

Proizvodnja, pročišćavanje i karakterizacija enzima endo-1,4- β -ksilanaza iz *Thermomyces lanuginosus*

Brkić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:613058>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Katarina Brkić

PROIZVODNJA, PROČIŠĆAVANJE I KARAKTERIZACIJA
ENZIMA ENDO-1,4- β -KSILANAZA IZ *THERMOMYCES*
LANUGINOSUS

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Sveučilišni diplomski studij Procesno inženjerstvo

Zavod za Procesno inženjerstvo
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada prihvaćena je na XI. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-Tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 20. rujna 2024.
Mentor: prof. dr. sc. Marina Tišma
Pomoć pri izradi: Anđela Matić, mag. ing. proc.

**PROIZVODNJA, PROČIŠĆAVANJE I KARAKTERIZACIJA ENZIMA ENDO-1,4- β -KSILANAZA IZ
THERMOMYCES LANUGINOSUS
Katarina Brkić, 0113146186**

Sažetak:

Enzim endo-1,4- β -ksilanaza se najčešće koristi u proizvodnji biogoriva, tvornicama pulpe i papira te u prehrambenoj industriji, zbog sposobnosti katalize hidrolize ksilana, sastavnog dijela hemiceluloze. Cilj ovog rada bio je proizvesti enzim endo-1,4- β -ksilanazu tijekom uzgoja *Thermomyces lanuginosus* metodom fermentacije na čvrstim nosačima, koristeći pivski trop kao supstrat. Tijekom 10 dana fermentacije svakodnevno su mjerene volumne i specifične aktivnosti enzima. Najveće aktivnosti postignute su osmi dan fermentacije (V.A. = 3159,06 U/mL, S.A. = 6476,24 U/mg). Potom su istraživane različite metode pročišćavanja enzima: jednostupanjsko i dvostupanjsko taloženje u hladnom acetonu, taloženje amonijevim sulfatom s i bez dodatka *t*-butanola i dijaliza. Metodom elektroforeze određena je molekulska masa enzima koja je iznosila 12,5 kDa. Na kraju, provedena je analiza utjecaja pH i temperature na aktivnost pročišćenog enzima. Najveća aktivnosti enzima (V.A. = 20859,44 U/mL, S.A. = 7193,63 U/mg) izmjerena je pri pH 6 i temperaturi od 85°C.

Ključne riječi: endo-1,4- β -ksilanaza, fermentacija na čvrstim nosačima, pivski trop, *Thermomyces lanuginosus*

Rad sadrži: 46 stranica
22 slike
5 tablica
30 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu rada:

| | | |
|----|------------------------------------|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. Kristina Mastanjević | predsjednik |
| 2. | prof. dr. sc. Marina Tišma | član |
| 3. | prof. dr.sc. Mirela Planinić | član |
| 4 | prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić | zamjena člana |

Datum obrane: 30. listopada, 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
University Graduate Study Process engineering

Department of Process Engineering
Subdepartment of energy, environment and sustainable development
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. XI held on September 20, 2024.
Mentor: Marina Tišma, PhD, Full Professor
Technical assistance: Anđela Matić, MSc

PRODUCTION, ISOLATION AND CHARACTERISATION OF ENDO-1,4- β -XYLANASE ACQUIRED BY *THERMOMYCES LANUGINOSUS* Katarina Brkić, 0113146186

Summary:

Enzyme endo-1,4- β -xylanase is mostly used in biofuel production, pulp and paper factories, as well as food industry because of its property to catalyze hydrolytic reaction of xylan degradation, a compound found in hemicellulose. The purpose of this thesis is to produce the enzyme endo-1,4- β -xylanase by solid state fermentation of *Thermomyces lanuginosus* while using brewers' spent grain as a substrate. Firstly, volume and specific activities of the enzyme were measured daily during the 10 days of fermentation. The highest activity was achieved on the eighth day (V.A. = 3159,06 U/mL, S.A. = 6476,24 U/mg). Secondly, purification of the enzyme was carried out by different methods: precipitation by cold acetone in one and two steps, precipitation by ammonium sulfate with and without addition of *t*-butanol and dialysis. Thirdly, the enzyme's molecule mass was determined by electrophoresis and was proven to be 12,5 kDa. In the end, the influence of pH and temperature on the purified enzyme's activity was measured. The highest enzyme activity (V.A. = 20859,44 U/mL, S.A. = 7193,63 U/mg) was gained at pH 6 and temperature of 85°C.

Key words: endo-1,4- β -xylanase, solid state fermentation, brewers' spent grain, *Thermomyces lanuginosus*

Thesis contains: 46 pages
22 figures
5 tables
30 references

Original in: Croatian

Review and defence committee:

| | | |
|----|--|--------------|
| 1. | Kristina Mastanjević, PhD, Associate Prof. | chair person |
| 2. | Marina Tišma, PhD, Full Prof. | member |
| 3. | Mirela Planinić, PhD, Full Prof. | member |
| 4. | Ana Bucić-Kojić, PhD, Full Prof. | stand in |

Defence date: October 30, 2024.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

30. 10. 2024.

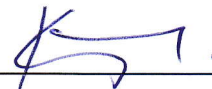
TE OCIJENJEN USPJEHOM

(vršnim 5)

Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:

1. **prof. dr. sc. Kristina Mastanjević**

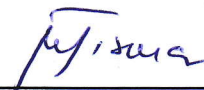
predsjednik



(potpis)

2. **prof. dr. sc. Marina Tišma**

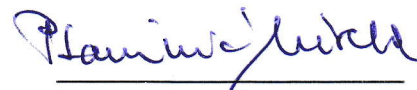
član



(potpis)

3. **prof. dr. sc. Mirela Planinić**

član



(potpis)

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Marini Tišmi na pruženoj prilici, uloženom trudu za ovaj rad, te na svakoj minuti mentorstva s drugog kraja Zemlje.

Veliko hvala asistentici Anđeli Matić, mag. ing. proc. za sve savjete i dane provedene u laboratoriju uz najbolju podršku koju student može očekivati.

Hvala dr. sc. Gordani Šelo na neslužbenoj pomoći i savjetima tijekom rada u laboratoriju.

Najveću zahvalnost dugujem zaručniku Mateu, na potpori tijekom cijelog vremena studiranja, na svakoj napisanoj skripti i savjetu.

POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Kratice:

| | |
|----------|---|
| PAGE | elektroforeza poliakrilamidnim gelom |
| SDS-PAGE | elektroforeza natrij dodecil sulfat – poliakrilamidnim gelom |
| SmF | eng. <i>Submerged fermentation</i> , submerzna fermentacija |
| SSF | eng. <i>Solid-state fermentation</i> , fermentacija na čvrstim nosačima |
| S.A. | specifična aktivnost enzima [U/mL] |
| V.A. | volumna aktivnost enzima [U/mL] |

Simboli:

| | |
|--------------------|---|
| ε | molarni ekstincijski koeficijent [$\text{dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{cm})$] |
| $\gamma_{protein}$ | koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]. |
| U | napon [V] |

Ovaj rad je financirala/sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IPS-2023-02-6614.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 4 |
| 2.1. Enzimi..... | 5 |
| 2.1.2. Enzim ksilanaza..... | 6 |
| 2.2. Fermentacija na čvrstim nosačima..... | 7 |
| 2.2.1. <i>Thermomyces lanuginosus</i> | 8 |
| 2.3. Metode pročišćavanja enzima..... | 8 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 13 |
| 3.1. Zadatak..... | 14 |
| 3.2. Materijali i metode..... | 14 |
| 3.2.1. Kemikalije..... | 14 |
| 3.2.2. Priprema otopina..... | 15 |
| 3.2.3. Proizvodnja enzima endo-1,4- β -ksilanaza..... | 16 |
| 3.2.4. Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaza..... | 18 |
| 3.2.5. Određivanje koncentracije proteina..... | 21 |
| 3.2.6. Određivanje aktivnosti enzima endo-1,4- β -ksilanaza..... | 22 |
| 3.2.7. Ispitivanje utjecaja temperature i pH vrijednosti na aktivnost pročišćenog enzima endo-1,4- β -ksilanaza..... | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 25 |
| 4.1. Proizvodnja sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima..... | 26 |
| 4.2. Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze taloženjem u amonijevom sulfatu..... | 30 |
| 4.3. Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze taloženjem u amonijevom sulfatu i tert-butanolu..... | 31 |
| 4.4. Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze taloženjem u acetonu..... | 33 |
| 4.5. Rezultati provedbe elektroforeze; određivanje molekulske mase enzima endo-1,4- β -ksilanaze..... | 36 |
| 4.6. Utjecaj temperature i pH vrijednosti na aktivnost pročišćenog enzima endo-1,4- β -ksilanaza..... | 37 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 41 |
| 6. LITERATURA..... | 44 |

