

Aktivnost esteraze u stanicama *Pseudomonas* sp. u uvjetima bez i uz indukciju eritromicinom

Leko, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:436139>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Josip Leko

AKTIVNOST ESTERAZE U STANICAMA *PSEUDOMONAS SP.* U UVJETIMA BEZ I UZ
INDUKCIJU ERITROMICINOM

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitne komisije: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2018.

Sažetak

U ovome radu praćena je aktivnost enzima eritromicin esteraze prilikom uzgoja bakterije *Pseudomonas sp.* Eritromicin esteraza je enzim koji navedena bakterija sintetizira, a koji razgrađuje eritromicin; antibiotik široke primjene. Aktivnost enzima je praćena tijekom uzgoja bakterije bez dodatka eritromicina u hranjivu podlogu, s dodatkom 0,2 ppm te 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu. Cilj rada bio je izolirati enzim iz stanica *Pseudomonas sp.* uzgojenih bez, s dodatkom 0,2 ppm i dodatkom 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu te provesti reakciju razgradnje eritromicina.

Ključne riječi: enzim, indukcija, aktivnost, razgradnja, eritromicin, eritromicin esteraza.

Abstract

Activity of erythromycin esterase was monitored during cultivation of *Pseudomonas sp.* Erythromycin esterase is an enzyme which degrades erythromycin, widely used antibiotic. Enzyme activity was monitored during microbial cultivation in the system without added erythromycin in culture medium, with added 0.2 ppm and 200 ppm of erythromycin. The aim of the work was to isolate the enzyme from *Pseudomonas sp.* cells cultivated without, with adding 0.2 ppm and 200 ppm of erythromycin in culture medium and to carry out the erythromycin degradation reaction with the same enzyme.

Key words: enzyme, induction, activity, degradation, erythromycin, erythromycin esterase.

Sadržaj

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	BIOTEHNOLOGIJA	2
2.2	MIKROORGANIZMI	3
2.2.1	RAST MIKROORGANIZAMA	4
2.2.1.1	MONODOVA KINETIKA	5
2.3	ENZIMI	5
2.4	STRUKTURE PROTEINA	6
2.4.1	PRIMARNA STRUKTURA.....	6
2.4.2	SEKUNDARNA STRUKTURA	7
2.4.2.1	STRUKTURA A-ZAVOJNICE	7
2.4.2.2	STRUKTURA B-NABRANA PLOČA	8
2.4.2.3	B-ZAVOJI.....	9
2.4.3	TERCIJARNA STRUKTURA.....	9
2.4.4	KVARTARNA STRUKTURA	10
2.5	PODJELA ENZIMA.....	10
2.5.1	EKSTRAKCIJA I PROČIŠĆAVANJE ENZIMA	10
2.5.2	IMOBILIZACIJA ENZIMA	11
2.5.2.1	METODE IMOBILIZACIJE.....	12
2.5.2.1.1	FIZIKALNE METODE	13
2.5.2.1.1.1	ADSORPCIJA	13
2.5.2.1.1.2	UKLAPANJE U GEL	13
2.5.2.1.2	KEMIJSKE METODE	14
2.5.2.1.2.1	KOVALENTNO VEZANJE	14
2.5.2.1.2.2	UMREŽAVANJE	14
2.5.3	ULOGA ENZIMA.....	15
2.6	ERITROMICIN.....	16
2.7	ERITROMICIN ESTERAZA.....	17
3	MATERIJALI I METODE	18
3.1	KEMIKALIJE	18
3.2	APARATURA	18

3.2.1	ULTRAZVUK.....	18
3.2.2	SPEKTROFOTOMETAR.....	19
3.2.3	CENTRIFUGA.....	19
3.2.4	TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)	20
3.3	METODE	20
3.3.1	UZGOJ KULTURE <i>PSEUDOMONAS SP.</i> I ODREĐIVANJE OPTIČKE GUSTOĆE.....	20
3.3.2	PRIPREMANJE UZORAKA ZA ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA	20
3.3.3	ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ERITROMICIN ESTERAZE – METODA POČETNIH BRZINA	21
3.3.4	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA – BRADFORDOV TEST	21
3.3.5	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ERITROMICINA NA HPLC-U	22
3.3.6	PROVEDBA REAKCIJA RAZGRADNJE ERITROMICINA	22
4	REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1	OPTIČKA GUSTOĆA TIJEKOM RASTA <i>PSEUDOMONAS SP.</i>	24
4.2	PRAĆENJE AKTIVNOSTI ERITROMICIN ESTERAZE MJERENE SPEKTROFOTOMETRIJSKIM TESTOM U STANICAMA <i>PSEUDOMONAS SP.</i>	25
4.2.1	PRAĆENJE AKTIVNOSTI ERITROMICIN ESTERAZE PRILIKOM UZGOJA STANICA <i>PSEUDOMONAS SP.</i> BEZ DODATKA ERITROMICINA U HRANJIVU PODLOGU	25
4.2.2	PRAĆENJE AKTIVNOSTI ENZIMA ERITROMICIN ESTERAZE TIJEKOM UZGOJA STANICA <i>PSEUDOMONAS SP.</i> UZ DODATAK 0,2 PPM ERITROMICINA U HRANJIVU PODLOGU	26
4.2.3	PRAĆENJE AKTIVNOSTI ENZIMA ERITROMICIN ESTERAZE TIJEKOM UZGOJA STANICA <i>PSEUDOMONAS SP.</i> UZ DODATKOM 200 PPM ERITROMICINA U HRANJIVU PODLOGU	27
4.2.4	USPOREDBA AKTIVNOSTI NA JEDNOM GRAFU.....	28
4.3	PRAĆENJE MASE PROTEINA U STANICAMA <i>PSEUDOMONAS SP.</i>	29
4.4	USPOREDBA KONVERZIJE DOBIVENE U REAKCIJAMA KATALIZIRANIM SA SUSPENZIJOM ENZIMA IZOLIRANOG IZ STANICA <i>PSEUDOMONAS SP.</i>	30
5	ZAKLJUČAK	31
6	LITERATURA	35

1 UVOD

Trenutno ljudsko djelovanje, koje uključuje neodgovorno korištenje kemikalija, korištenje neobnovljivih izvora energije i nekontroliranu proizvodnju otpada u svakoj grani industrije, čini veliku prijetnju održivom razvitku. Svijet trenutno ima veliku odgovornost za prihvaćanje mjera održivosti, "čistije" proizvodnje i "zelenih" tehnologija kako bi okoliš bio očuvan i za buduće generacije. [1] Zbog toga industrije diljem svijeta traže alternativne tehnologije koje će moći opskrbiti društvo sve većim brojem proizvoda trošeći pritom manje resursa s manjim utjecajem na okoliš. Korištenje biomaterijala i prirodnih procesa proizvodnje, poznatije kao biotehnologija, je jedna takva alternativna tehnologija koje se može koristiti ili kao zamjena ili kao dodatak konvencionalnim metodama u svrhu uspostave čistijih procesa proizvodnje. Među raznim biotehnologijama, enzimatski se procesi smatraju obećavajućim i održivim alternativama konvencionalnim procesima. Enzimi su proteini i proizvode ih svi živi organizmi gdje služe kao katalizatori brojnim biokemijskim reakcijama i pritom ostaju nepromijenjeni. [2] Kao izvor enzima u biokatalizi najčešće služe mikroorganizmi koji su vrlo raznoliki. Oni imaju važnu ulogu u okolišu te su ključni u različitim "zelenim" procesima i čistijim tehnologijama, od biogeokemijskih ciklusa do industrijskih procesa. Ako se mikroorganizmi koriste prema propisima, mogu značajno pridonijeti održivom razvoju. [1]

U novije vrijeme, korištenje antibiotika je značajno smanjilo broj smrti uzrokovanih infekcijskim bolestima. Međutim, povećanje broja organizama koji su otporni na često korištene antibiotike predstavlja sve veći medicinski problem. Otporne bakterije koriste razne strategije kako bi anulirale utjecaj antibiotika, uključujući isticanje, ciljanu modifikaciju i modifikaciju lijeka. Potonji mehanizam uključuje stvaranje enzima koji modificira antibiotik tako da on više nije aktivan u odnosu na svoj stanični cilj. Jedan takav enzim koji je sposoban degradirati antibiotik eritromicin i onemogućiti njegovu antibakterijsku aktivnost jest eritromicin esteraza. [3]

2 TEORIJSKI DIO

2.1 BIOTEHNOLOGIJA

Biotehnologija se definira kao korištenje živih stanica, organizama ili bioloških materijala kako bi se stvorili ili unaprijedili proizvodi. Općenito govorimo o interdisciplinarnom području između biologije i inženjerstva. Danas biotehnologija prožima sve aspekte našeg svakodnevnog života, utječe na hranu koju jedemo, sigurnost vode koju pijemo, odjeću koju nosimo i kako je peremo, lijekove koje uzimamo te gorivo koje točimo u automobile. Danas živimo dulje, zdravije živote nego ikada prije. Dok biotehnologija, naravno, ne može riješiti sve probleme i izazove s kojima se susrećemo, odigrala je važnu ulogu u razvoju čovječanstva, a takvu ulogu će i dalje imati. [4]

Enzimi su vrlo učinkoviti biokatalizatori što znači da povećavaju brzine reakcija različitih bioloških i kemijskih procesa. Potražnja za biokatalizatorima je u novije vrijeme sve veća jer se smatraju ekološki prihvatljivim alternativama vrlo važnim kemijskim sintezama. Većina kemijskih sinteza trenutno koristi po okoliš opasna organska otapala te zahtijevaju i veliku količinu energije za provođenje procesa. S druge strane, enzimi nisu rizični za okoliš i tako pružaju "čistije" rješenje za sintezu kemikalija i spojeva. [5]

Glavni izvor biokatalizatora su mikroorganizmi jer se lako uzgajaju u laboratoriju, u prirodi su prisutni u velikom broju te su raznoliki. Iako biokatalizatori kataliziraju velik broj raznih kemijskih reakcija, razvijaju se prema potrebama njihove prirodne katalize. Stoga, nisu prikladni za mnogo važnih katalitičkih procesa i drugih industrijski važnih supstrata. [6] Enzimi bi trebali biti visoko aktivni, visoko specifični te enantioselektivni prema različitim zahtjevnim supstratima. Nadalje, trebali bi biti stabilni i podnositi zahtjevne uvjete u reakcijama kao što su visoke temperature, jake kiseline, jake baze, visok salinitet, ekstremne pH vrijednosti, visoke koncentracije supstrata/produkta te imati toleranciju na otapalo. Ideja da se dobiju takvi otporni enzimi je da se uzmu iz ekstremnih uvjeta u okolišu. No, u tome i leži problem, potrebno je takve mikroorganizme prenijeti iz tih ekstremnih uvjeta u laboratorij. Stoga se većina biokatalizatora za industrijsku primjenu otkriva putem metagenomike (proučavanja genetskog materijala dobivenog direktno iz okoliša). Prema tome, kako bi se dobili enzimi s navedenim svojstvima potrebno ih je podvrgnuti raznim inženjerskim i stabilizacijskim tehnikama. [7]

Moderni bioinženjerski alati kao i napredak u računalnim alatima revolucionirali su enzimsko inženjerstvo tako što su učinili enzime pogodnima za različite industrijske procese. Primjena biokatalize predstavlja budućnost u proizvodnji kemikalija, a projektirani i enzimi iz rekombinantnih mikroorganizama bit će dostupni za većinu industrijskih i farmaceutskih procesa. [6]

2.2 MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi su mikroskopski organizmi koji žive u prirodnim ili umjetnim okruženjima. [8] Mikroorganizmi se uglavnom dijele prema svojoj veličini. Većina je jednostanična, dok neki tvore kolonije koje mogu biti makroskopske. Neki mikroorganizmi su pak veći od najsitnijih životinja. Taksonomski, mikroorganizmi uključuju prokariote ili bakterije (eubakterije i arhobakterije) i članove različitih nepovezanih eukariotskih grupa, što zajedno čini protiste, odnosno protozoe (uključujući neke organizme slične gljivama) i protofite (jednostanične alge). [9] Iako su mikroorganizmi definirani na temelju veličine, treba naglasiti kako je njihov raspon veličina ogroman. Najmanji organizmi, kao npr. slobodno živuće bakterije manje su od 0,5 μm , dok su najveće stanice protozoa veće od 1 mm. Raspon veličina mikroorganizma od jedan μm do jedan mm (faktor od 10^3 ili 10^9 u smislu volumena), otprilike je jednak onome svih kralježnjaka (od najmanjih riba do kitova).

