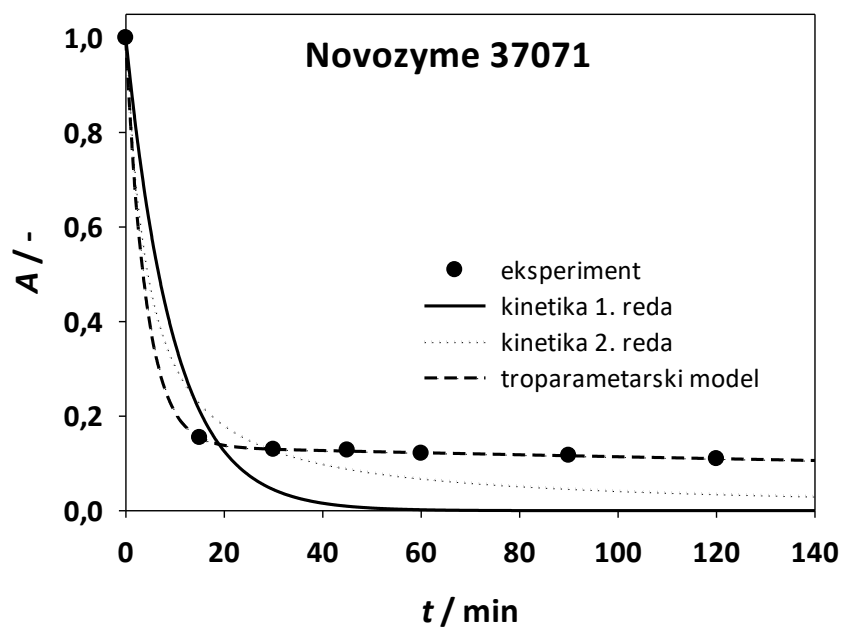
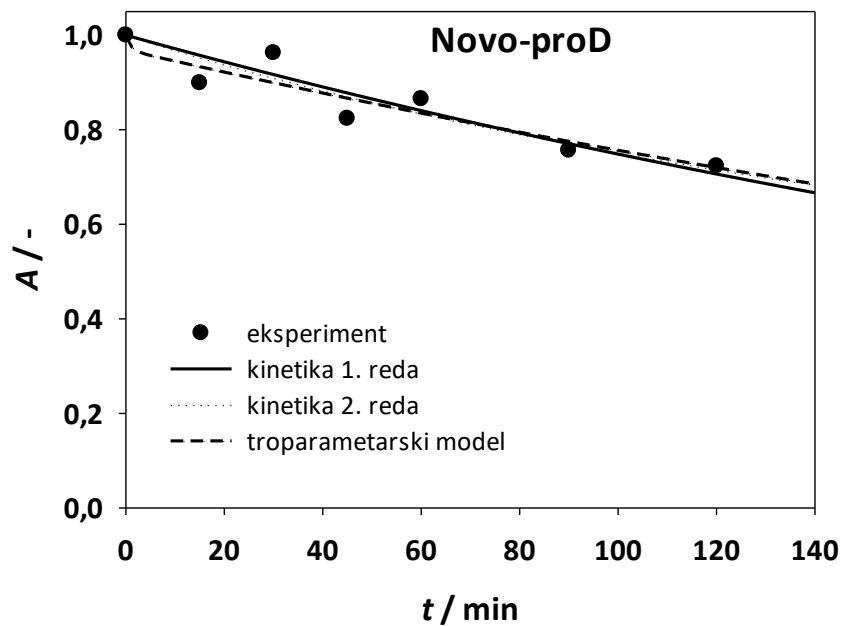
Slika 4.3. Usporedba konverzija tijekom hidrolize proteina u ostacima kozica katalizirana proteazama u kotlastom reaktoru ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH 8, $V_{\text{reaktor}} = 200\text{ }\mu\text{L}$, $m_{\text{kozica}} = 20\text{ mg}$, $A_{\text{proteaze}} = 1\text{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

Analizom dobivenih rezultata, vidljivo je da su kod sve tri proteaze ostvarene konverzije preko 97%. Kod proteaze Novo-Pro D postignuta je najveća konverzija, preko 98%, dok su kod Alkalaze i Novozyme 37071 postignute podjednake konverzije.