1. UVOD

Lignocelulozna biomasa je široko rasprostranjeni organski materijal porijeklom iz šumarske, poljoprivredne i prehrambene industrije. Vrlo je složene kemijske strukture koja ovisi o porijeklu biomase koju, u najvećem udjelu, čine tri polimera, lignin (10-24 %_{s.tv.}), hemiceluloza (20-40 %_{s.tv.}) i celuloza (40-60 %_{s.tv.}) (Mujtaba i sur., 2023). Lignin je heterogeni aromatski biopolimer, drugi po zastupljenosti u biljnom materijalu. Sadrži razne kemijske skupine kao što su metoksi, fenolne, hidroksi skupine i druge (Petitjean i sur., 2022). Točni sastav i struktura ovise o izvoru biopolimera, npr. o vrsti biomase, tkiva i sloja stanične stijenke u kojoj nastaje. Prema tome, lignin može nastati u tvrdom drvetu, mekom ili u travama. Meko drvo može sadržavati 27-32 %_{s.tv.} lignina, tvrdo drvo 18-30 %_{s.tv.}, a trave 10-30 %_{s.tv.}. Hemiceluloza je heterogeni polisaharid koji se može pronaći u primarnom i sekundarnom sloju stanične stijenke biljaka (Parlov Vuković i Tišma, 2024). Sastav hemiceluloze može činiti polisaharid glukomanan ili ksilan (Bajpai, 2016) koji su građeni od pentoza (arabinoza i ksiloza), heksoza (galaktoza, glukoza i manoza) te kiselina (galakturonska i glukuronska) (Parlov Vuković i Tišma, 2024). Ksilan je polisaharid kojeg čini ksiloza kao okosnica te arabinoza, ferulinska i octena kiselina, *p*-kumarinska kiselina i glukuronska kiselina ili njezin eter (Bajpai, 2016). Celuloza je najzastupljeniji lignocelulozni, linearni biopolimer u prirodi. Čini je mnoštvo molekula glukoze povezanih β -1,4-glikozidnim vezama. Postoje četiri tipa celuloze, amorfni, amorfni obrađen glicerolom pri visokim temperaturama, regenerativni i prirodni (Parlov Vuković i Tišma, 2024).

Ksilan se može katalitičkim djelovanjem enzima razgraditi do jednostavnijih jedinica koje se dalje mogu koristiti za proizvodnju širokog spektra bioproizvoda. Endo-1,4- β -ksilanaza katalizira hidrolizu unutarne β -1,4-D-ksilozidne veze ksilana. Enzim endo-1,4- β -ksilanaza, proizveden iz termofilnih mikroorganizama, ima široku primjenu u biotehnologiji i industriji zbog mogućnosti podnošenja visokih temperatura i pH vrijednosti. Primjenjuje se u granama industrije kao što su tekstilna, papirna, prehrambena, proizvodnja krmiva i biogoriva (Basit i sur., 2021). Neki od najpoznatijih proizvođača ksilanaza su *Penicillium rubens* (Šekuljica i sur., 2023), *Aspergillus fumigatus* (Ameen, 2023), *Trichoderma reesei* (Yan i sur., 2021) i *Thermomyces lanuginosus* (Šibalić, 2023).

Endo-1,4- β -ksilanaza se u industrijskom mjerilu uglavnom proizvodi metodom fermentacije sumberznog uzgoja (SmF). Zbog visoke cijene hranjive podloge, istražuju se mogućnosti uporabe metode uzgoja mikroorganizama fermentacijom na čvrstim nosačima (SSF) (Šibalić, 2023). Hranjiva podloga, tj. supstrat za SSF je najčešće otpad agrokulture koji je široko

dostupan i jeftin. Još jedan razlog istraživanja SSF za industrijsku primjenu je smanjen negativni utjecaj na okoliš u usporedbi sa SmF (Bajpai, 2014).

Cilj ovog rada je: a) proizvesti endo-1,4- β -ksilanazu uzgojem *T. lanuginosus* na pivskom tropu, kao hemicelulozom bogatim lignoceluloznim supstratom, metodom fermentacije na čvrstim nosačima, b) djelomično pročistiti enzim primjenom različitih metoda taloženja i dijalize; c) ispitati utjecaj pH i temperature na stabilnost enzima; d) odrediti molekulsku masu enzima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Enzimi

Enzimi su molekule globularnog oblika, proteinske prirode. Kataliziraju reakcije unutar živih stanica, te nakon reakcije ostaju nepromijenjeni. Enzimi ne utječu na ravnotežu biokemijskih reakcija nego snižavanju energiju aktivacije reaktanata (supstrata), što za posljedicu ubrzava biokemijske reakcije od 10^6 do 10^{12} puta u usporedbi s nekataliziranim reakcijama. Jedna od najvažnijih karakteristika enzima je selektivnost prema supstratu i vrsti biokemijske reakcije koju katalizira. Selektivnost može biti apsolutna, pri čemu enzim katalizira jednu, točno određenu vrstu reakcije i ima afinitet prema jednom supstratu. Pojedini enzimi samostalno ne mogu katalizirati reakcije. Potrebni su im kofaktori koji mogu biti kovalentno vezani kao što su prostetičke skupine (npr. hem u citokromu) ili vezani nekovalentnim vezama kao što su koenzimi (npr. $NADP^+$ u dehidrogenazi). Svaki enzim sadrži aktivno mjesto. To je regija na koju se veže kofaktor (ukoliko postoji) i nekovalentnim vezama supstrat. Tijekom katalizirane reakcije, enzim i vezani supstrat čine kompleks enzim-supstrat koji se nakon završetka reakcije raspada na enzim (nepromijenjen) i produkt (reakcijom promijenjen supstrat) (Tsai, 2002).

Enzimska komisija (*The Enzyme Commission*) je odredila sustav za određivanje naziva enzima. Sastoji se od 4 broja razmaknutih točkama. Enzimi su podijeljeni u šest razreda s obzirom na ukupnu reakciju koju kataliziraju, te im se dodjeljuje broj ovisno kojem razredu pripadaju: 1. oksidoreduktaze, 2. transferaze, 3. hidrolaze, 4. liaze, 5. izomeraze, 6. ligaze. Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije prijenosa elektrona, tj. reakcije oksidacije i redukcije. Transferaze kataliziraju reakcije premještanja skupine, npr. fosfatne, metilne, amino skupine i drugih. Hidrolaze kataliziraju reakcije cijepanja veza: ugljik-ugljik, ugljik-dušik, ugljik-kisik i druge, u prisustvu vode. Liaze, kao i hidrolaze, kataliziraju reakcije cijepanja istih veza, ali one se događaju mehanizmom eliminacije. Enzimi razreda izomeraza kataliziraju reakcije strukturnih promjena unutar molekula čiji su produkti izomeri. Prema tome postoje izomeraze, epimeraze, tautomeraze, racemaze, mutaze i cikloizomeraze. Ligaze kataliziraju reakcije nastajanja veze između dviju molekula. Kako bi to bilo moguće, kataliziraju u isto vrijeme i hidrolizu adenzin trifosfata ili drugih molekula koje sadrže trifosfat (Aehle, 2004). Drugi i treći broj u nazivu enzima su karakteristični za svaki pojedini razred. Četvrti broj ukazuje na specifični supstrat, to jest na reaktant na koji enzim djeluje (Palmer i Bonner, 2007). Na primjer, za enzim endo-1,4- β -ksilanazu se koristi oznaka Enzimske komisije EC 3.2.1.8.