Jedno od najvažnijih svojstava mikroorganizama je takozvani "stupanj života" u što spadaju visoke stupnjeve metabolizma specifične za masu i visoke stupnjeve rasta i razmnožavanja. Kada se ta svojstva usporede za velik raspon veličina mikroorganizma, zaključuje se da se stupnjevi metabolizma specifične za masu povećanjem iste smanjuju proporcionalno s potencijom od jedne četvrtine, dok vremena generiranja (razmnožavanja) proporcionalno rastu s povećanjem mase s potencijom od tri četvrtine. Pri optimalnim uvjetima vrijeme generiranja (dupliranja) bakterija može biti već od 20 minuta, a jednostanični eukarioti obično imaju vrijeme generiranja između četiri i 24 sata. Posljedično, relativno mala biomasa mikroorganizama može biti odgovorna za relativno velik udio protoka energije i materijala u ekosustavu. Mikroorganizmi zbog svojih visokih stupnjeva metabolizma specifičnih za masu dominiraju kao sredstva transformacije kemikalija u biosferi. [10] Zasnih desetljeća, zbog industrijalizacije, možemo uočiti rastući broj onečišćivala kao što je otpadna voda koja ulazi i remeti ljudski okoliš. Iz toga proizlazi rizik od ozbiljnih bolesti. Onečišćujuće tvari moraju se

nekako ukloniti iz voda, no umjesto korištenja kemikalija, bezopasniji način je korištenje mikroorganizama i njihove sposobnosti prirodne razgradnje. [8]

2.2.1 RAST MIKROORGANIZAMA

Kinetika je grana prirodne znanosti koja se bavi brzinama i mehanizmima bilo kojeg procesa, fizikalnog, kemijskog ili biološkog. Kinetičke studije u znanostima o okolišu pokrivaju sve kvantitativne i dinamičke aspekte mikrobiološkog života u prirodnim staništima kao što su tlo ili voda: rast i razmnožavanje, mutacije, preživljavanje i smrt mikroorganizama, mikrobiološke interakcije s okolišem, drugim mikroorganizmima, biljkama ili životinjama. Kinetika pruža teorijski okvir za bolje razumijevanje biosferičkih funkcija i za optimalni dizajn ekoloških biotehnologija. [11]

Suprotno jednostavnom praćenju biološke dinamike, kinetičke studije zahtijevaju razumijevanje mehanizama procesa. Na primjer, kompleksni proces, kao što je razgradnja biljnog otpada mora biti razmotren kao kombinacija nekoliko jednostavnijih reakcija: pretvaranje pojedinačnih komponenti otpada, rast određenih razgrađivala uz stvaranje izvanstaničnih produkata, ispiranje mobilnih spojeva, itd. Idealno, mehanističke studije završavaju validacijom eksperimentalnih mjerenja simulacijama matematičkih modela.

Mikrobiološka kinetika je usko povezana sa stehiometrijom rasta, koja je kvantitativna veza između supstrata i produkta mikrobiološkog rasta. [12] U praktičnom smislu, stehiometrija pokazuje probleme statičke prirode, pitanjima "koliko?" i "u kojoj proporciji?", dok kinetika uzima u obzir i dinamiku i odgovara na pitanja "koliko brzo?" i "kojim mehanizmom?" [11]

Postoje dva tipa kinetičkih modela, deterministički i stohastički. Prvi opisuje čiste, određene i osnovne procese, dok se drugi bavi nasumičnim procesima. Glavne varijable korištene u determinističkim modelima su jednake kao u kemijskim kinetikama: koncentracija stanične mase, supstrata i produkata, dok stohastički modeli razmatraju vjerojatnosti, učestalost raspodjela, varijancu itd. Svaki realni biološki proces sadrži i determinističke i stohastičke dijelove, pa bi tako idealni kinetički model trebao biti hibrid i sadržavati determinističku jezgru sa stohastičkom nadopunom u vidu generiranja raspodjele vjerojatnosti umjesto jedne vrijednosti ili krivulje. [13]

2.2.1.1 MONODOVA KINETIKA

Veliki korak naprijed u kinetici mikrobiološkog rasta došao je s radom J. Monoda 1942. On je oplemenio i kalibrirao metodu za kvantificiranje mikrobiološkog rasta koristeći turbidimetriju te je demonstrirao kako se rast može matematički opisati u smislu prinosa rasta, specifične brzine rasta i koncentracije supstrata. Temelj Monodovog kinetičkog modela je u jednoj komponenti koja limitira rast (supstrat). [14] Ovaj model popularan je zbog svoje jednostavnosti. Dvije su osnovne pretpostavke: 1) specifična brzina rasta, μ , je ovisna o koncentraciji limitirajućeg supstrata, s i 2) stvaranje biomase je povezano s unosom supstrata prema zakonu o očuvanju mase.

$$\frac{dx}{dt} = \mu(s)x = \mu_m \frac{s}{K_s + s} x \quad (1)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{Y} \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

Jednadžba 1 sadrži sljedeće parametre: maksimalnu specifičnu brzinu rasta biomase μ_m , h^{-1} , koncentraciju biomase x , $g L^{-1}$, koncentraciju supstrata s , $g L^{-1}$ i konstantu zasićenja supstratom K_s , $g L^{-1}$, koja se može gledati kao "osobna iskaznica" određenih organizama te služiti predviđanju dinamike rasta. [12] U jednadžbi 2 faktor iskorištenja Y govori koliki se dio supstrata troši na nastajanje biomase, a koliki na nastajanje novih stanica. Taj faktor govori o tipu mikroorganizma i njegovoj mogućnosti da raste na račun supstrata.

2.3 ENZIMI

Enzimi su biološki katalizatori koji se nalaze u živim stanicama, a kao ulogu imaju povećavanje brzine kemijskih i biokemijskih reakcija, dok pritom ostaju nepromijenjeni. Reaktante enzimske reakcije nazivamo supstratima. Svaki enzim je specifičan, što znači da reagira samo s određenim supstratom ili supstratima kako bi stvorio specifičan produkt, odnosno produkte. [15] Posebno važno za enzime je da ne mogu djelovati u ekstremnim uvjetima, odnosno podnose blage pH vrijednosti, temperature i tlakove. [16] Nadalje, enzimi su biorazgradivi i najčešće rezultiraju smanjenom ili nikakvom toksičnošću kada dospiju u okoliš nakon industrijske upotrebe. Ova svojstva omogućuju proizvođaču da proizvede produkte jednake ili čak bolje kvalitete s manje sirovina, kemikalija, potrošnje vode i/ili

energije te uz stvaranje otpada koji je manje zahtjevan od onog u tradicionalnim procesima. [2]

Svi enzimi su proteini. Međutim, bez prisustva neproteinske komponente koju nazivamo kofaktor, mnogi enzimi nisu katalitički aktivni. Kada je to slučaj, neaktivni dio proteinskog enzima nazivamo apoenzimom, dok aktivni enzim, koji uključuje kofaktor, nazivamo holoenzimom. Kofaktor može biti organska molekula i tada ga nazivamo koenzimom, no može biti i metalni ion. [15]

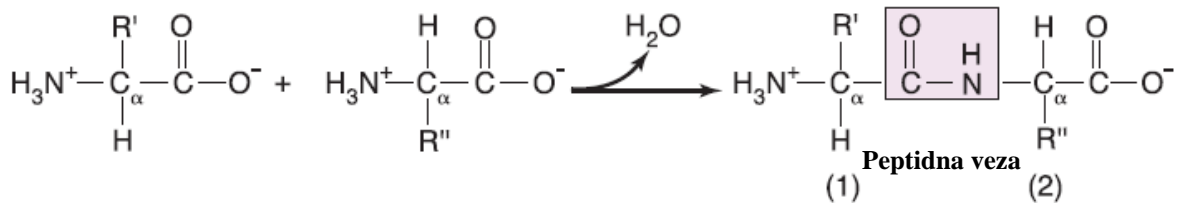
2.4 STRUKTURE PROTEINA

Biološki aktivni oblik proteina je trodimenzionalna molekula koja se sastoji od primarne, sekundarne, a nekada i tercijarne i kvartarne strukture. Međusobno su povezani i kovalentnim i nekovalentnim vezama. Najčešće kovalentne veze su peptidne veze koje povezuju različite aminokiseline u polipeptidne lance, disulfidne veze koje se formiraju između tako stvorenih lanaca te amidne veze koje se stvaraju između određenih karboksilnih ili amino bočnih lanaca. Nevalentne interakcije (npr. vodikove, hidrofobne i ionske veze) služe kao pomoć u stabiliziranju trodimenzionalne strukture. [17]

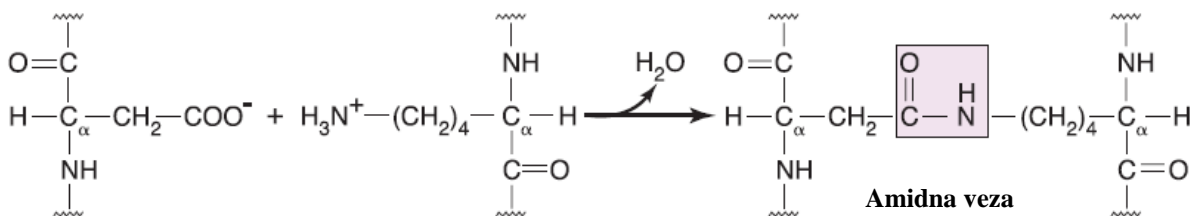
2.4.1 PRIMARNA STRUKTURA

Primarna struktura proteina definirana je nizom aminokiselina povezanih prilično krutim peptidnim vezama. [18] Ove veze efektivno povezuju α -ugljikov atom susjednih aminokiselina povezujući α -karboksilnu grupu jedne s α -amino grupom druge (slika 1.). Bočni lanci ovih aminokiselina su raspoređeni u trans konfiguraciju (na suprotne strane peptidne veze), što smanjuje steričke interakcije.

Aminokiseline mogu biti povezane i disulfidnim vezama te u rijetkim situacijama i amidnim vezama. Amidne veze mogu nastati između bočnih lanaca aminokiselina koja sadrži karboksilne i aminske grupe (slika 2.). Svi proteini ne sadrže disulfidne i amidne veze, a one koje sadrže vjerojatnije će se nalaziti izvan, nego unutar stanice. Općenito, polipeptide s 50 ili više aminokiselina smatramo proteinima. [17]



Slika 1. Formiranje peptidne veze u primarnoj strukturi proteina. [17]



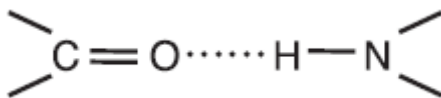
Slika 2. Formiranje amidne veze u primarnoj strukturi proteina. [17]

2.4.2 SEKUNDARNA STRUKTURA

Iako postoji više mogućih sekundarnih struktura, tri su ipak najčešće, a to su α -zavojnica, β -nabrana ploča i β -zavoji. [18]

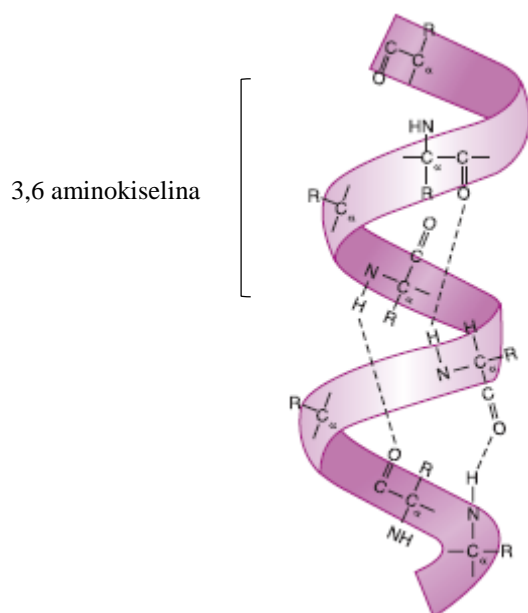
2.4.2.1 STRUKTURA α -ZAVOJNICE

α -zavojnica je stabilizirana vodikovim vezama između amidnog vodika jedne peptidne veze i karbonilnog kisika druge koja je za četiri aminokiseline uzlazno u polipeptidnom lancu (slike 3. i 4.).



Slika 3. Vodikova veza između dviju aminokiselina. [17]

Desno zavojita α -zavojnica je najčešća sekundarna struktura u proteinima (slika 4.). Neki od proteina koji imaju dugačku strukturu α -zavojnice su: α -keratin (glavni protein u kosi, koži i noktima), miozin (debelo vlakno mišića) te globulini (hemoglobin, mioglobin, imunoglobulini i mnogi plazma proteini sintetizirani u jetri).