4.2.1. Operacijska stabilnost enzima

Na *Slici 4.4.* prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti pri hidrolizi proteina u ostacima kozica. Iz dobivenih rezultata za Alkalazu, vidljivo je da aktivnost pada u prvim minutama, te je zatim stabilna. Proteaza Novo-Pro D pokazuje kontinuirani pad aktivnosti, bez većih odskakanja. Kod proteaze Novozyme 37071 vidljiv je najveći pad aktivnosti u prvih 20 minuta, nakon čega dolazi do stabilizacije enzima.





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

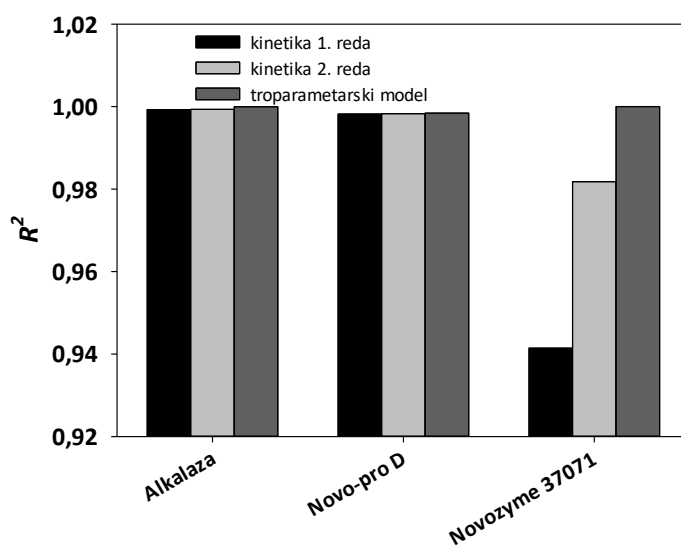
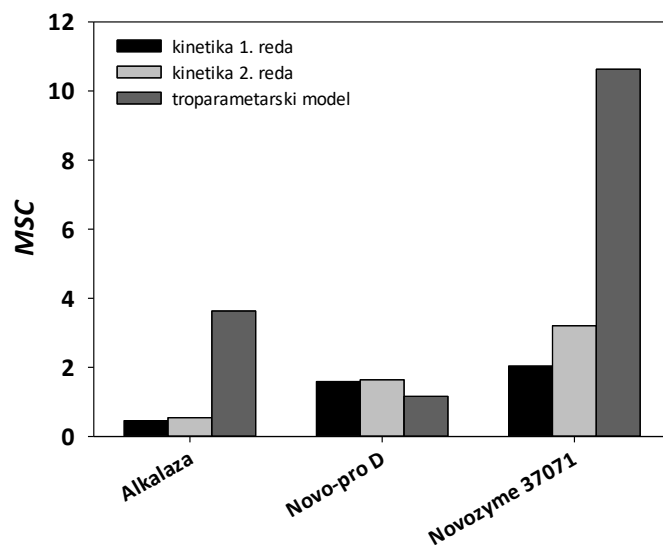
Tablica 4.1. Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te troparametarskog modela inaktivacije proteaza u reaktoru

| Enzim | Model 1. reda | Model 2. reda | Troparametarski model | | |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| | k_d/min^{-1} | k_d/min^{-1} | α | k_{d1}/min^{-1} | k_{d2}/min^{-1} |
| Alkalaza | $1,18 \cdot 10^{-3}$ | $1,26 \cdot 10^{-3}$ | 0,94 | $4,12 \cdot 10^{-4}$ | 1 |
| Novo-Pro D | $2,90 \cdot 10^{-3}$ | $3,31 \cdot 10^{-3}$ | 0,97 | $2,47 \cdot 10^{-3}$ | 1 |
| Novozyme 37071 | 0,104 | 0,229 | 0,14 | $1,80 \cdot 10^{-3}$ | 0,246 |