2.1.2. Enzim ksilanaza

Ksilanaze pripadaju razredu hidrolaza. Nazivaju se još i hemicelulaze jer kataliziraju reakcije hidrolize endo-1,4- β -D-ksiloidne veze ksilana (Aehle, 2004).

Ksilan je glavna sastavnica hemiceluloze. Njegova složena struktura zahtjeva različite enzime za razgradnju (hidrolizu) do monomera ksiloze. Osim ksilanaza kao što su endo-1,4, β -ksilanaza i β -ksilozidaza, potrebni su enzimi: α -glukuronidaza, α -L-arabinofuranozidaza, esteraze fenolne kiseline i esteraze acetilksilana. Kako bi razgradnja bila potpuna, potrebno je sinergistično djelovanje navedenih enzima (Sunna i Antranikian, 1997).

Postojanje ovog enzima u prirodi nije rijetkost. Može se pronaći u bakterijama koje obitavaju u vodenim i kopnenim staništima, algama, gljivama, protozoama pa i u većim organizmima kao što su puževi, insekti i preživači. Također, pronalaze se u drvenastim i jednogodišnjim biljkama. Do sada je enzim pročišćen iz mikroorganizama kao što su *Penicillium rubens* (Šekuljica i sur., 2023), *Aspergillus fumigatus* (Ameen, 2023), *Trichoderma reesei* (Yan i sur., 2021) i *Thermomyces lanuginosus* (Šibalić, 2023).

Endo-1,4- β -ksilanaza (EC 3.2.1.8) ubrzava reakciju cijepanja unutarnjih glikozidnih veza okosnice heteroksilana na što upućuje prefiks „endo-“. S obzirom na složenost strukture supstrata, hidroliza se odvija u više koraka/reakcija koji za primarni produkt imaju ksilooligosaharide te se oni daljnjim cijepanjem veza razgrađuju na završne produkte ksilobiozu, ksilozu i ksilotriozu (Sunna i Antranikian, 1997).

Ksilanaze se mogu podijeliti u dvije obitelji (10 i 11) s obzirom na uvjete izoelektrične točke, molekularne mase, hidrofobne klaster analize i homologije sekvence amino kiselina. Ksilanaze obitelji 10 karakterizira relativno visoka molekularna masa i niska vrijednost izoelektrične točke, dok ksilanaze obitelji 11 imaju nižu molekularnu masu, a višu vrijednost izoelektrične točke. S obzirom na sve uvjete, enzim ksilanaza kojeg proizvodi *T. lanuginosus* pripada obitelji 11 (Singh i sur., 2003).

Primjena ksilanaze

Industrijska primjena enzima podrazumijeva njihovu stabilnost u različitim uvjetima procesa proizvodnje. Termostabilni enzimi (npr. ksilanaze) koje proizvode termofilni mikroorganizmi su pogodni za industrijsku primjenu zbog stabilnosti pri visokim temperaturama, ali i stabilnosti u organskim otapalima, širokom rasponu pH vrijednosti i detergentima (Asad i sur., 2011).

Ksilanaze se najčešće upotrebljavaju u industriji pulpe i papira, prehrambenoj industriji i proizvodnji biogoriva iz otpada agrokulture zbog sposobnosti katalize hidrolize ksilana, sastavnog dijela hemiceluloze (Shahi i sur., 2016).

Ksilanaze se koriste za zamjenu klora kojim se izbjeljuje pulpa za proizvodnju papira zbog produkata reakcije izbjeljivanja koji znatno manje utječu negativno na okoliš u usporedbi s korištenjem klora. Iako se upotrebom ksilanaze ne može u potpunosti izostaviti klor iz procesa, smanjenjem korištene količine klora pozitivno se djeluje na okoliš s obzirom da klor razgrađuje lignin iz pulpe u produkte topljive u vodi ili lužnatim otapalima koji utječu na količinu otpadnih voda (Shahi i sur., 2016).

Grane prehrambene industrije u kojima je primjena ksilanaze najraširenija su pekarska industrija i proizvodnja pića. Koristeći ksilanazu u proizvodnji pekarskih proizvoda povećava se nutritivni sastav, apsorpcija vode i volumen tijesta. U proizvodnji pića se koristi za bistrenje sokova i vina, ekstrakciju kave i biljnih ulja, stabilizaciju pulpe u sokovima uz druge enzime (Shahi i sur., 2016).

Proizvodnja biogoriva (bioetanola) zahtjeva različite hidrolitičke enzime, između kojih su ksilanaze, koji sudjeluju u razgradnji lignina iz lignoceluloze kako bi se izdvojila celuloza i hemiceluloza potrebna za daljnje postupke dobivanja biogoriva (Shahi i sur., 2016).

2.2. Fermentacija na čvrstim nosačima

Fermentacija na čvrstim nosačima (SSF) je način uzgoja mikroorganizama na supstratima u čvrstom stanju koji sadrže vezanu vodu, a vrlo malu količinu slobodne vode (Khandeparkar i Bhosle, 2006). Najjednostavniji primjeri SSF-a su kompostiranje i siliranje.

Kao čvrsti nosač (supstrat) u SSF metodi najčešće se koristi lignocelulozna biomasa. Tijekom fermentacije, supstrat služi kao nosač i kao izvor mikro- i makroelemenata potrebnih za rast i razvoj. Odabrani supstrat za uzgoj mikroorganizma treba biti selektivan tj. treba omogućiti najveću moguću proizvodnju ciljanog produkta, bez obzira je li to sam mikroorganizam ili

njegovi primarni i/ili sekundarni metaboliti. Primjeri takvih supstrata su trop grožđa, pogače iz proizvodnje ulja i prerade kikirikija, pivski trop, mekinje pšenice i slično (Šibalić, 2023).

Zbog povećane tržišne potražnje za sekundarnim metabolitima, SSF je postala predmet mnogih istraživanja kako bi se metoda mogla primijeniti na industrijskoj razini. Problemi zbog kojih ova metoda dosada nije industrijski primjenjiva u proizvodnji visokovrijednih sekundarnih metabolita su heterogenost sustava i problemi s uvećanjem mjerila, održavanje sterilnosti i akumulacija topline nastale metaboličkim procesima (Arora i sur., 2018). Bioreaktori koji se najčešće primjenjuju za SSF, mogu se podijeliti u četiri kategorije s obzirom na način rada: bioreaktor s pliticama, bioreaktor s upuhivanjem komprimiranog zraka, bioreaktori s miješanjem i bioreaktor s fiksnim slojem (Arora i sur., 2018).

2.2.1. *Thermomyces lanuginosus*

Thermomyces lanuginosus je filamentna gljiva termofilnog karaktera, od prije poznata pod nazivom *Humicola lanuginosa*. Prva izolacija ovog mikroorganizma je napravljena 1800.-ih godina iz krumpira uzgojenog na kruhu od bijelog brašna, uz vrtnu zemlju, pri temperaturi oko 52°C. Za današnje potrebe se uobičajeno izolira iz organske biomase koja raspadanjem akumulira toplinu, a prirodna staništa su kompost, drvenaste i zeljaste biljke (uključujući korjenje), izmet preživača i slično (Singh i sur., 2003).

T. lanuginosus ne pripada uobičajenoj taksonomiji carstva gljiva. Smatra se dijelom grupe deuteromiceta tj. nesavršenih gljiva (*fungi imperfecti*) zbog jednostaničnosti i nespolnog načina razmnožavanja. Kolonije su u početku bijele i niže od 1 mm. Daljnjim rastom kolonija postaje siva, od središta prema krajevima, te u kasnijim fazama rasta tamno smeđa/crna. Sojevi *T. lanuginosus* rastu u rasponu temperature od 20 do 60°C, s optimalnom temperaturom rasta 50°C i pH 6,5 (Singh i sur., 2003).

T. lanuginosus se uzgaja u industrijske svrhe za proizvodnju β -ksilanaze, invertaze, pektinaze, lipaze, α -amilaze, glukoamilaze, β -glukozidaze, aminopeptidaze, α -glukozidaze, maltaze, fitaze i proteaze (Jensen i sur., 2002).