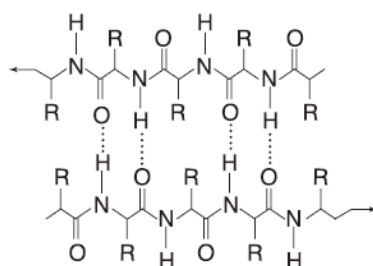


Slika 4. α -zavojnica struktura proteina. [17]

α -zavojnica je općenito stabilizirana aminokiselinama u primarnoj strukturi s nenabijenim bočnim lancima, no može biti destabilizirana onim aminokiselinama s velikim ili nabijenim bočnim lancima. [17]

2.4.2.2 STRUKTURA β -NABRANA PLOČA

Ovakva struktura proteina stvorena je međulančanim vodikovim povezivanjem između amidnog vodika peptidne veze jednoga lanca i karbonilnog kisika peptidne veze drugoga lanca (slika 5.). Proteinski lanci su produženi bočnim lancima aminokiselina, R grupama, koje se izmjenjuju iznad i ispod glavnoga lanca. Paralelni listovi nastaju kada su dva lanca poravnata u istome smjeru od amino do karbonilnog kraja, dok antiparalelni listovi nastaju kada dva lanca imaju suprotne polarosti. Kako neki bočni lanci pokazuju steričke interakcije, β -struktura je poželjna kada primarne strukture sadrže aminokiseline s malim R grupama. [19]



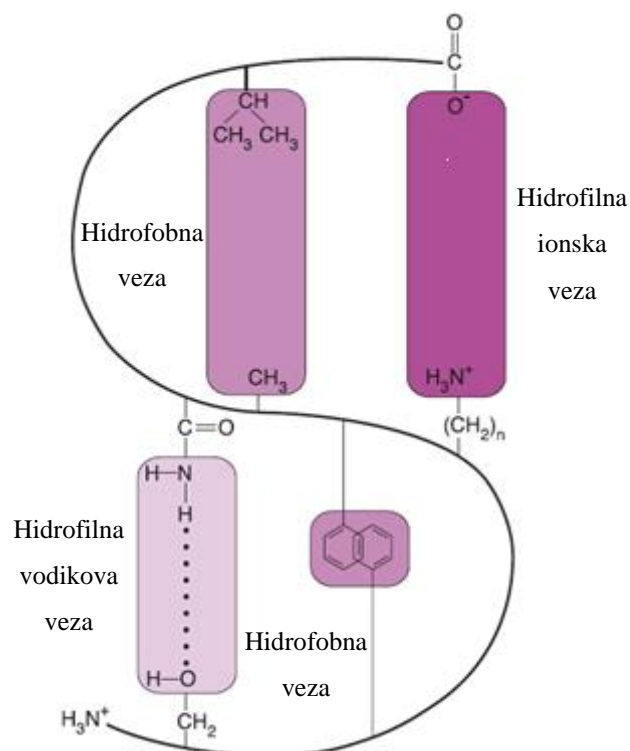
Slika 5. Povezivanje aminokiselina u sekundarnu strukturu β -nabrane ploče. [17]

2.4.2.3 β -ZAVOJI

β -zavoji se sastoje od četiri aminokiseline i služe stvaranju polipeptidnih lanaca tako da tvore čvrsto smotane globularne proteine. Stabilizirane su vodikovim vezama između prvog karbonilnog kisika i zadnjeg amidnog vodika u zavoju. [20]

2.4.3 TERCIJARNA STRUKTURA

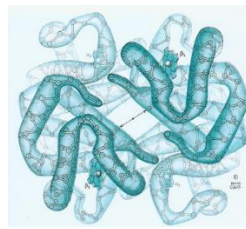
Tercijarna struktura proteina odnosi se na ukupnu trodimenzionalnu strukturu njegovog polipeptidnog lanca u prostoru. Takva struktura općenito je stabilizirana interakcijama vanjskih polarnih hidrofilnih i ionskih veza i unutarnjih hidrofobnih interakcija između nepolarnih bočnih lanaca aminokiselina (slika 6.). [17] Tercijarno savijanje počinje dok se protein oblikuje u svoju primarnu polipeptidnu strukturu. Poznato je da se u ovom procesu pojavljuju proteini koji povezuju hidrofilne dijelove i sprječavaju preuranjenu agregaciju koja bi dovela do stvaranja nefunkcionalnih proteina. Na temelju tercijarne strukture, razlikujemo globularne i fibrilne proteine. Fibrilni proteini, kao α -keratin, imaju izduženu strukturu nalik užetu koja je jaka i hidrofobna. Globularni proteini, kao npr. plazma proteini i imunoglobulini, su sferični i hidrofilni. [21]



Slika 6. Hidrofilne i hidrofobne interakcije u tercijarnoj strukturi globularnog proteina. [17]

2.4.4 KVARTARNA STRUKTURA

Proteini koji se sastoje od više od jednog polipeptidnog lanca, najčešće će tvoriti kvartarnu strukturu (slika 7.), stabiliziranu istim mehanizmom kao i kod tercijarne strukture (hidrofilne i hidrofobne veze, ponekad i disulfidne veze). Hemoglobin, koji se sastoji od dva α -lanca, dva β -lanca i četiri hem-grupe, je primjer funkcionalnog proteina kvartarne strukture. Enzimi su nekada povezani u kvartarne strukture, što im omogućuje selektivno djelovanje prema poželjnom supstratu. [17]



Slika 7. Kvartarna struktura proteina. [17]

2.5 PODJELA ENZIMA

Enzimi se dijele na 6 glavnih grupa ovisno o reakcijama koje kataliziraju. Tako postoje: oksidoreduktaze (reakcije oksidacije/redukcije), transferaze (prijenos atoma ili grupe između dvije molekule, osim takvih reakcija koje spadaju u druge grupe), hidrolaze (reakcije hidrolize), liaze (uklanjanje grupe sa supstrata - ne hidrolizom), izomeraze (reakcije izomerizacije) i ligaze (sintetsko povezivanje dvije molekule uz pucanje pirofosfatne veze u nikleozid trifosfatu). [22]

2.5.1 EKSTRAKCIJA I PROČIŠĆAVANJE ENZIMA

Prije ekstrakcije, potrebno je znati gdje se enzim nalazi unutar stanice i je li enzim prisutan u otopini ili je vezan za membranu. Tada je moguće odrediti odgovarajuću metodu ekstrakcije. Topljivi citoplazmatski enzimi najjednostavniji su za ekstrakciju, jer će svako razaranje stanične membrane omogućiti enzimu da prijeđe u okružujuću medij. Topljivi enzimi koji se nalaze u organelima eukariotskih stanica također se mogu lako izdvojiti, no razaranje unutarstaničnih membrana obično zahtjeva oštrije uvjete nego razaranje stanične membrane. Kako bi se minimiziralo izdvajanje nepoželjnih enzima, odvija se frakcioniranje stanica prije razaranja staničnih organela. [15]

Prvi korak pročišćavanja događa se već prilikom ekstrakcije. Na primjer, prije same ekstrakcije odvija se frakcioniranje stanica kako bi se izdvojili samo oni enzimi koji su u željenom staničnom organelu. Također, odabire se ekstrakcijski medij tako da u njemu samo željeni enzim bude topljiv. [23] Sljedeća faza pročišćavanja sastoji se od precipitacije željenog enzima, tako stvarajući koncentrirani enzim te se razdvaja od mono- i oligosaharida, nukleotida, slobodnih aminokiselina itd. i od mnogo proteina koji ostaju u otopini. Proteini pokazuju minimalnu topljivost na karakterističnoj izoelektričnoj točki (pI) i mogu biti precipitirani podešavanjem pH s pI enzima. No, biološka aktivnost se teško može oporaviti nakon izoelektrične precipitacije. Ista situacija ponavlja se i prilikom korištenja organskih otapala, kao na primjer ledenog acetona. [15] Metoda koja je najpogodnija za precipitaciju i izdvajanje željenog enzima je povećanje koncentracije soli: tu se posebno koristi amonijev sulfat jer je iznimno topljiv u vodi. Koncentracija soli povećava se u stupnjevima, imajući za cilj precipitaciju nepoželjnih enzima (koji se zatim odbacuju) prije precipitacije frakcije u kojoj se nalazi željeni enzim. Enzim se dalje ponovo otapa u puferu, dok se ostali amonijev sulfat odvaja dijalizom ili kromatografijom na temelju veličine molekula.

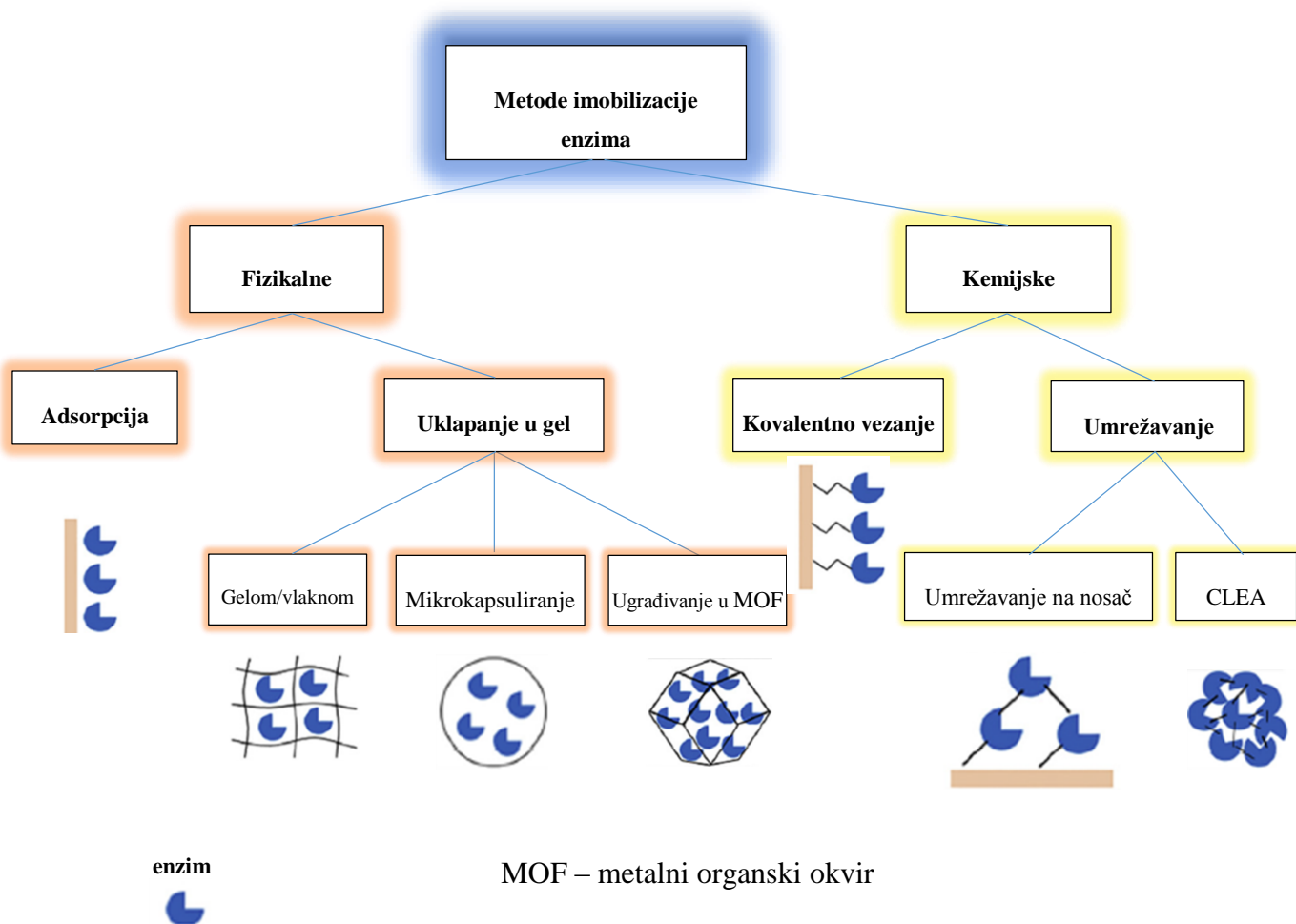
Ostale metode koje se mogu koristiti za pročišćavanje u laboratoriju sadrže ultrafiltraciju, precipitaciju polimerom (npr. polietilenglikol, PEG) ili korištenje kromatografske smole (npr. ionsko izmjenjivačka kromatografija ili kromatografija hidrofobnih interakcija). [24] Iako se ovim metodama često postiže zadovoljavajuće pročišćavanje, mnogi drugi proteini bit će još uvijek prisutni zbog preklapanja raspona topljivosti. Jedan od načina kako izdvojiti takve zaostale, neželjene proteine jest da se poveća temperatura medija na nekoliko minuta na vrijednost na kojoj je željeni enzim stabilan, dok ostali postaju denaturirani ili precipitiraju. Enzimi su često posebno stabilni u prisutnosti njihovih supstrata, pa se dodavanjem istih može povećati učinkovitost ovoga postupka. [15]