U Tablici 4.1. prikazani su procijenjeni parametri modela za sva tri enzima. Za opis inaktivacije enzima korišteni su model 1. reda (jedn. 2), model 2. reda (jedn. 3), te troparametarski model. Za modele prvog i drugog reda procijenjena je vrijednost konstanti brzine inaktivacije (k_d), a kod troparametarskog modela određen je udio izoenzima (α), te vrijednosti konstanti inaktivacije izoenzima (k_{d1} i k_{d2}).

Na Slici 4.5. prikazani su rezultati statističke analize modela inaktivacije proteaza.

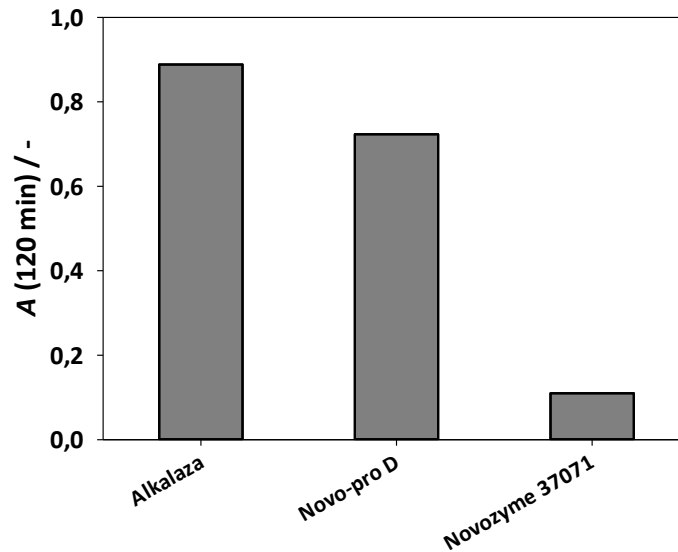
Standardna devijacija pokazuje bliskost teorijski i praktično dobivenih rezultata. Interpretira se kao prosječno odstupanje od prosjeka, u apsolutnom iznosu.^{23,24} Što je veća standardna devijacija, veće je slaganje s modelom. Kod troparametarskog modela korišten je i *MSC* parametar (*Model Selection Criterion*), za koji također vrijedi da što je veći, bolje je slaganje s modelom. Prema parametru standardne devijacije, uočljivo je da reakcije katalizirane proteazama Alkalazom i Novozyme 37071 najbolje opisuje troparametarski model, dok je reakcije katalizirane proteazom Novo-Pro D najbolje opisati modelom kinetika 2. reda. Prema *MSC* kriteriju, troparametarski model također najbolje odgovara reakcijama kataliziranim Alkalazom i Novozyme 37071, te je model kinetike 2. reda također najbolji odabir za reakcije katalizirane Novo-Pro D proteazom.



Slika 4.5. Statistička analiza modela inaktivacije proteaza

Pri završetku reakcije hidrolize ispitana je preostala aktivnost biokatalizatora, a usporedba preostale aktivnosti za proteaze prikazane su na *Slici 4.6*. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je kod sva tri enzima aktivnost nakon 120 minuta smanjena u odnosu na početnu aktivnost. Aktivnost Alkalaze nakon hidrolize je najviša s vrijednošću iznad 80%, dok je vrijednost

aktivnosti Novo-Pro D nakon hidrolize manja od 80%. Aktivnost proteaze Novozyme 37071 je najniža u usporedbi s ostala dva enzima, a vrijednost aktivnosti iznosi manje od 20%.