2.3. Metode pročišćavanja enzima

Prilikom odabira metode pročišćavanja enzima cilj je odabrati metodu kojom je moguće postići maksimalni prinos uz održavanje maksimalnog stupnja čistoće. Uz to, poželjno je koristiti što manji broj koraka pročišćavanja (Bajpai, 2014).

Metode koje se najčešće koriste za pročišćavanje enzima su: ekstrakcija, precipitacija proteina sa soli, filtracija, ionska kromatografija, afinitetna kromatografija, dijaliza i elektroforeza.

Ekstrakcija

Postupak ekstrakcije se bazira na razlici u topljivosti tvari u različitim otapalima. Ekstrakcija je izvediva ukoliko tvar ima veću topljivost u dodanoj fazi nego u izvornoj. Metoda često ne rezultira dovoljno čistim produktom te se upotrebljava kao prvi korak pri višestrukome pročišćavanju enzima (Aehle, 2007).

Za ekstrakciju intracelularnih enzima najprije je potrebno razoriti stanicu mehaničkom, fizikalnom, kemijskom metodom ili kombinacijom istih. Nakon razaranja stanica, za ekstrakciju enzima se najčešće koristi dvofazna ekstrakcija tekuće-tekuće gdje se faze ne miješaju u potpunosti. Koriste se polimeri kao što su dekstran i polietilen glikol ili polimer u kombinaciji sa soli u vodenoj otopini (Aehle, 2007). Tijekom procesa, izdvojena gornja faza je hidrofobnija od donje (Benavides i sur., 2011).

Ekstracelularni enzimi koji se nalaze u okolini stanica mogu se ekstrahirati dodavanjem otapala (najčešće pufera), te nakon određenog vremena centrifugiranjem izdvojiti (Asad i sur., 2011).

Precipitacija proteina sa soli

Ova metoda se još naziva i isoljavanje. Bazira se na destabilizaciji proteina ionima soli što izaziva agregaciju molekula. Koriste se različite soli, od kojih je najučestalija amonijev sulfat zbog visoke topljivosti, što za rezultat daje otopinu relativno velike ionske jakosti. Također, njegova tržišna cijena je niža u usporedbi s ostalim solima (Duong-Ly i Gabelli, 2014).

Većina proteina nije topljiva u čistoj vodi nego zahtijevaju manju koncentraciju soli u otopini kako bi očuvali konformaciju. Anioni i kationi u relativno malim koncentracijama u otopini soli neutraliziraju naboje na površini proteina, te sprječavaju agregaciju. S povećanjem koncentracije soli u otopini, na površini proteina se ponovno javlja naboj zbog kojeg dolazi do njihove agregacije i izdvajanja. Optimalna koncentracija otopine soli se utvrđuje eksperimentalno za pojedini enzim, a opće je poznato da je raspon koncentracije otopine 20-80 % (Aehle, 2007). Sposobnost različitih aniona za isoljavanje proteina slijedi Hofmeister-ov niz: $PO_4^{3-} > SO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > Br^- > ClO_4^- > I^- > SCN^-$ (Duong-Ly i Gabelli, 2014).

Ovom metodom se može pročistiti većina proteina, bez obzira je li njihova sekvenca poznata. Negativna strana ove metode je kontaminiranost ciljanog proteina s drugim proteinima, koji se u isto vrijeme istalože. Stoga je nakon isoljavanja, potrebno provesti druge metode

pročišćavanja s ciljem izdvajanja kontaminanata (npr. ionska kromatografija) i zaostalih soli (npr. dijaliza) (Duong-Ly i Gabelli, 2014).

Filtracija

Izdvajanje filtracijom se temelji na različitom promjeru molekula. Koriste se različiti filteri za provedbu metode kao što su tlačni, vakuum filteri i filteri križnog strujanja (Aehle, 2007).

Kod procesa filtracije važni su parametri koji utječu na brzinu procesa filtracije su tlak pri kojem se provodi filtracija, viskoznost medija, površina filtra i otpor koji pruža „kolač“ kojeg čini zaostali čvrsti materijal na filtru. Također, potrebno je uzeti u obzir i kompresibilnost biološkog materijala kao što su bakterijski fragmenti i stanice (Aehle, 2007). Proteini se izdvajaju ultrafiltracijom. Ovim načinom se pročišćavaju makromolekule molekulske mase između 1000 i 200 000 Da. Prema tome, smjesa proteina pročišćenih ovom metodom sadrži i druge tvari sličnih molekulskih masa. Metoda se izvodi provođenjem otopine/smjese koja sadrži proteine križnim strujanjem kroz polupropusnu membranu pri tlaku nižem od 1000 kPa. Nakon postupka nastane ultrafiltrat koji sadrži tvari manjih molekulskih masa u usporedbi s onima koje zaostaju u retentatu (Mistry i Maubois, 2004).

Ionska kromatografija

Metoda se bazira na razlici površinskog naboja molekula. Prema tome, može se koristiti za odvajanje gotovo svih iona i molekula s nabojem, na primjer nukleotida, aminokiselina i proteina (Gupta i sur., 2023).

Molekule s površinskim nabojem se razlikuju u stupnju interakcije s kromatografskim medijem pod nabojem. Razlog tome je različit ukupni površinski naboj molekule, te njegova raspodjela na površini i gustoća naboja. Naboj molekule proteina ovisi o pH vrijednosti okoline. Naboj je nula pri izoelektričnoj točki (pri određenoj pH vrijednosti) proteina. Ako se molekula nalazi u puferu čija je pH vrijednost viša od izoelektrične točke, protein je površinski negativno nabijen, te se koristi pozitivno nabijen medij za kromatografiju (ionska smola). U slučaju da je pH vrijednost okoline u kojoj se molekula proteina nalazi niža od vrijednosti izoelektrične točke, protein je pozitivno nabijen, a ionska smola za postupak kromatografije je negativno nabijena (Gupta i sur., 2023).

Medij, to jest ionska smola za kromatografiju, treba zadovoljiti uvjete kapaciteta vezanja molekula/ionu, brzinu protoka, veličinu čestica, pozitivni ili negativni naboj (anionska ili kationska smola) i jačinu ionske izmjene (Gupta i sur., 2023.)

Medij za kromatografiju se nabije u kolonu te čini fiksirani sloj. Kolona se ispiru puferom (ekvilibrira), što je najvažniji korak postupka ionske kromatografije. Nakon toga, kroz kolonu prolazi uzorak (proteini suspendirani u istom puferu koji je korišten za ekvilibraciju). Zatim, slijedi ponovno ispiranje kolone puferom kako bi se isprali proteini vezani nespecifično. Gradijentnim ispiranjem, prvo izlaze iz kolone proteini slabijih naboja, pa redom do onih s najvećim površinskim nabojem. Zadnji korak je regeneracija kolone (medija) puferom velike ionske jakosti nakon čega se kolona može ponovno koristiti za ionsku kromatografiju (Gupta i sur., 2023).

Afinitetna kromatografija

Ova vrsta kromatografije se bazira na reverzibilnim vezama između molekula koje se analiziraju (enzimi, antitijela, nukleinska kiselina...) i tvari kromatografske kolone, liganada (supstrat, antigeni, komplementarna nukleinska kiselina i drugo). Interakcije između molekula i liganada mogu biti hidrofobne, elektrostatske, te mogu biti vezani vodikovim vezama ili van der Waals-ovim vezama. Pojedine molekule koje se žele izdvojiti, ispiru se iz kolone specifično, dodavajući određeni kompetitivni ligand. Ispirati se može i nespecifično promjenom polarnosti, pH ili ionske jakosti medija kolone (Gupta i sur., 2023).

Dijaliza

Postupak se temelji na principu difuzije. Najčešće se uzorci otopina proteina pročišćavaju od soli koje zaostanu nakon prethodnih postupaka pročišćavanja. Polupropusna membrana (vrećica/crijevo za dijalizu) unutar koje se nalazi uzorak, postavlja se u posudu s puferom u kojeg difundiraju molekule soli iz uzorka do ustanovljenja ravnoteže. Tijekom prolaza molekula soli dolazi do kretanja pufera u suprotnom smjeru (prema uzorku). To može uzrokovati razrjeđivanje uzorka najviše do 50 % (Andrew i sur., 2001).