2.5.2 IMOBILIZACIJA ENZIMA

Bez imobilizacije, enzimi se ne bi mogli višekratno koristiti te njihova upotreba ne bi imala ekonomskog smisla. Imobilizacija omogućuje lako oporabljanje enzima, brzo prekidanje reakcija te višekratne testove, što smanjuje trošak ovakvih reakcija, odnosno testova. Nadalje, nakon imobilizacije, poboljšava se stabilnost skladištenja, pH i temperaturna otpornost. Na temelju svega navedenog, enzimi nalaze svoju primjenu na širokom području industrija, od farmaceutske, preko industrije hrane, do obrade onečišćenih voda, tekstilne industrije itd. [25]

2.5.2.1 METODE IMOBILIZACIJE

Radi važnosti metoda imobilizacije za praktičnu uporabu biokatalizatora, razvijeno je mnogo metoda od kojih su najvažnije fizikalne, u koje pripadaju adsorpcija enzima i uklapanje u gel te kemijske, koje sadrže kovalentno vezanje i umrežavanje enzima (slika 8.). Obje metode se temelje na interakcijama između enzima i pomoćnih nosača. Pored tehnika imobilizacije, bitni su i materijali koji se koriste prilikom imobilizacije. To su najčešće inertni polimeri i anorganski materijali koji služe kao nosači matrice enzima. [16]



Slika 8. Metode imobilizacije enzima. [16]

2.5.2.1.1 Fizikalne metode

Fizikalne metode su metode koje se temelje na slabim fizikalnim interakcijama između enzima i nosača na koji se veže. [16]

2.5.2.1.1.1 Adsorpcija

Adsorpcija je jednostavna metoda imobilizacije. Djeluje na temelju fizikalne adsorpcije, ionske adsorpcije i afinitetne adsorpcije među kojima se fizikalna adsorpcija najčešće koristi. Često korišteni nosači su iono-izmjenjivačke smole, aktivni ugljen, silikagel, glina te porozno staklo ili keramika. Enzimi se adsorbiraju na nosače pomoću vodikovih veza, van der Waalsovih sila, elektrostatskih ili hidrofobnih interakcija ili se imobiliziraju u pore mezoporoznih materijala. [25]

Ova metoda je vrlo jednostavna jer se enzim miješa s nosačem određeno vrijeme inkubacije, bez dodatka sredstva za povezivanje. Također, nisu potrebni nikakvi dodatni koraci modifikacije, a nosač se može regenerirati. Uvjeti u kojima se odvija imobilizacija su blagi što pogoduje enzimima, odnosno ne narušava njihovu aktivnost. Nadalje, već spomenute slabe fizikalne veze između enzima i nosača omogućuju reverzibilnost ove metode. S druge strane, veze su osjetljive na promjene pH, temperature i ionske jakosti što rezultira lošom stabilnosti imobiliziranih enzima. Naposljetku, enzimi koji se nisu dobro vezali kontaminirat će otopinu supstrata. [16]

2.5.2.1.1.2 Uklapanje u gel

Enzimi teže agregiranju, što direktno smanjuje njihovu aktivnost. Ovom metodom enzimi su zatvoreni u polimernu mrežu uz nisku cijenu. Tako se izbjegava agregacija enzima na jednostavan način. Razne matrice se mogu koristiti za zatvaranje enzima kao što su kitozan, kalcijev alginat, kolagen, celuloza triacetat, poliakrilamid, želatina, agar, silikonska guma, polivinil alkohol i poliuretan. Enzimi su zadržani u mrežama dok je supstratima i produktima omogućen prolaz, što omogućuje poboljšanje stabilnosti, pokretanje željenih enzimskih reakcija te već spomenuto sprječavanje enzima da prijeđu u otopinu supstrata. Nepostojanje kemijskih veza u ovoj metodi također omogućuje visoku katalitičku aktivnost enzima. [25]

2.5.2.1.2 Kemijske metode

Kemijske metode su metode koje se temelje na jakim vezama između enzima i nosača što donosi različita svojstva i mogućnosti u odnosu na fizikalne metode. [16]

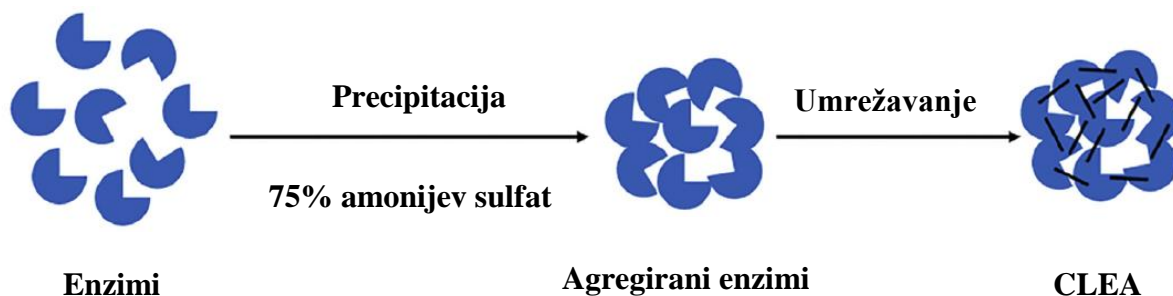
2.5.2.1.2.1 Kovalentno vezanje

Kovalentno vezanje je često korištena metoda za imobilizaciju enzima. Temelji se na stvaranju kovalentne veze kemijskim reakcijama između nosača i aminokiselina enzima. Kovalentne veze onemogućuju prodiranje enzima u otopinu time poboljšavajući stabilnost enzima. Međutim, aktivna mjesta enzima mogu biti deaktivirana zbog stvaranja kemijskih veza između enzima i nosača, što pridonosi smanjenju aktivnosti enzima. [25]

2.5.2.1.2.2 Umrežavanje

Na temelju međumolekulskih reakcija, enzimi se umrežavaju s nosiocima pomoću bifunkcionalnih reagensa. Kao i kod kovalentnog vezanja, enzimi su čvrsto vezani kovalentnim vezama za nosač što omogućuje ponovno korištenje i stabilnost. No, enzimi također gube dio svoje katalitičke aktivnosti prilikom procesa umrežavanja. Najčešće korišteni bifunkcionalni reagensi su glutaraldehid, izocijanat te N, N' – etilen-bis-maleimid.

Nadalje, enzimi mogu biti međusobno umreženi kako bi tvorili umrežene enzimске agregate (*cross-linked enzyme aggregates*, CLEA) (slika 9.). Za pripremanje CLEA, prvo se moraju koristiti precipitanti za agregaciju enzima, nakon toga dodatkom bifunkcionalnih reagensa, enzimi se umrežavaju. Nakon agregacije, aktivna mjesta enzima su zaštićena, a aktivnost enzima je očuvana. [16]



Slika 9. Pripravljane umreženih enzimskih agregata (CLEA). [16]

2.5.3 ULOGA ENZIMA

Enzimi su posebni proteini koji, kao što je već spomenuto, kataliziraju kemijske reakcije uz veliku selektivnost i povećanje brzine reakcije. Takve reakcije su osnova metabolizma svih živih organizama te omogućuju visoke konverzije što ima značajan ekonomski učinak. Primjena enzima polazi od direktne industrijske primjene, degradacije različitih prirodnih spojeva u obradi škroba, tekstilnoj industriji i industriji detergenata do farmaceutskih primjena i manipulacije DNA/RNA u biotehnološkim istraživanjima. [26] Bruto svjetska prodaja enzima procijenjena je na 8 milijardi dolara s procijenjenim rastom od 7% godišnje. [27]

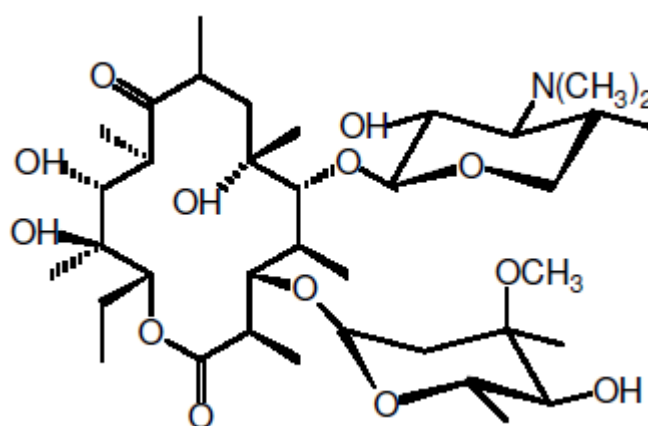
Kada se projektira novi sintetski proces mora se naći pogodni katalizator za tu reakciju, a enzimi su idealni kandidati za tu ulogu. Industrijska upotreba enzima rapidno se razvila zbog njihovih specifičnih svojstava. Komercijalno korištenje enzima počelo je mnogo ranije no što su se znali priroda i svojstva enzima. Stoljećima su se ekstrakti iz biljaka koristili za hidrolizu polimernih materijala. Međutim, takvi izvori bili su nepouzdana i skupi, stoga je krenula potraga za alternativnim izvorima. Većinom su to bile mikrobiološke kulture. Do 1969. godine u 80% svih deterdženata za pranje rublja nalazili su se enzimi, većinom proteaze. [26] Uloga enzima u raznim procesima poznata je već dugo vremena. Tako su ljudi u staroj Grčkoj koristili enzime iz mikroorganizama za pravljenje kruha i piva, proizvodnju alkohola i sira itd. S povećanjem znanja i pročišćavanjem enzima, broj različitih primjena enzima znatno se povećao, a s dostupnošću termostabilnih enzima pojavile su se razne nove mogućnosti za industrijsku primjenu. Takvi termostabilni enzimi, koji su većinom izolirani iz termofilnih organizama, našli su mnogo komercijalnih primjena zbog svoje stabilnosti. [28]

Industrije hrane, hrane za životinje, poljoprivrednih proizvoda, papira, kože i tekstila su sve pogodne za korištenje enzimske tehnologije zato jer su im produkti, kao i sirovi materijali sastavljeni od biomolekula, koje mogu biti stvorene, degradirane ili modificirane enzimskim procesima. [29] Većina, skoro 75% od trenutno korištenih industrijskih enzima su hidrolitički, korišteni za degradaciju različitih prirodnih spojeva. Otprilike 200 enzima mikrobiološkog podrijetla se trenutno koristi u komercijalne svrhe, no samo se 20 enzima proizvodi na industrijskoj razini. [27] Enzimi značajno pridonose globalnom godišnjem prihodu, pa je tako naglasak na njihovom modificiranju. Iako se skuplja mnogo informacija na temu alternacija mikrobioloških enzima, uvijek nedostaju točne informacije o redizajniranju industrijskih enzima. Modifikacija enzima postala je trend za precizno podešavanje biokatalizatora u

biotehnološkoj industriji. Potrebna svojstva enzima koja se prilikom toga žele postići su otpornost na visoke ili niske temperature, aktivnost u kiselim i bazičnim okruženjima te visoka djelotvornost u nevedenim medijima. Proteini se dakle redizajniraju tako da se industrijski procesi provode da budu ekonomski isplativiji i blaži za okoliš. [30]

2.6 ERITROMICIN

Eritromicin proizvodi zemljani organizam *Saccharopolyspora erythraea*, izoliran na Filipinima. Eritromicin je makrolid, veoma važan spoj koji se široko primjenjuje kao antibiotik u medicini i veterini. Posebno se koristi za liječenje infekcija dišnih putova te upale pluća i još se danas pripisuje zbog svoje sigurnosti i efikasnosti. [8] Kemijska struktura ovoga spoja sastoji se od makrocikličkog laktonskog prstena povezanog s dvije molekule šećera (slika 10.). [31] Eritromicin djeluje tako što se povezuje s 30S podjedinicom bakterijskog ribosoma te inhibira sintezu proteina bakterije. [32] Makrolidi su visoko aktivni antibiotici prema širokom spektru Gram-pozitivnih bakterija, no aktivnost im je limitirana u odnosu na Gram-negativne bakterije. Eritromicin se kao lijek dobro adsorbira oralnim unosom te je znatno rasprostranjen u tkivima, posebno u plućima, jetri i bubrezima. Nadalje, ovakav lijek općenito ima slabu toksičnost. Navedene karakteristike čine eritromicin prikladnim za liječenje raznih infekcija. S druge strane, korištenje antibiotika u poljoprivredi može inducirati stvaranje otpornosti određenih vrsta bakterija na antibiotike. Takav trend je u rastu, a njegove posljedice na okoliš, hranidbeni lanac i ljudsko zdravlje mogu biti značajne. [31]



Slika 10. Eritromicin. [31]

2.7 ERITROMICIN ESTERAZA

Bakterije koriste razne načine kako bi se zaštitile od antibiotika, na primjer modifikaciju antibiotika tako da izlučuju enzime koji modificiraju antibiotik te on više nije aktivan za tu bakteriju. Takav mehanizam koristi eritromicin esteraza koja je 1984. prvi puta pronađena u stanicama *E. coli*. [33]

3 MATERIJALI I METODE

3.1 KEMIKALIJE

Popis kemikalija:

- K_2HPO_4 i HEPES – Merck, Njemačka,
- Coomassie brilliant blue, BSA (Bovine serum albumin) i TRITON X-100 – Fluka, Njemačka,
- Acetonitril – Fisher Chemical, Ujedinjeno Kraljevstvo,
- KH_2PO_4 – Lach-Ner, Republika Češka,
- p-nitrofeni butirat (p-NPB) – Sigma, SAD,
- 85 %-tna fosfatna kiselina – Kemika, Hrvatska.