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

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata moguće je donijeti sljedeće zaključke:

- 1) Pri definiranim uvjetima od 50 °C i pH 8, najnižu vrijednost volumne aktivnosti pokazala je Alkalaza u odnosu na Novo-Pro D i Novozyme 37071.
- 2) U slučaju sve tri proteaze, već nakon 15 minuta reakcije hidrolize postignuta je konverzija viša od 90%.
- 3) Najviša vrijednost konverzije postigla se u reakciji s Novo-Pro D, dok su Alkalaza i Novozyme 37071 postigle podjednake vrijednosti.
- 4) Kod ispitivanja operacijske stabilnosti, najveći pad pokazuje Novozyme 37071, a najmanji Alkalaza.
- 5) Rezultati operacijske stabilnosti enzima, statističkom analizom pokazuju da je model kinetike 2. reda najbolje opisuje pad aktivnosti Novo – Pro D, dok je za Alkalazu i Novozyme 37071 najbolji troparametarski model.
- 6) Nakon 120 minuta reakcije aktivnost za sva tri enzima manja je od početne. Aktivnost Novozyme 37071 je najmanja, a Alkalaze najviša.

Prikazani rezultati pokazuju uspješnost korištenih komercijalnih proteaza u hidrolizi proteina iz otpada rakova. Najučinkovitiji u reakciji hidrolize pokazao se Novo – Pro D, zbog visoke vrijednosti konverzije. Visoke konverzije reakcije i preostala aktivnost pri završetku ispitivanja pokazuju potencijal korištenja ove metode obrade otpada od rakova. Potrebno je provesti daljnja ispitivanja kako bi se uporabom ove metode smanjilo korištenje otapala pri kemijskom izdvajanju proteina.

6. LITERATURA

- [1] Rao, M. S., Muñoz, J., Stevens, W. F. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6) (2000), 808-813.
- [2] Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods—a review. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1) (2013), 12-25.
- [3] Bugg, T. D., . Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. John Wiley & Sons., (2012), Str 8-10.
- [4] Findrik Blažević, Z., Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2013).
- [5] Bošković, M. i Podhorsky, R., ENZIMI, Tehnička enciklopedija, sv. 5, Zagreb, (1976), str. 334-345
- [6] Findrik Blažević, Z., Bioreaktori, Interna skripta za dio kolegije Reaktori i bioreaktori, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2017).
- [7] <https://tehnika.lzmk.hr/enzimi/> (pristup 22.08.2023.)
- [8] <https://stock.adobe.com/hr/images/protein-structure-levels-from-amino-acid-to-complex-molecule-outline-diagram-labeled-educational-primary-secondary-tertiary-and-quaternary-closeups-for-sequence-and-formation-vector-illustration/464066727> (pristup 22.08.2023)
- [9] <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/enzyme-structure-and-catalysis/a/enzymes-and-the-active-site> (pristup 22.08.2023.)
- [10] Alberts, B., Daniel Koshland (1920–2007), *Nature* 448, (2007) str 882.
- [11] Jencks, W. P., Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the circe effect. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 43 (2006), 219-410.
- [12] Lodish, H., Berk, A., Kaiser C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P., *Molecular cell biology*. New York: WH Freeman, (2021.), str 75
- [12] Peptidaze. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, (2021) (pristup 28.08.2023)
- [13] <https://www.britannica.com/science/proteolytic-enzyme> (pristup 29.8.2023.)