Elektroforeza

Elektroforeza se može definirati kao migracija nabijenih iona u električnom polju. Kako je već spomenuto, proteini pri određenim pH vrijednostima imaju površinski naboj. Prema tome, ovom tehnikom se mogu pročišćavati i izolirati proteini. Razdvajanje se bazira na činjenici da različiti ioni imaju različitu mobilnost u električnom polju (Dennison, 2002).

Elektronska struja u otopinama putuje pomoću iona između dviju elektroda, anode i katode. Kada su elektrode uronjene u otopinu dolazi do razlike potencijala, te uz stabilni, jednolični sastav otopine i stalni otpor, gradijent potencijala (voltaže) je linearan. Na ion, u ovakvom

električnom polju djeluje elektroforetska sila. Ta sila omogućuje ionu pokretljivost do katode ili anode, ovisno o naboju. Na ion djeluje sila trenja čiji iznos u jednom trenutku postane jednak elektroforetskoj sili, te se kretanja iona zaustavlja (Dennison, 2002).

Proteini trebaju biti suspendirani u puferu kako bi održavali površinski naboj. Odabir pufera za elektroforezu znatno utječe na proces. pH vrijednost pufera utječe na vrstu naboja proteina koji može biti pozitivan ili negativan, te time utječe na smjer kretanja iona, prema anodi ili katodi. Ionska jakost pufera utječe na brzinu migracije iona tijekom elektroforeze. Ako je pufer slabije ionske jakosti, ioni „nose“ većinu elektronske struje i njihovo kretanje se ubrzava, elektroforeza traje kraće. Jača ionska jakost pufera omogućava mu da „nosi“ većinu elektronske struje, a ioni manji dio što znači da će se sporije kretati, te će proces elektroforeze trajati dulje. Utjecaj pufera i ionske jakosti je složena pojava koja najviše ovisi o veličini molekula pufera i njihove pokretljivosti (Dennison, 2002).

Postoje različite vrste elektroforeze kao što su: papirna, elektroendoosmoza, elektroforeza s celulozno acetatnom membranom, s agaroznim gelom, škrobnim gelom, poliakrilamidnim gelom (PAGE), natrij dodecil sulfat – poliakrilamid gelom (SDS-PAGE), elektroforeza s diskom, izotahoforeza. Razlikuju se u korištenim materijalima, ali princip razdvajanja je isti (Dennison, 2002).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog rada bio je:

- metodom fermentacije na čvrstim nosačima uzgojiti *Thermomyces lanuginosus* koja će proizvesti enzim endo-1,4- β -ksilanazu,
- pročititi proizvedeni sirovi enzim različitim metodama taloženja: amonijevim sulfatom zasićenosti pri sobnoj temperaturi 20-70 %; smjesom amonijevog sulfata (zasićenosti 20-70 %) i tert-butanola u omjerima 1:1, te 1:2; acetonom volumnog udjela 20-70 % u jednom i dva stupnja,
- procesom dijalize izdvojiti soli zaostale pročišćavanjem uzorka već spomenutim metodama,
- provesti ispitivanja ovisnosti aktivnosti enzima o temperaturi ($T = 25 - 95^{\circ}\text{C}$) i pH (pH = 2 - 10) u nepročišćenom i pročišćenom uzorku,
- odrediti molekulsku masu enzima.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Kemikalije

Kemikalije korištene za provedbu eksperimenata su:

- Bradford reagens, koncentrirani; Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek,
- pšenični arabinoksilan; Megazyme, Irska,
- 3,5-dinitrosalicilna kiselina (98 %); Thermo Scientific Chemicals, Belgija,
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat; Thermo Scientific Chemicals, Belgija,
- natrijev hidrogenfosfat; Thermo Scientific Chemicals, Belgija,
- kalijev natrijev tartarat; Fisher Scientific, SAD,
- volumetrijska otopina natrijevog hidroksida (1 mol/L); GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska,
- klorovodična kiselina; GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska,
- tert-butilni alkohol; Fisher Scientific, SAD,
- aceton; GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska,
- amonijev sulfat; Acros Organics, Belgija.

3.2.2. Priprema otopina

Razrijeđena otopina Bradfordičinog reagensa

Koncentrirani Bradford reagens je razrijeđen destiliranom vodom u volumnom omjeru 1:4. Otopina se priprema neposredno prije upotrebe, a koncentrirani Bradford reagens se skladišti u hladnjaku.

Fosfatni pufer 0,1 M

Fosfatni pufer volumena 1000 mL, te koncentracije 0,1 mol/L pripremljen je miješanjem dviju otopina (A i B). Otopina A dobivena je otapanjem 12,6952 g natrijeva dihidrogenfosfata monohidrata u 460 mL destilirane vode. Otopina B dobivena je otapanjem 1,7034 g natrijeva hidrogenfosfata u 60 mL destilirane vode. Volumen od 442,88 mL otopine A pomiješan je s volumenom od 57,12 mL otopine B. Dobivena otopina volumena 500 mL je promiješana pomoću magnetne miješalice nakon čega se mjerila pH vrijednost otopine pH metrom (HI 2211 pH/ORP Meter, HANNA instruments, SAD). pH vrijednost je korigirana postepenim dodavanjem vrlo malog volumena koncentrirane klorovodične kiseline ili otopine natrijevog hidroksida do vrijednosti 5,95. Fosfatni pufer je prenesen u odmjernu tikvicu označenog volumena 1000 mL, te je dodana destilirana voda do oznake.

1 % otopina arabinoksilana

Pšenični arabinoksilan je korišten u obliku 1 % otopine. Pripremljeno je i korišteno šest otopina pšeničnog arabinoksilana koje se razlikuju u otapalu i pH vrijednosti. Za otopinu pH vrijednosti 6 kao otapalo je korišten već spomenuti fosfatni pufer pH vrijednosti 5,95, a za drugu otopinu destilirana voda. Dodatno je za 4 otopine arabinoksilana, u fosfatni pufer otpipetirana dovoljna količina koncentrirane klorovodične kiseline ili otopine natrijevog hidroksida kako bi se postigle pH vrijednosti 2, 4, 8 i 10. 0,3 g pšeničnog arabinoksilana otopljeno je u 30 mL otapala (fosfatni pufer različite pH vrijednosti/destilirana voda) minimalnim zagrijavanjem i miješanjem.

DNS reagens

DNS reagens je pripremljen otapanjem 10,9 g 98 % 3,5-dinitrosalicilne kiseline u 400 mL 0,5 mol/mL otopine natrijevog hidroksida miješanjem na magnetnoj miješalici, te zagrijavanjem na 60°C. Nakon toga, postepeno se dodaje 150 g kalijeva natrijeva tartarata dok se u potpunosti ne otopi. Otopina se prenese u odmjernu tikvicu, te nakon hlađenja na sobnu temperaturu, nadopunjena je destiliranom vodom do oznake volumena od 500 mL.

Otopine amonijevog sulfata

Pri sobnoj temperaturi otopina amonijevog sulfata je zasićena pri 4,1 M. Ova koncentracija se postiže otapanjem 541,774 g amonijevog sulfata u 1000 mL destilirane vode. Za provedbu zadatka ovog rada potrebne su otopine zasićenosti 20, 30, 40, 50, 60 i 70 %.

Masa amonijevog sulfata potrebna za ostvarivanje određene koncentracije otopine na 1000 mL računa se po formuli (1):

$$x = \frac{541,774 \cdot y}{100} \text{ g} \quad (1)$$

gdje je:

x – masa amonijevog sulfata potrebnog za postizanje otopine određene koncentracije [g]

y - zasićenost otopine koju je potrebno izračunati [%].

Na primjer, za otopinu zasićenosti 20 %:

$$x = \frac{541,774 \cdot 20}{100} \text{ g}$$

$$x = 108,3548 \text{ g.}$$

Formula (1) se na isti način primjenjuje za otopine druge zasićenosti.