3.2 APARATURA

3.2.1 ULTRAZVUK

Bandelin Sonopuls ultrazvuk (slika 11.) korišten je za razbijanje stanica *Pseudomonas* sp. Ultrazvukom se stanica razbija te omogućuje izlazak enzima iz stanice i njegovo otapanje u pripremljenoj otopini. Prilikom razbijanja stanica, sustav se izvana hladi zbog zagrijavanja otopine prilikom primjene ultrazvuka.



Slika 11. Ultrazvuk

3.2.2 SPEKTROFOTOMETAR

Za određivanje aktivnosti enzima eritromicin esteraze kao i za određivanje koncentracije proteina koristi se spektrofotometar Shimadzu UV-1800 (slika 12.).



Slika 12. Spektrofotometar

3.2.3 CENTRIFUGA

Hettich Universal 320 R centrifuga (slika 13.) korištena je za odvajanje supernatanta enzima od ostataka razbijene stanice nakon ultrazvuka. Radi pri 14000 okretaja u minuti tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja moguće je dekantiranjem odvojiti supernatant od nepoželjnih ostataka stanice, a koji će se koristiti za daljnju analizu.



Slika 13. Centrifuga

3.2.4 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Pomoću HPLC-a (Shimadzu) (slika 14.) je određena koncentracija eritromicina te je praćena reakcija razgradnje eritromicina. Na temelju vremena zadržavanja te visine i širene (odnosno površine) pika određena je njena koncentracija.



Slika 14. HPLC

3.3 METODE

3.3.1 UZGOJ KULTURE *PSEUDOMONAS SP.* I ODREĐIVANJE OPTIČKE GUSTOĆE

Kultura je uzgajana u tekućoj hranjivoj podlozi "tryptic soy broth", bez i uz dodatak eritromicina tijekom 312 sati pri 125 okr/min na 25°C. Potom je biomasa ugušćena i isprana centrifugiranjem na 5500 okr/min tijekom 10 minuta pri 0°C. [37] Optička gustoća određivana je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 600 nm.

3.3.2 PRIPREMANJE UZORAKA ZA ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA

U eksperimentima u tikvicama na tresilici volumena 1 L praćena je krivulja rasta mikroorganizma *Pseudomonas sp.* u uvjetima bez dodatka eritromicina, te uz dodatak 0,2 i 200 ppm eritromicina. Uzgoj stanica se provodio oko 320 h. Tijekom uzgoja stanica *Pseudomonas sp.* praćena je optička gustoća, odnosno porast broja stanica. Osim toga, tijekom uzgoja su uzimani uzorci u kojima je određivana aktivnost enzima eritromicin esteraze pri čemu je korištena sljedeća procedura.

Stanice bakterije *Pseudomonas* sp. suspendirane su u 50 mM fosfatnom puferu pH 7. Slijedilo je 10-minutno razbijanje stanica ultrazvukom uz vanjsko hlađenje otopine zbog zagrijavanja prilikom korištenja ultrazvuka, kako bi se oslobodili enzimi. Nakon razbijanja slijedilo je 10 minuta centrifugiranja 1,8 mL uzorka na 14000 okr/min pri 4°C. Centrifugiranjem se korisni otopljeni enzimi odvajaju od ostataka stanice koji ostaju nataloženi na dnu kivete. Dekantiranjem otopine dobije se uzorak koji je spreman za određivanje aktivnosti enzima.

3.3.3 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ERITROMICIN ESTERAZE – METODA POČETNIH BRZINA

Aktivnost esteraze određena je spektrofotometrijskim testom s *p*-nitrofenil butiratom (*p*-NPB) kao supstratom. Prvo je pripravljena temeljna otopina *p*-NPB koncentracije 55 mM miješanjem *p*-NPB, detergenta TRITON X-100 za bolje otapanje supstrata i 50 mM Hepes pufera pH 7,5. Nakon toga u kivetu se pripremi otopina za određivanje aktivnosti enzima koja sadrži 2 mM temeljne otopine *p*-NPB, 0,2% Triton X-100, 50 mM HEPES pufer pH 7,5 i uzorak enzima kojemu se određuje aktivnost. Produkt reakcije enzima i *p*-NPB je *p*-nitrofenol koji apsorbira zračenje valne duljine 405 nm, a ekstinkcijski koeficijent iznosi 0.0123 cm³ μmol⁻¹. [34]

Tako pripremljenoj otopini promatrana je promjena apsorbancije u kvarcnim kivetama tijekom 100 sekundi na već spomenutoj valnoj duljini od 405 nm. Aktivnost enzima računata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$V \cdot A = \frac{dA}{dt} * \frac{V_r}{\varepsilon} * \frac{1}{V_{uz}} * \frac{1}{d_{kivete}}, \quad (3)$$

gdje je $\frac{dA}{dt}$ promjena apsorbancije u vremenu, V_r volumen reaktora, ε ekstinkcijski koeficijent, V_{uz} volumen uzorka i d_{kivete} promjer kivete.

3.3.4 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA – BRADFORDOV TEST

Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima korištena je spektrofotometrijska metoda po Bradfordu. [35] Koncentracija proteina određivana je na spektrofotometru kako bi se vidjelo koliko ukupno proteina sintetizira bakterija *Pseudomonas* sp. Za određivanje proteina je korišteno 0,8 cm³ otopine uzorka odgovarajućeg razrjeđenja. Reagens za određivanje proteina pripremljen je miješanjem 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 reagensa proizvođača Fluka s 50 cm³ etanola, 100 cm³ H₃PO₄ (85 %-tna) i 850 cm³ redestilirane vode. Tako

dobiveni reagens je korišten za određivanje apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini 595 nm. Prije samog određivanja koncentracije proteina u uzorcima bilo je potrebno napraviti baždarni pravac mjerenjem apsorbanije otopina albumina (BSA) poznate koncentracije na valnoj duljini od 595 nm. Koncentracije standardnih otopina BSA su sljedeće: $1 \mu\text{g cm}^{-3}$; $2,5 \mu\text{g cm}^{-3}$; $5 \mu\text{g cm}^{-3}$; $7,5 \mu\text{g cm}^{-3}$; $10 \mu\text{g cm}^{-3}$, a pripremaju se razrjeđenjem otopine BSA koncentracije $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$. Jednadžba pravca (Prilog 1) koja je potrebna za preračunavanje koncentracije proteina u uzorcima dobivena je iz ovisnosti apsorbanije o koncentraciji proteina.

Koncentracija proteina određena je na sljedeći način: $0,8 \text{ cm}^3$ uzorka enzima pomiješano je s $0,2 \text{ cm}^3$ reagensa te nakon inkubacije 5 minuta na sobnoj temperaturi nastaje plavo obojenje. Na valnoj duljini 595 nm mjerena je apsorbanija uzoraka te je, uz pomoć ranije određenog baždarnog pravca, izračunata koncentracija proteina u uzorku.

3.3.5 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ERITROMICINA NA HPLC-U

Koncentracija eritromicina mjerena je na HPLC na ZirChrom-PBD koloni s veličinom čestica punila od $3 \mu\text{m}$. Kao mobilna faza koristila se otopina 20 mM fosfatnog pufera i acetonitrila u omjeru 24:76 (v/v), pH 11. Analiza je provedena izokratnom metodom pri protoku mobilne faze 1 mL/min pri temperaturi $45 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju 30 min. Prije same analize napravljen je i baždarni pravac (Prilog 2) poznatih koncentracija/površina ispod pika eritromicina. Retencijsko vrijeme eritromicina na koloni je iznosilo 11,2 minuta.

3.3.6 PROVEDBA REAKCIJA RAZGRADNJE ERITROMICINA

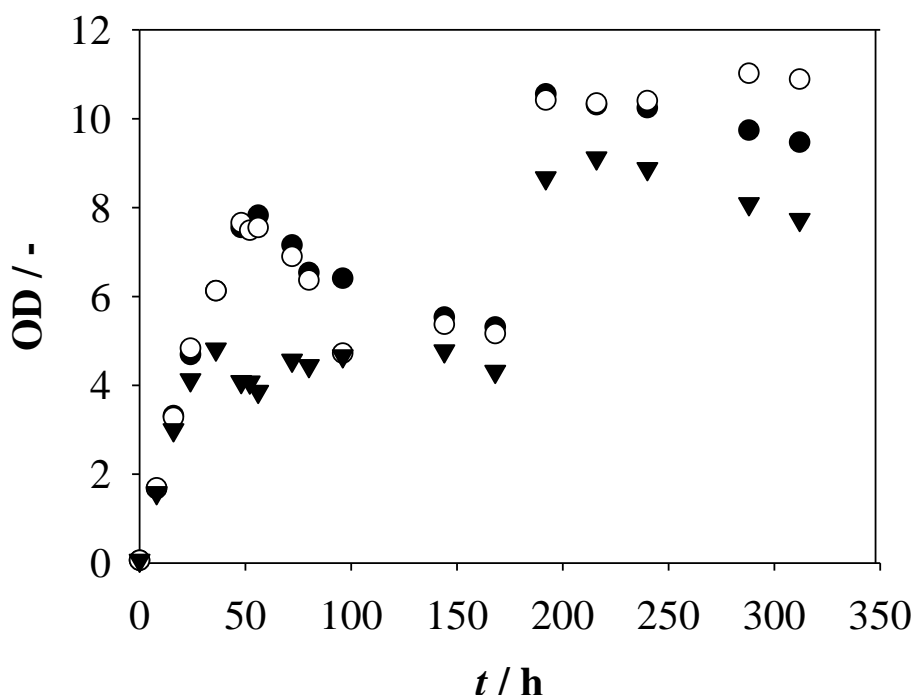
Razgradnja eritromicina pripremljenom eritromicin esterazom je provedena u kotlastom reaktoru. Prije provedbe reakcija razgradnje eritromicina pripremljene su tri reakcijske smjese. Eritromicin je otopljen u 50 mM fosfatnom puferu pH 7. Volumen otopine je iznosio 2 mL, a $500 \mu\text{L}$ ove otopine je činila suspenzija enzima. Početna koncentracija eritromicina u svakoj otopini je iznosila 1 mM. Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima, a prije analize su razrjeđivani otopinom za razrjeđenje uzoraka koja se sastojala od 20 mM fosfatnog pufera i acetonitrila u omjeru 24:76 (v/v), pH 8.

4 REZULTATI I RASPRAVA

U suradnji sa Zavodom za industrijsku tehnologiju praćena je optička gustoća tijekom rasta stanica *Pseudomonas* sp., [36] dok je u ovome radu praćena aktivnost enzima eritromicin esteraze koji je izoliran iz stanica *Pseudomonas* sp. Aktivnost enzima praćena je tijekom 312 sati uzgoja stanica bez dodatka, uz dodatak 0,2 ppm te 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu kako bi se vidjelo postoji li indukcija enzima dodavanjem eritromicina u hranjivu podlogu. Također, određivala se i ukupna količina proteina koje sintetiziraju stanice bakterije *Pseudomonas* sp. Naposljetku, praćena je reakcija razgradnje eritromicina, katalizirana suspenzijom enzima eritromicin esteraze izoliranog iz stanica *Pseudomonas* sp. bez, s dodatkom 0,2 ppm te 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu uzgojenih u rasponu od 300 sati.