- [14] <https://www.worthington-biochem.com/products/neutral-protease-dispase/manual> (pristup 29.08.2023.)
- [15] Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf, M., Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110, (2019)
- [16] Aruna, V., Chandrakala, V., Angajala, G., Nagarajan, E. R., Proteases: An overview on its recent industrial developments and current scenario in the revolution of biocatalysis. *Materials Today: Proceedings*. (2023)
- [17] Walsh, G., Industrial enzymes: proteases and carbhydrases. *Proteins: biochemistry and biotechnology*, (2015), str. 327-328
- [18] Nilsen-Nygaard, J., Strand, S. P., Vårum, K. M., Draget, K. I., Nordgård, C. T., Chitosan: Gels and interfacial properties. *Polymers*, 7(3), 552-579., (2015)
- [19] Moussian, B., Chitin: Structure, chemistry and biology. Targeting chitin-containing organisms, (2019), str 5-18.
- [20] Begović Kovač E., Jerković M., Statističke i numeričke metode. Materijali za seminare iz kolegija: Statističke i numeričke metode, Numeričke i statističke metode, Osnove statistike okoliša i numeričke metode, Zavod za matematiku, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, (2017).
- [21] Simpleks-algoritam. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, (2021) (pristup 25.08.2023)
- [22] http://www.turkupertcentre.net/petanalysis/model_aic.html (pristup 25.08.2023.)
- [23] Tadić, T., Aritmetička sredina i standardna devijacija. *Poučak: časopis za metodiku i nastavu matematike*, 18.69, (2017)10-24.
- [24] <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=standardna+devijacija> (pristup 26.08.2023)

7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli

A – aktivnost biokatalizatora

A_0 – početna aktivnost biokatalizatora

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

A_v – volumna aktivnost [U/mL]

α – udio izoenzima

d – promjer kivete [cm]

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

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

$m_{proteina}$ – masa proteina [mg]

m_{kozica} – masa kozica [mg]

pH – mjera kiselosti/lužnatosti vodenih otopina

R^2 – standardna devijacija

T – temperatura [$^{\circ}\text{C}$]

t – vrijeme [min]

V_r – ukupni volumen reaktora [mL]

$V_{reaktor}$ – volumen reaktora [μL]