3.2.3. Proizvodnja enzima endo-1,4- β -ksilanaza

3.2.3.1. Mikroorganizam i supstrat

Mikroorganizam korišten u svrhu ovog istraživanja je gljiva *T. lanuginosus*, uzgojena na krumpirovom dekstroza agaru (Liofilchem S.r.l., Italija) u vremenskom rasponu od deset dana.

Supstrat korišten za rast *T. lanuginosus* je pivski trop (Slika 1) (Osječka pivovara, Hrvatska).

Skladišten je u zamrzivaču te je prije upotrebe odmrznut na sobnu temperaturu i promiješan.

Prosječna vlažnost uzoraka pivskog tropa za uzgoj *T. lanuginosus* je 79 %.



Slika 1 Pivski trop pripremljen za proces fermentacije na čvrstim nosačima (osobna arhiva).

3.2.3.2. Fermentacija na čvrstim nosačima (SSF)

Proces fermentacije je proveden u standardnim staklenkama u koje je odvagano 50 g pivskog tropa. Staklenke sa supstratom su sterilizirane u autoklavu (AMA 270, Astell Scientific Ltd) na 121°C tijekom 15 minuta. Nakon toga su ohlađene na sobnu temperaturu i inokulirane s *T. lanuginosus* u sterilnim uvjetima. Inokulacija svake staklenke je provedena s pet micelijskih diskova (promjer 1 cm) uronjenih i promiješanih u 10 mL destilirane vode. Staklenke su dobro protresene i prekrivene polupropusnom membranom.. Nakon toga se odvija fermentacija na 45°C, pri 20 % ventilacije tijekom 10 dana u inkubatoru (KB 115, BINDER GmbH). Primjer rasta *T. lanuginosus* na pivskom tropu prikazan je na **Slici 2**.



Slika 2 *T. lanuginosus* na pivskom trupu nakon 10 dana fermentacije (osobna arhiva).

3.2.3.3. Ekstrakcija enzima endo-1,4- β -ksilanaza

Svakih 24 h fermentacije tijekom 10 dana, provedena je kruto-tekuća ekstrakcija enzima. Najprije je izvagana staklenka s fermentacijskom smjesom (pivskim tropom i mikroorganizmom) kako bi se pratila promjena mase fermentacijske smjese tijekom fermentacije.

Reakcijska smjesa je homogenizirana, nakon čega su izdvojena dva uzorka od 2 g od kojih je jedan pomiješan s destiliranom vodom volumena 10 mL, a drugi s fosfatnim puferom istog volumena. Uzorci su zatim vorteksirani (Vortex MX-S, DLAB Scientific) 15 sekundi svakih 5 minuta, u vremenu od 30 minuta. Zatim su podvrgnuti centrifugiranju na centrifugi prikazanoj na **Slici 3** (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH) tijekom 5 minuta, na 11000 *rcf*. Nakon centrifugiranja, supernatant je izdvojen te korišten u daljnjoj analizi.



Slika 3 Centrifuga Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH (osobna arhiva).

3.2.4. Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaza

3.2.4.1. Taloženje u amonijevom sulfatu

Enzim endo-1,4- β -ksilanaza se istaloži iz supernatanta volumena 2 mL, nakon procesa ekstrakcije, dodavanjem amonijevog sulfata do zasićenosti 20, 30, 40, 50, 60 i 70 % (Ding i sur., 2017). Uzorci su potom promiješani na vorteksu (Vortex MX-S, DLAB Scientific) dok se

sav amonijev sulfat ne otopi. Taloženje se odvija 24 h, pri +4 °C.. Nakon taloženja, uzorci su centrifugirani (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH) 15 minuta, na 9000 rcf.

3.2.4.2. Taloženje u amonijevom sulfatu i t-butanolu

Ovaj proces pročišćavanja uzorka se provodi na isti način kao taloženje u amonijevom sulfatu, uz dodatak *t*-butanola. Pročišćavanje je provedeno u omjerima; amonijev sulfat:*t*-butanol=1:1, te 1:2 (Sikdar i sur., 2021).

3.2.4.3. Taloženje u acetonu

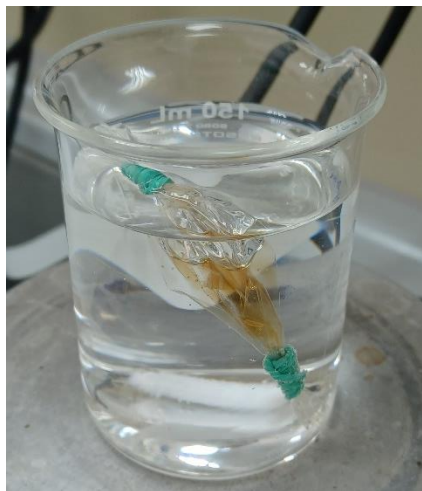
Pročišćavanje acetonom je provedeno jednostupanjski i dvostupanjski.

Za ovu vrstu pročišćavanja korišten je hladni aceton, ohlađen u zamrzivaču na temperaturu od -20°C. Koncentracije acetona (20, 30, 40, 50, 60 i 70 %) su izračunate na ukupni volumen uzorka (sirovog ekstrakta) i acetona. Uzorku se dodaje izračunati volumen acetona ovisno o potrebnoj koncentraciji, te se kratko stavlja na vorteks (Vortex MX-S, DLAB Scientific). Uzorci su skladišteni tijekom 24 h u hladnjaku te centrifugirani (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH) na 9000 rcf, tijekom 15 minuta.

Dvostupanjsko taloženje hladnim acetonom podrazumijeva isti postupak naveden u ovom poglavlju, nakon kojeg se dodaje ohlađeni aceton ($T = -20^{\circ}\text{C}$) u omjeru 1:1 u supernatant.

3.2.4.4. Dijaliza

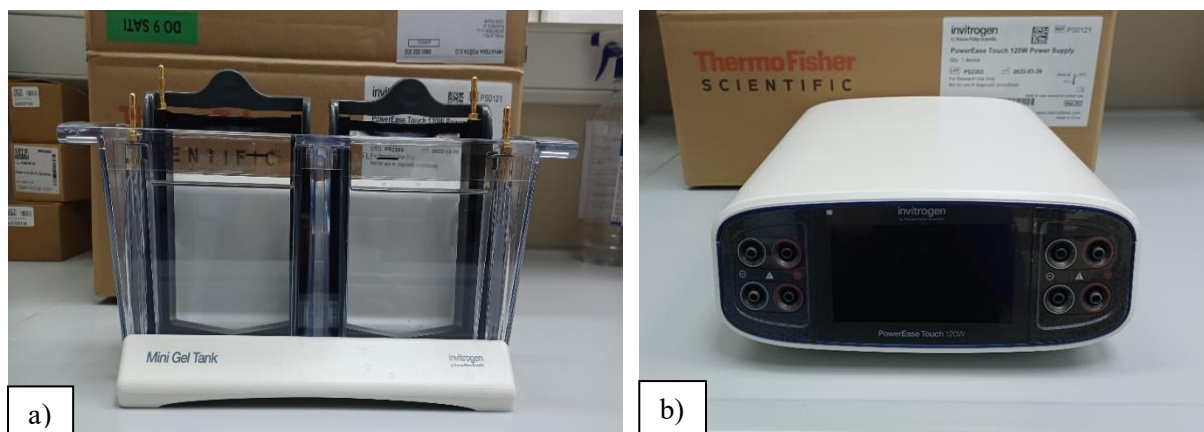
Korišteno je crijevo za dijalizu, prethodno izrezanos obzirom na volumen uzorka i posude u kojoj se proces odvija. Jedna strana crijeva se zaveže, te se uzorak prenese pipetom, nakon čega se zaveže i druga strana. Crijevo s uzorkom je postavljeno u posudu napunjenu fosfatnim puferom pH vrijednosti 6 (Slika 4). Proces dijalize se odvijao tijekom 24 h, na magnetnoj miješalici, lagano miješajući.



Slika 4 Dijaliza (procesni uvjeti: $t = 24$ h, $T = 20^{\circ}\text{C}$, uzorak enzima djelomično pročišćen metodom s 50 % amonijevim sulfatom) (osobna arhiva).