4.1 OPTIČKA GUSTOĆA TIJEKOM RASTA *PSEUDOMONAS SP.*

Mikroorganizam *Pseudomonas sp.* izoliran je iz farmaceutske otpadne vode te je uzgojen jer je cilj bio dobiti enzim eritromicin esterazu koja je sposobna razgraditi eritromicin i tako smanjiti njegov utjecaj na okoliš nakon što dospije u otpadne vode farmaceutske industrije. Ovaj dio napravljen je na Zavodu za industrijsku ekologiju. [36] Svrha dodavanja eritromicina bilo je da se ispita mogućnost indukcije enzima eritromicin esteraze u stanicama *Pseudomonas sp.*



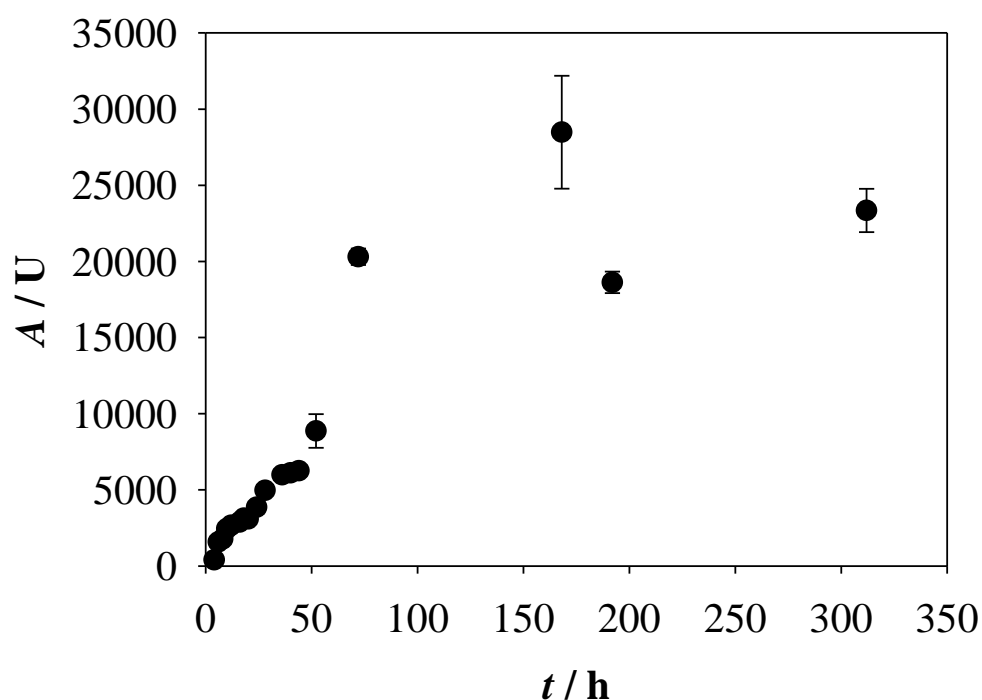
Slika 15. Optička gustoća suspenzije stanica tijekom rasta *Pseudomonas sp.* (● bez dodatka eritromicina u hranjivoj podlozi, ○ 0,2 ppm eritromicina u hranjivoj podlozi, ▼ 200 ppm eritromicina u hranjivoj podlozi).

Na slici 15. je vidljivo da optička gustoća, odnosno koncentracija biomase u pravilu raste s vremenom uzgoja *Pseudomonas sp.* Nakon 192. sata uočen je nagli rast optičke gustoće. Pretpostavlja se da dolazi do raspada biomase jer optička gustoća označava i žive i mrtve stanice. Dodatak 0,2 ppm eritromicina u hranjivu podlogu ne mijenja optičku gustoću u odnosu na rast stanica bez dodatka eritromicina, dok je ona dodatkom 200 ppm eritromicina manja u odnosu na bez i s dodatkom 0,2 ppm eritromicina u hranjivu podlogu. Iz toga se može zaključiti da visoka koncentracija eritromicina ima negativan utjecaj na rast stanica *Pseudomonas sp.*

4.2 PRAĆENJE AKTIVNOSTI ERITROMICIN ESTERAZE MJERENE SPEKTROFOTOMETRIJSKIM TESTOM U STANICAMA *PSEUDOMONAS SP.*

Proveden je uzgoj *Pseudomonas sp.* bez, s dodatkom 0,2 ppm te 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu te je u stanicama spektrofotometrijski određivana aktivnost enzima eritromicin esteraze tijekom vremena.

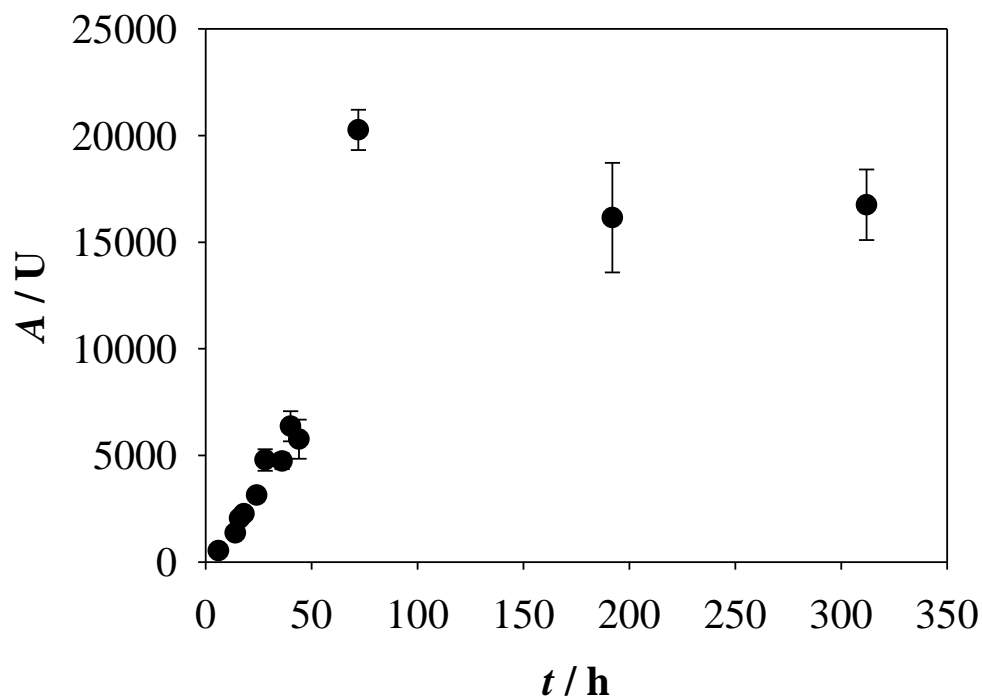
4.2.1 PRAĆENJE AKTIVNOSTI ERITROMICIN ESTERAZE PRILIKOM UZGOJA STANICA *PSEUDOMONAS SP.* BEZ DODATKA ERITROMICINA U HRANJIVU PODLOGU



Slika 16. Praćenje aktivnosti eritromicin esteraze mjerene spektrofotometrijskim testom u stanicama *Pseudomonas sp.* tijekom uzgoja bez dodatka eritromicina u hranjivu podlogu.

Aktivnost eritromicin esteraze u stanicama raste sve do 168. sata uzgoja, nakon kojeg pada te nadalje ostaje približno jednaka do 312 sati do kada je praćen rast stanica i aktivnost enzima. Maksimalna dobivena aktivnost enzima u 168 satu je iznosila otprilike 28 480 U (slika 16.).

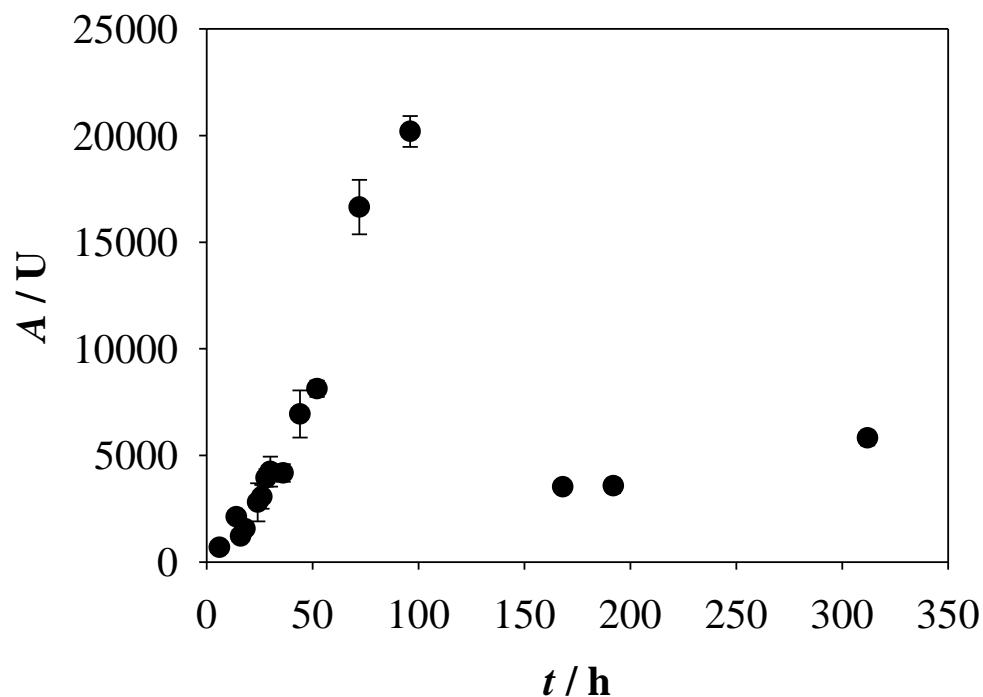
4.2.2 PRAĆENJE AKTIVNOSTI ENZIMA ERITROMICIN ESTERAZE TIJEKOM UZGOJA STANICA *PSEUDOMONAS SP.* UZ DODATAK 0,2 PPM ERITROMICINA U HRANJIVU PODLOGU



Slika 17. Praćenje aktivnosti eritromicin esteraze mjerene spektrofotometrijskim testom u stanicama *Pseudomonas sp.* tijekom uzgoja s dodatkom 0,2 ppm eritromicina u hranjivu podlogu.

Prilikom uzgoja stanica *Pseudomonas sp.* uz dodatak 0,2 ppm eritromicina u hranjivu podlogu aktivnost enzima je bila maksimalna oko 72. sata uzgoja i iznosila je 20 270 U (slika 17.). Iako se ranije pokazalo da ova koncentracija eritromicina nema negativan utjecaj na rast stanica (slika 15.), čini se da možda ipak ima negativan utjecaj na aktivnost enzima, ili da je s druge strane u sustavu bez eritromicina nastala eksperimentalna pogreška.

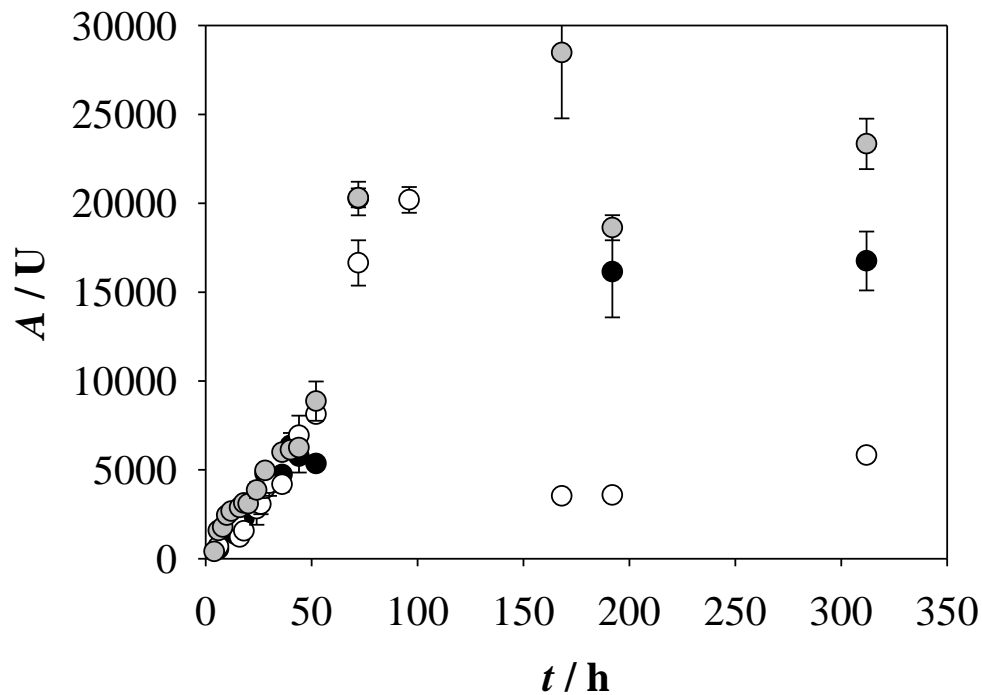
4.2.3 PRAĆENJE AKTIVNOSTI ENZIMA ERITROMICIN ESTERAZE TIJEKOM UZGOJA STANICA *PSEUDOMONAS SP.* UZ DODATKOM 200 PPM ERITROMICINA U HRANJIVU PODLOGU



Slika 18. Praćenje aktivnosti eritromicin esteraze mjerene spektrofotometrijskim testom u stanicama *Pseudomonas sp.* tijekom uzgoja s dodatkom 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu.