Kratice

ABS – apsorbancija

ES – enzim-supstrat kompleks

HIV – *Human immunodeficiency Virus*, virus humane imunodeficijencije

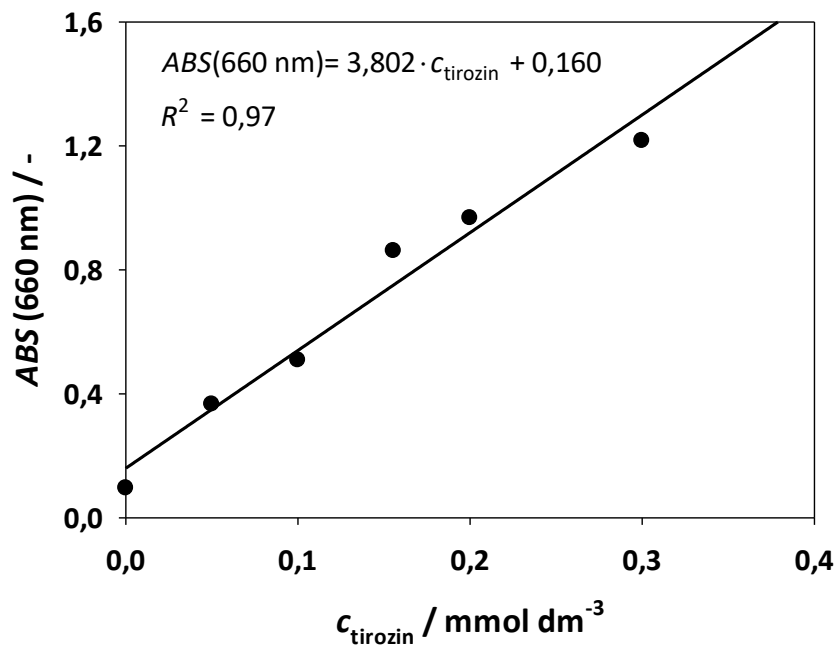
HCl – klorovodična kiselina

MSC – statistički parametar, *Model Selection Criterion*

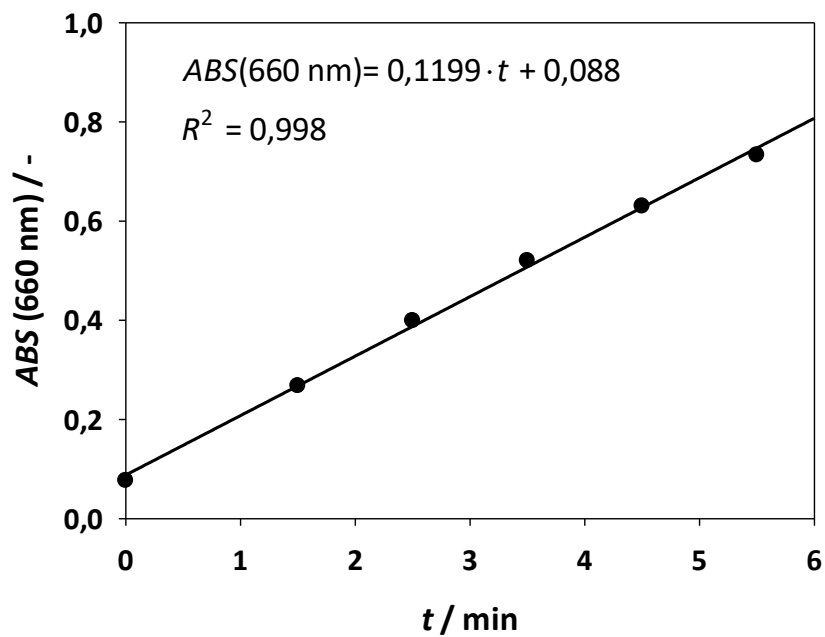
NaOH – natrijev hidroksid

TCA – trikloroocetna kiselina

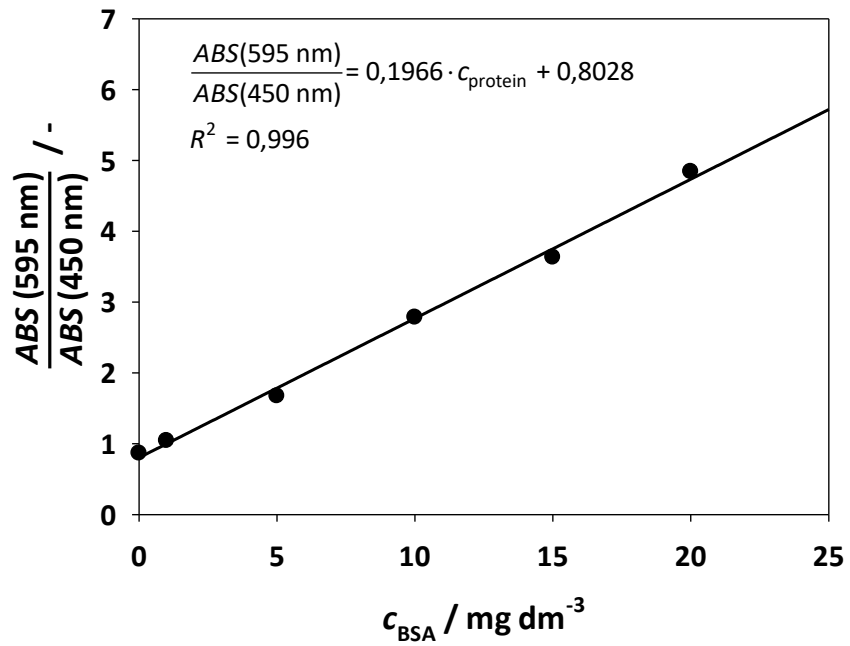
8. PRILOZI



Slika 8.1. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije tirozina



Slika 8.2. Primjer rezultata mjerenja aktivnosti proteaza



Slika 8.3. Baždarni pravac za mjerenje koncentracije proteina

9. ŽIVOTOPIS

Valentina Sabolić [REDACTED] završava II. Osnovnu školu te osnovnu Glazbenu školu Vatroslava Lisinskog. Nakon završenog općeg smjera Gimnazije Bjelovar, 2019. upisuje studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Stručnu praksu odradila je u Plivi, na odjelu Kontrole kvalitete.