3.2.4.5. Elektroforeza

Elektroforeza proteina provedena je primjenom 16 % poliakrilamidnih gelova (Novex™ Tris-Glycine Mini Gels) za optimalno odvajanje i rezoluciju širokog raspona proteina (8–250 kDa) u uvjetima denaturirajuće gel elektroforeze. Elektroforeza proteinskog gela provedena je prema originalnom protokolu proizvođača za navedene gelove. Uzorak je pripremljen u epruveti u ukupnom volumenu od 40 μL za elektroforezu, uključujući 10 μL uzorka proteina, 20 μL Tris-glicina pufera za uzorak (Tris-Glycine SDS Sample Buffer, Thermo Fisher), 4 μL reducirajućeg sredstva (NuPAGE™ Sample Reducing Agent, Thermo Fisher) i 6 μL ultra čiste vode. Uzorak je inkubiran 10 minuta na 85°C . Pufer za elektroforezu pripremljen je razrjeđivanjem 100 mL Tris-glicina pufera (10X Tris-Glycine Native Running Buffer, Thermo Fisher) u 900 mL ultra čiste vode. U svaku komoru spremnika za elektroforezu (Mini Gel Tank, Thermo Fisher) (**Slika 5 a**) dodano je po 400 mL deset puta razrijeđenog Tris-glicina pufera (**Slika 5 a**). Gelovi su pripremljeni uklanjanjem češlja, a jažice gela isprane su tri puta s deset puta razrijeđenim Tris-glicin puferom. Zatim su uklonjene bijele trake na dnu kazeta s gelom, nakon čega su gelovi umetnuti u komore spremnika za elektroforezu.



Slika 5 a) Spremnik za elektroforezu, Mini Gel Tank, Thermo Fisher, b) Izvor istosmjerne struje PowerEase Touch 120W Power Supply, Thermo Fisher (osobna arhiva).

Nakon inkubacije, uzorci su injektirani u jažice gela. U prvu jažicu dodano je 40 μL uzorka s proteinskim markerima (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa). U preostale jažice dodano je 40 μL pripremljenog uzorka pročišćene endo-1,4- β -ksilanaze u različitim razrjeđenjima. Nakon dodavanja uzoraka, sustav je zatvoren poklopcem i priključen na izvor istosmjerne struje (**Slika 5 b**) s konstantnim naponom ($U = 200 \text{ V}$) (PowerEase Touch 120W Power Supply, Thermo Fisher). Elektroforeza je trajala 40 minuta, dok se crta s uzorcima nije spustila do dna stakala. Nakon završetka elektroforeze, gel je odvojen od stakala i podvrgnut bojanju prema metodi Šibalić, 2023. Otopina za bojenje pripremljena je otapanjem 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 u 50 mL metanola, 7 mL vodene otopine okten kiseline (10 %, v/v) i 43 mL ultra čiste vode. Bojanje je provedeno u digestoru u trajanju od 1 sat. Nakon bojanja, gel je odbojen tako da je otopina za bojenje uklonjena, a gel prekriven ultra čistom vodom uz nekoliko izmjena vode tijekom 12 sati.

3.2.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određena Bradfordčinom metodom. Bojilo Coomassie Brilliant Blue G-250 u anionskom obliku je korišten kao reagens. U dodiru s proteinima reagira stvaranjem kompleksa boja:protein, a veže se na bočne ogranke proteina. Kompleks pri 595 nm ukazuje na apsorpcijski maksimum (Strelec, 2009).

Spektrofotometar se nulira slijepom probom koju čini destilirana voda u kiveti. U ostale kivete se otpipetira 100 μL ekstrakta proteina i 2 mL reagensa netom pripremljenog. Osigurava se pet minuta vremena za reakciju i nastajanje kompleksa boja:protein te se spektrofotometrom (**Slika 6**) (Shimadzu, UV-1280) mjeri apsorbanacija pri 595 nm.



Slika 6 Spektrofotometar Shimadzu, UV-1280 (osobna arhiva).

3.2.6. Određivanje aktivnosti enzima endo-1,4-β-ksilanaza

Aktivnost enzima je određena metodom po Bailey-u (1992). Metoda je provedena s 1 % otopinama arabinoksilana u destiliranoj vodi i fosfatnom puferu pH 5.95 kao otapalima (3.2.2.).

Tijekom metode pripremljene su dvije slijepe probe, dvije epruvete za provjeru koncentracije enzima, te šest glavnih proba.

900 μL otopine arabinoksilana je otpipetirano u sve epruvete (5 epruveta s vodenom otopinom i 5 s puferskom). Za glavne probe otpipetirano je po 100 μL ekstrakta enzima, nakon čega su promiješane na vorteksu (Vortex MX-S, DLAB Scientific). Uzorci su zatim inkubirani u vodenoj kupelji (Elma, Elmasonic P 120 H) pet minuta pri 65°C (Slika 7). 1,5 mL DNS reagensa je otpipetirano nakon inkubacije, u svaku epruvetu, te dodatno 100 μL destilirane vode ili fosfatnog pufera u epruvete za slijepe probe, ovisno o otopini arabinoksilana. 100 μL ekstrakta enzima je otpipetirano u epruvete za provjeru koncentracije enzima. Svi uzorci su još jednom kratko promiješani na vorteksu i inkubirani u vodenoj kupelji tijekom pet minuta, 100°C. Nakon hlađenja, izmjerena je apsorbancija spektrofotometrom (Shimadzu, UV-1280) pri 540 nm.

Volumne i specifične aktivnosti enzima izračunate su prema sljedećim formulama:

$$V \cdot A = \frac{v_R}{\epsilon \cdot d \cdot v_E} \cdot \frac{dA}{dt} \quad \text{U/mL} \quad (2)$$

gdje je:

V.A. – volumna aktivnost enzima endo-1,4- β -ksilanaze [U/mL]

v_R – ukupni volumen uzorka [mL]

ϵ – molarni ekstincijski koeficijent ksiloze [dm³/(mol · cm)]

d - promjer kivete [cm]

$\frac{dA}{dt}$ – promjena apsorpcije u vremenu [-].

S.A. je računata po formuli (3):

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_{protein}} \quad U/mg \quad (3)$$

gdje je:

S.A. – specifična aktivnost enzima [U/mg]

$\gamma_{protein}$ – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL].



Slika 7 Vodena kupelj Elma, Elmasonic P 120 H (osobna arhiva).

3.2.7. Ispitivanje utjecaja temperature i pH vrijednosti na aktivnost pročišćenog enzima endo-1,4- β -ksilanaza

Ispitivanje ovisnosti aktivnosti enzima o pH i temperaturi provedeno je sa sirovim enzimom i enzimima pročišćenima taloženjem u amonijevom sulfatu (zasićenosti 50 %) i dvostupanjskom metodom taloženja s acetonom.

Utjecaj temperature na aktivnost enzima

S ciljem dokazivanja utjecaja temperature na aktivnost enzima, pripremljeni su uzorci kako je opisano u poglavlju **3.2.6.** za određivanje aktivnosti enzima, te su inkubirani na temperaturama 25, 35, 45, 65, 75, 85 i 95°C. Kao supstrat korištena je 1% puferaska otopina arabinoksilana (pH = 5,95).