Prilikom uzgoja stanica uz dodavatak 200 ppm eritromicina aktivnost enzima u stanicama *Pseudomonas sp.* (slika 18.) pokazuje porast do 96.-og sata uzgoja, nakon kojih aktivnost esteraze naglo pada i ostaje niska. Maksimalno postignuta aktivnost enzima iznosi 20 195 U.

4.2.4 USPOREDBA AKTIVNOSTI NA JEDNOM GRAFU

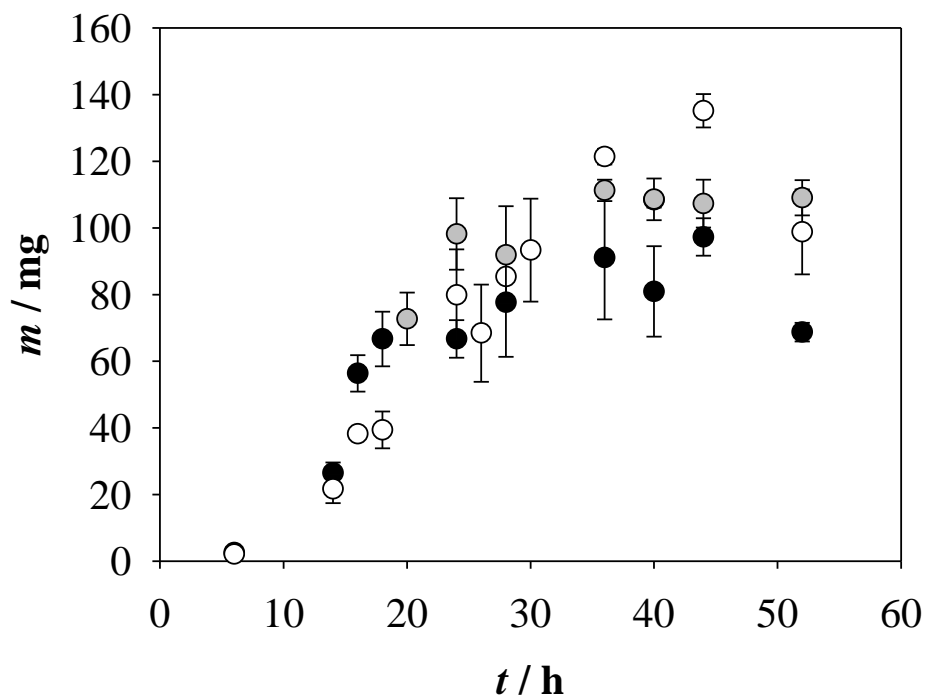


Slika 19. Praćenje aktivnosti eritromicin esteraze mjerene spektrofotometrijskim testom u stanicama *Pseudomonas sp.* tijekom uzgoja bez (●) i s dodatkom 0,2 (●) i 200 (○) ppm eritromicina u hranjivu podlogu.

Usporedbom aktivnosti enzima u stanicama *Pseudomonas sp.* uzgojenim bez i s dodatkom 0,2 ppm i 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu (slika 19.) može se zaključiti da aktivnost enzima podjednako raste u svim slučajevima do 96.-og sata uzgoja. Čini se da je najveća aktivnost eritromicin esteraze postignuta nakon 168 sati uzgoja bez dodatka eritromicina. Uočena je i razlika u aktivnosti nakon 96.-og sata. Aktivnost enzima u stanicama uzgojenim uz dodatak 0,2 ppm eritromicina u hranjivu podlogu malo je manja od one bez dodatka eritromicina, dok je aktivnost enzima nakon dodatka 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu manja i do 5 puta u odnosu na aktivnost enzima bez dodatka eritromicina. Time se može reći da se aktivnost eritromicin esteraze u stanicama ne povećava dodavanjem eritromicina u hranjivu podlogu, već se, naprotiv, smanjuje.

4.3 PRAĆENJE MASE PROTEINA U STANICAMA *PSEUDOMONAS* SP.

Masa proteina u stanicama *Pseudomonas* sp. nakon razbijanja stanica određena je Bradfordovim testom (slika 20.).

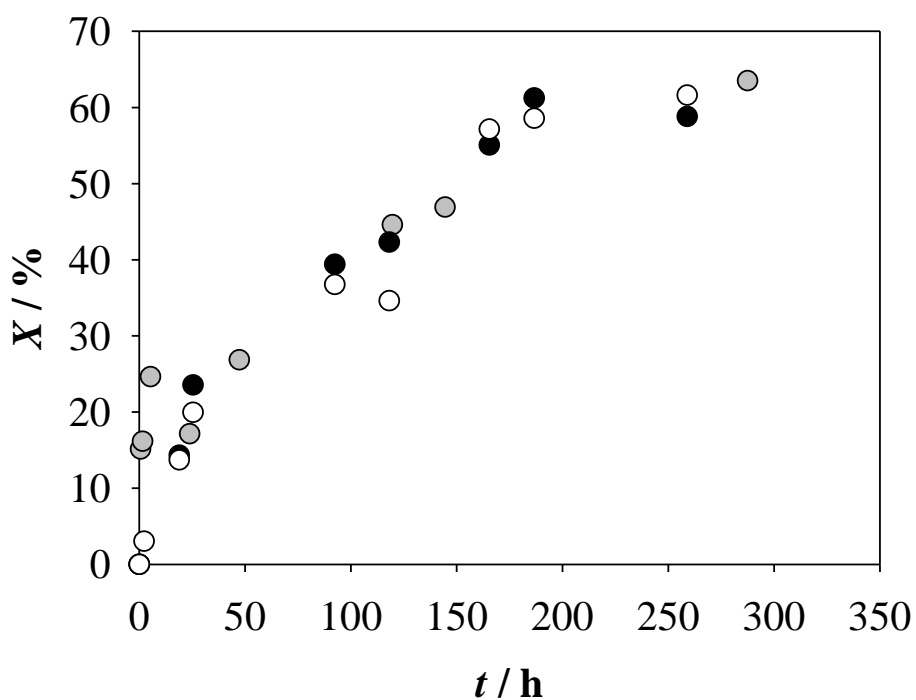


Slika 20. Praćenje mase proteina u stanicama *Pseudomonas* sp. tijekom uzgoja bez (●) i s dodatkom 0,2 (●) i 200 (○) ppm eritromicina u hranjivu podlogu.

Prilikom praćenja mase proteina uočava se da je količina proteina približno jednaka bez obzira na dodatak eritromicina u hranjivu podlogu. Na temelju ovih rezultata, vidljivo je da vjerojatno ne postoji indukcija eritromicin esteraze eritromicinom.

4.4 USPOREDBA KONVERZIJE DOBIVENE U REAKCIJAMA KATALIZIRANIM SA SUSPENZIJOM ENZIMA IZOLIRANOG IZ STANICA *PSEUDOMONAS SP.*

Provedene su reakcije u kojima je praćena reakcija razgradnje eritromicina, katalizirana suspenzijom enzima eritromicin esteraze izoliranog iz stanica *Pseudomonas sp.* bez, s dodatkom 0,2 ppm te 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu uzgojenih u rasponu od 300 sati (slika 21.). Uzorak enzima korišten za provođenje reakcije je dobiven nakon uzgoja stanica u vremenu u kojem je dobivena maksimalna aktivnost enzima, tj. nakon 168 sati uzgoja stanica *Pseudomonas sp.*



Slika 21. Usporedba konverzije dobivene u reakcijama kataliziranih sa suspenzijom enzima izoliranog iz stanica *Pseudomonas sp.* bez (○) i s dodatkom 0,2 (●) i 200 (◐) ppm eritromicina u hranjivu podlogu ($C_{\text{eritromicin}} = 1 \text{ mM}$, 50 mM fosfatni pufer pH 7.0, 25°C, 250 rpm).

Konverzija eritromicina raste s vremenom podjednako za sve tri frakcije enzima. Postignuta je konverzija supstrata od oko 65% nakon 300 minuta eksperimenta. Te možemo zaključiti da dodatak eritromicina u hranjivu podlogu nema pozitivan učinak na aktivnost enzima, no isto tako, nema niti negativan učinak.

5 ZAKLJUČAK

Cilj rada bio je pratiti aktivnost enzima eritromicin esteraze u ovisnosti o vremenu uzgoja stanica i u ovisnosti je li eritromicinom dodan u podlogu ili ne. Provedena je reakcija razgradnje eritromicina suspenzijom enzima dobivenom razbijanjem stanica bakterije *Pseudomonas sp.*

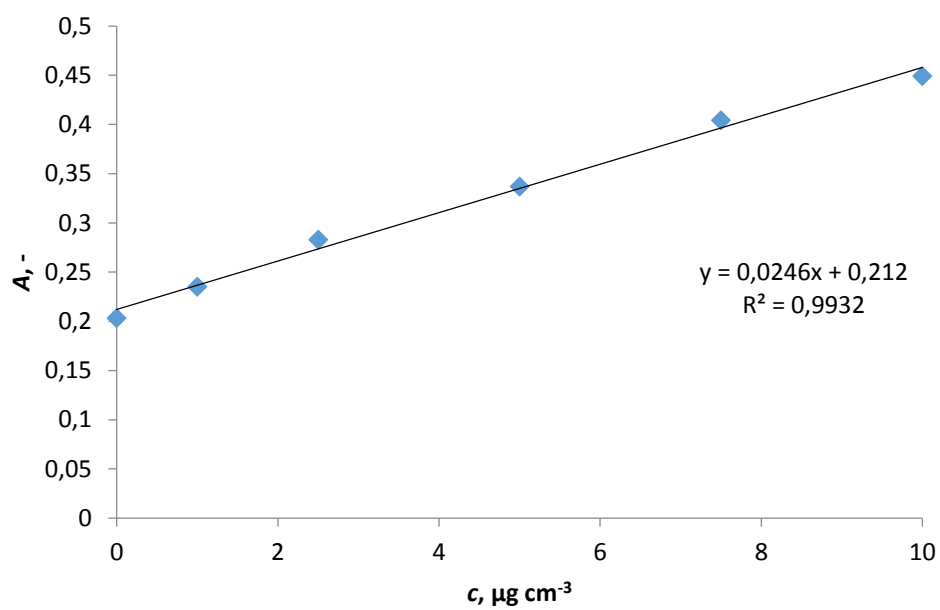
Rezultati ukazuju da najvjerojatnije ne postoji indukcija proizvodnje enzima eritromicinom, odnosno da dodatak eritromicina u hranjivu podlogu ne uzrokuje povećanje aktivnosti enzima eritromicin esteraze. Štoviše, dodatkom sve veće koncentracije eritromicina u hranjivu podlogu, aktivnost enzima u stanicama bakterije se smanjuje. Najveća aktivnost enzima dobivena je u stanicama uzgojenim bez dodatka eritromicina u hranjivoj podlozi i to nakon 168 sati uzgoja bakterije, nakon kojih aktivnost pretežno stagnira.

Nadalje, količina proteina jednaka je bez obzira na dodatak eritromicina u hranjivu podlogu stanica *Pseudomonas sp.* Prema tome se može reći da vjerojatno ne postoji indukcija enzima eritromicin esteraze eritromicinom.

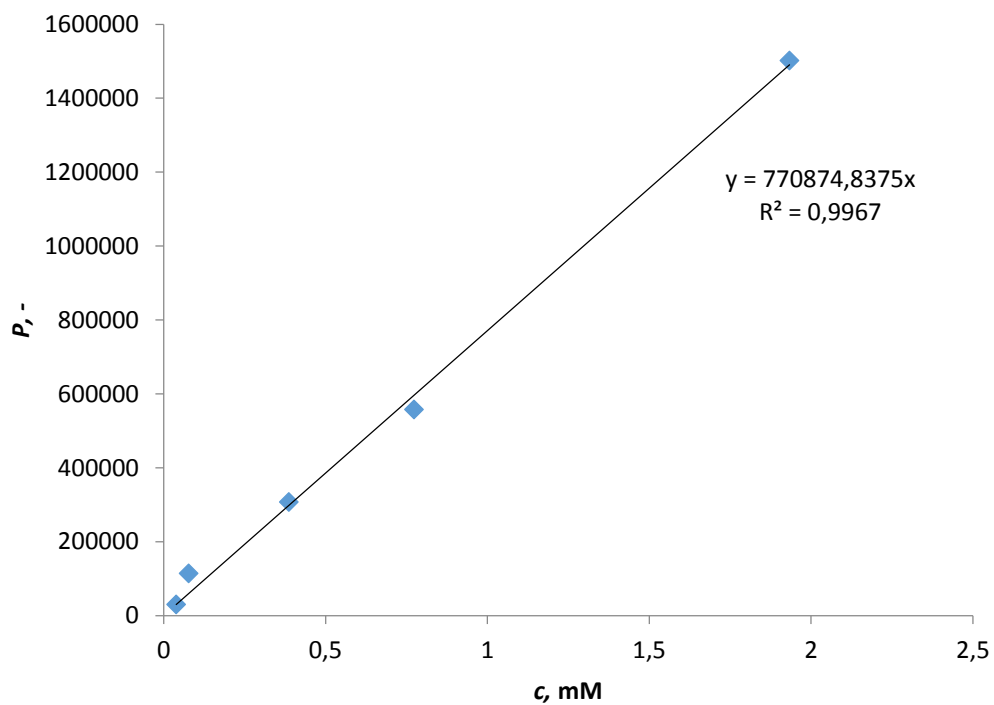
Praćena je reakcija razgradnje eritromicina katalizirana eritromicin esterazom dobivene iz stanica *Pseudomonas sp.* uzgojenih bez i uz dodatak eritromicina u hranjivu podlogu te su dobiveni vrlo slični rezultati. Uočeno je da konverzija pravilno raste s vremenom.

Prilog

Prilog 1 Primjer baždarnog pravca za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina.



Prilog 2 Primjer baždarnog pravca za određivanje koncentracije eritromicina na HPLC-u.



Prilog 3 Popis slika i shema

Slika 1. Formiranje peptidne veze u primarnoj strukturi proteina. [17].....	7
Slika 2. Formiranje amidne veze u primarnoj strukturi proteina. [17].....	7
Slika 3. Vodikova veza između dviju aminokiselina. [17]	7
Slika 4. α -zavojnica struktura proteina. [17]	8
Slika 5. Povezivanje aminokiselina u sekundarnu strukturu β -nabrane ploče. [17]	8
Slika 6. Hidrofilne i hidrofobne interakcije u tercijarnoj strukturi globularnog proteina. [17] .	9
Slika 7. Kvarturna struktura proteina. [17].....	10
Slika 8. Metode imobilizacije enzima. [16]	12
Slika 9. Pripravljavanje umreženih enzimskih agregata (CLEA). [16]	14
Slika 10. Eritromicin. [31].....	16
Slika 11. Ultrazvuk.....	18
Slika 12. Spektrofotometar.....	19
Slika 13. Centrifuga.....	19
Slika 14. HPLC	20
Slika 15. Optička gustoća suspenzije stanica tijekom rasta <i>Pseudomonas</i> sp. (● bez dodatka eritromicina u hranjivoj podlozi, ○ 0,2 ppm eritromicina u hranjivoj podlozi, ▼ 200 ppm eritromicina u hranjivoj podlozi).....	24
Slika 16. Praćenje aktivnosti eritromicin esteraze mjerene spektrofotometrijskim testom u stanicama <i>Pseudomonas</i> sp. tijekom uzgoja bez dodatka eritromicina u hranjivu podlogu. ...	25
Slika 17. Praćenje aktivnosti eritromicin esteraze mjerene spektrofotometrijskim testom u stanicama <i>Pseudomonas</i> sp. tijekom uzgoja s dodatkom 0,2 ppm eritromicina u hranjivu podlogu.....	26

Slika 18. Praćenje aktivnosti eritromicin esteraze mjerene spektrofotometrijskim testom u stanicama <i>Pseudomonas</i> sp. tijekom uzgoja s dodatkom 200 ppm eritromicina u hranjivu podlogu.....	27
Slika 19. Praćenje aktivnosti eritromicin esteraze mjerene spektrofotometrijskim testom u stanicama <i>Pseudomonas</i> sp. tijekom uzgoja bez (●) i s dodatkom 0,2 (●) i 200 (○) ppm eritromicina u hranjivu podlogu.....	28
Slika 20. Praćenje mase proteina u stanicama <i>Pseudomonas</i> sp. tijekom uzgoja bez (●) i s dodatkom 0,2 (●) i 200 (○) ppm eritromicina u hranjivu podlogu.	29
Slika 21. Usporedba konverzije dobivene u reakcijama kataliziranih sa suspenzijom enzima izoliranog iz stanica <i>Pseudomonas</i> sp. bez (●) i s dodatkom 0,2 (●) i 200 (○) ppm eritromicina u hranjivu podlogu ($c_{\text{eritromicin}} = 1 \text{ mM}$, 50 mM fosfatni pufer pH 7.0, 25°C, 250 rpm).....	30

6 LITERATURA

- [1] A. Akinsemolu, The Role of Microorganisms in Achieving the Sustainable Development Goals, *Journal of Cleaner Production* 182 (2018.) 139-155.
- [2] K.R. Jegannathan, P.H. Nielsen, Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review, *Journal of Cleaner Production* 42 (2013.) 228-240.
- [3] K. L. Pengelly, Characterization of erythromycin esterases: a genomic enzymology approach to macrolide resistance, A Thesis, McMaster University, Hamilton, Ontario (2010.), str. 1.
- [4] S. T. Sharfstein, Reference Module in Life Sciences, *Biotechnology*, (2017.), str. 1.
- [5] A.K. Mackenzie, A.E. Naas, S.K. Kracun, J. Schückel, J.U. Fangel, J.W. Agger, W.G.T. Willatsb, V.G.H. Eijsinka, P.B. Pope, A polysaccharide utilization locus from an uncultured bacteroidetes phylotype suggests ecological adaptation and substrate versatility. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (2014.) 187-195.
- [6] A. Madhavan, R. Sindhu, P. Binod, R. K. Sukumaran, A. Pandey, Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications, *Bioresource Technology* 245 (2017.) 1304-1313.
- [7] C. Yang, Y. Xia, H. Qu, A. Li, R. Liu, Y. Wang, T. Zhang, Discovery of new cellulases from the metagenome by a metagenomics-guided strategy, *Biotechnology for Biofuels* 9 (2016.) 1-12.
- [8] S. Kosov, K. Shirahama, C. Li, M. Grzegorzec, Environmental Microorganism Classification Using Conditional Random Fields and Deep Convolutional Neural Networks, *Pattern Recognition* 77 (2018.) 248-261.
- [9] M. Dworkin, S. Falkow, F. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt, *The Prokaryotes – A Handbook on the Biology of Bacteria*, Springer-Verlag New York, SAD, (2006.), str. 481.
- [10] T. Fenchel, *Encyclopedia of Biodiversity, Microorganisms (Microbes), Role of*, Elsevier, SAD, (2013.), str. 299.
- [11] N.S. Panikov, Microbial growth dynamics, *Comprehensive Biotechnology* 1 (2011.) 258-282.
- [12] N.S. Panikov, *Encyclopedia of Soils in the Environment, Kinetics of Microbial Processes*, Elsevier, SAD, (2005.), str. 463., 464., 468.
- [13] J. Goutsias, Classical versus Stochastic Kinetics Modeling of Biochemical Reaction Systems, *Biophysical Journal* 92 (2007.) 2350. – 2365.

- [14] T. Egli, Encyclopedia of Microbiology, Elsevier, SAD, (2009.), str. 182.
- [15] T. Palmer, P. Bonner, Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry *Second Edition*, Woodhead publishing, UK, (2007.), str.2., 4., 293., 298., 299.
- [16] L. Dong-Mei, J. Chen, S. Yan-Ping, Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, TrAC Trends in Analytical Chemistry 102 (2018.) 332-342.
- [17] L. R. Engelking, Textbook of Veterinary Physiological Chemistry, Elsevier, SAD, (2014.), str. 18.-22.
- [18] D.A. Korasick, J.M. Jez, Protein Domains: Structure, Function and Methods, Encyclopedia of Cell Biology 1 (2016.) 91-97.
- [19] www.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/orders-of-protein-structure (pristup 12.7.2018.)
- [20] O. B. Ptitsyn, Physical principles of protein structure and protein folding, Journal of Biosciences 8 (1985.) 1-13.
- [21] I.M. Rosenberg, Protein analysis and purification, Birkhäuser, Švicarska, (2005.), str. 16.
- [22] S. Boyce, K.F. Tipton, Encyclopedia of Life Sciences, Enzyme Classification and Nomenclature, John Wiley & Sons, SAD, (2007.), str. 3. – 10.
- [23] Y. Nakatani, V. Ogryzko, Immunoaffinity Purification of Mammalian Protein Complexes, Methods in Enzymology 370 (2003.) 430-444.
- [24] A. K. Patel, R. R. Singhanian, A. Pandey, Biotechnology of Microbial Enzymes, Elsevier, SAD, (2017.), str. 27., 28.
- [25] R. A. Sheldon, Advanced Synthesis & Catalysis 349 (2007.) 1269-1536.
- [26] G. Singh Dhillon, S. Kaur, Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass, Elsevier, SAD, (2016.), str 1. – 3., str 10. – 13.
- [27] S. Li, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, X. Wang, Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering, Computational and Structural Biotechnology Journal 2 (2012.) 1-11.
- [28] G.D. Haki, S.K. Rakshit, Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology 89 (2003.) 17-34.
- [29] J.B. van Beilen, Z. Li, Enzyme technology: an overview. Current Opinion in Biotechnology 13 (2002.) 338-344.

- [30] S. Joshi, T. Satyanarayana, *In vitro* engineering of microbial enzymes with multifarious applications: prospects and perspectives. *Bioresource Technology* 176 (2015.) 273-283.
- [31] P. Edder, L. Coppex, A. Cominoli, C. Corvi, Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection, *Food Additives and Contaminants* 19 (2002.) 232-240.
- [32] C. Zhiling, L. Bing, L. Weiwei, S. Yinxing, B. Wenming, Y. Guowei, K. Jiangsu, A Validated RP-LC Method for the Determination of Erythromycin an Oxime and Related Substances, *Advance Journal of Food Science and Technology* 5 (2013.) 68-71.
- [33] K. Pengelly, Characterization of erythromycin esterases: a genomic enzymology approach to macrolide resistance, A Thesis, McMaster University, Public university in Hamilton, Canada, (2010.) str.1.
- [34] M. Morar, K. Pengelly, K. Koteva, G. D. Wright, Mechanism and Diversity of the Erythromycin Esterase Family of Enzymes, *Biochemistry* 51 (2012.) 1740-1751.
- [35] M. M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* 72(1976.) 248-254.
- [36] M. Miloloža, Procjena utjecaja eritromicina na bakteriju *Pseudomonas putida* izoliranu iz farmaceutske otpadne vode, diplomski rad, (2018.), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
- [37] K. Yong-Hak, C. Chang-Jun, C. E. Cerniglia, Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas sp.*, *FEMS Microbiology Letters* 210 (2002.) 239-244.

ŽIVOTOPIS

Josip Leko [REDACTED]. Završivši opću III. Gimnaziju u Zagrebu u svibnju 2013. godine stekao je titulu srednje stručne spreme. Nakon završenog trogodišnjeg preddiplomskog studija Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva u tehnologije Sveučilišta u Zagrebu u rujnu 2016. godine stekao je titulu Sveučilišnog prvostupnika inženjera ekoinženjerstva.

Materinji jezik mu je hrvatski, dok od stranih jezika priča tečno engleski (Certificate in Advanced English (CAE) - University of Cambridge) te se služi i njemačkim jezikom.

Posjeduje B vozačku dozvolu.

Od hobija igra rukomet te rukomet na pijesku čiji je član seniorske reprezentacije te osvajač srebrne medalje na Svjetskom prvenstvu održanom u Kazanu u Rusiji 2018. godine. Također, s Akademskim klubom rukometa na pijesku osvojio je prvenstvo Europe 2017. godine u Gaeti, Italija te je viceprvak Europe 2018. godine na prvenstvu koje se održavalo u Starim Jablonkama u Poljskoj.