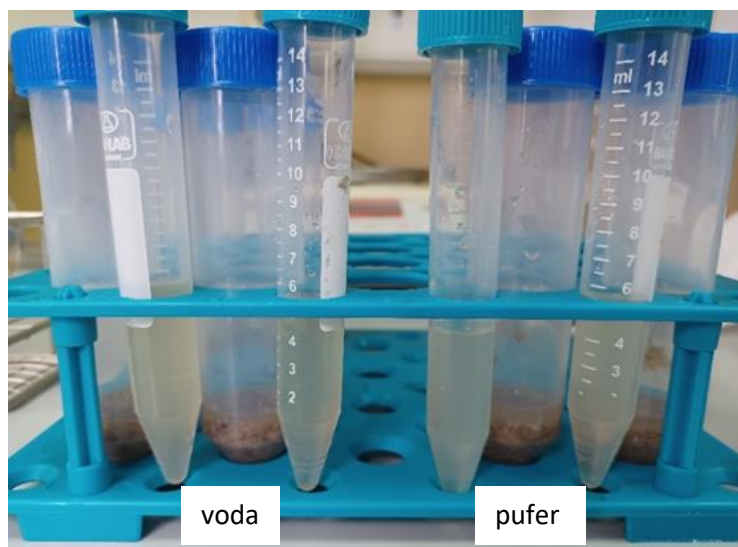
Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost enzima

Analiza dinamičke promjene aktivnosti enzima o pH vrijednosti provedena je metodom opisanom poglavljem **3.2.6.** Uzorci su inkubirani pri 65°C. Postupak je proveden pri pH vrijednostima pH 2, 4, 6, 8 i 10. Korištene su 1% puferске otopine arabinoksilana pH 2, 4, 6, 8 i 10 pripremljene postupkom opisanim u poglavlju **3.2.2.**

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Proizvodnja sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Proces uzgoja *T. lanuginosus* na pivskom tropu trajao je 10 dana. Svakodnevno je mjerena gubitak mase fermentacijske smjese, pH te volumne i specifične aktivnosti sirovog ekstrakta enzima ekstrahiranog u destiliranoj vodi i u fosfatnom puferu (pH = 5,95). Pripremljeni ekstrakti za mjerenje aktivnosti enzima prikazani su na **Slici 8**.

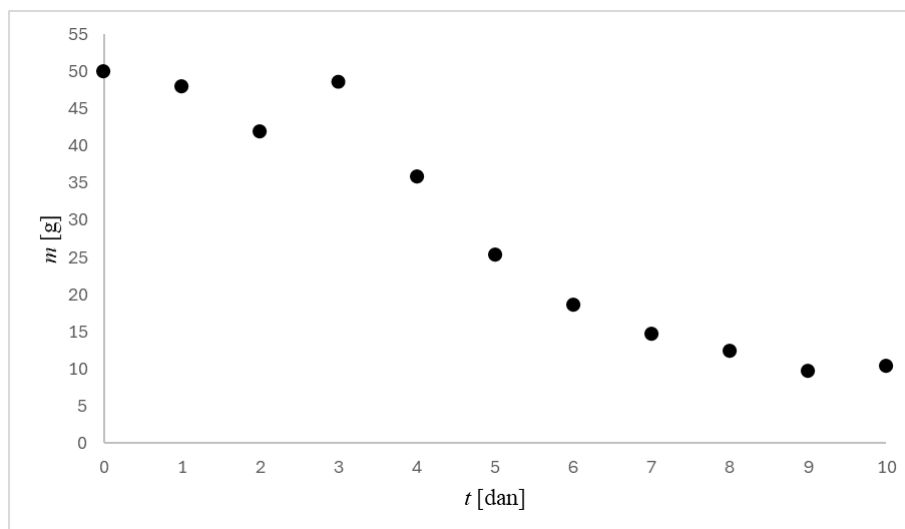


Slika 8 Pripremljeni ekstrakti enzima endo-1,4- β -ksilanaze nakon prvog dana fermentacije (uvjeti ekstrakcije: omjer kruto-tekuće 5 mL/g, $t = 30$ min, $T = 20^{\circ}\text{C}$, centrifugiranje pri 11000 rcf, $t = 5$ min) (osobna arhiva).

Nakon prvog dana fermentacije dobiveno je oko 5 mL sirovog ekstrakta enzima (ekstrakcijom 2 g fermentacijske smjese u 10 mL destilirane vode odnosno pufera). Primijećeno je da se volumen ekstrakta kojeg je moguće izdvojiti tijekom fermentacije smanjuje, zbog smanjenja vlažnosti fermentacijske smjese što je posljedica isparavanja vode.

Promjena gubitka mase fermentacijske smjese tijekom fermentacije

Masa fermentacijske smjese je mjerena svaki dan tijekom fermentacije. Rezultati aritmetičke sredine mjerenja (2 ili 3 teglica) prikazani su na **Slici 9**.

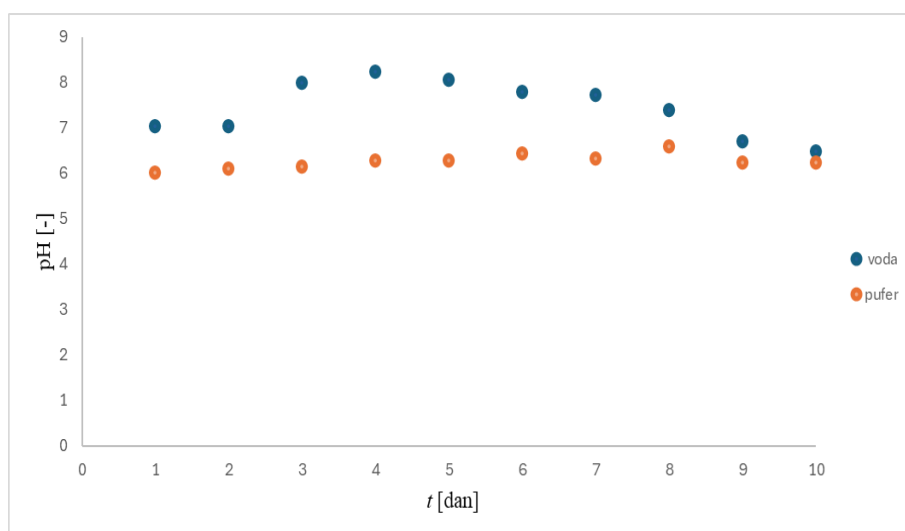


Slika 9 Srednje vrijednosti mase fermentacijske smjese u ovisnosti o vremenu fermentacije.

Iz **Slike 9** vidljivo je da dolazi do smanjenja mase fermentacijske smjese tijekom fermentacije. Nakon 10 dana fermentacije gubitak na masi je bio 20,84 %. Smanjenje mase fermentacijske smjese se događa zbog gubitka vlažnosti i razgradnje supstrata i oslobađanja CO₂, uslijed katalitičke aktivnosti enzima iz *T. lanuginosus*.

Promjena pH vrijednosti

pH vrijednost sirovog ekstrakta enzima endo-1,4-β-ksilanaze određivana je u uzorcima ekstrahiranim destiliranom vodom i fosfatnim puferom (pH = 5,95). Na **Slici 10** prikazana je promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije.

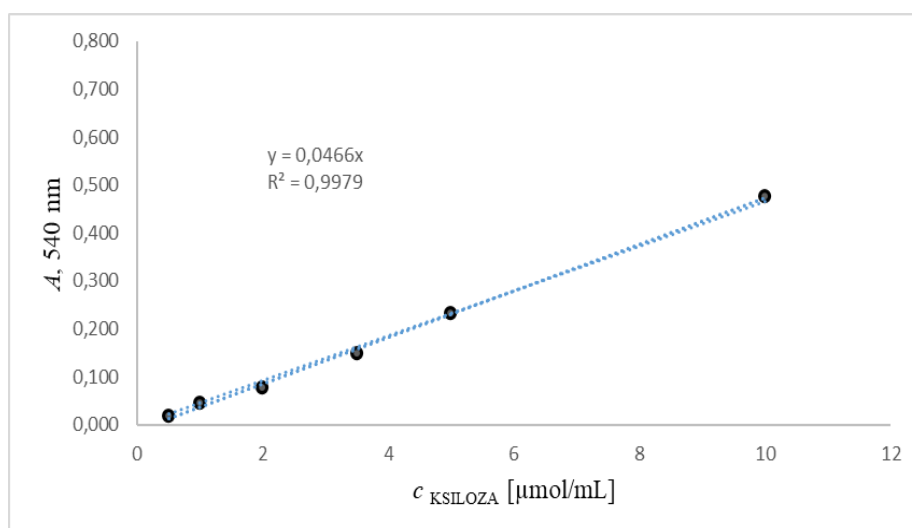


Slika 10 Srednja vrijednost pH fermentacijske smjese u ovisnosti o vremenu fermentacije.

Vrijednost pH u oba uzorka počinje rasti treći dan fermentacije, te se smanjuje postepeno i približno do početne vrijednosti od 7,04 za uzorak s destiliranom vodom i 6,09 za uzorak s fosfatnim puferom desetog dana, kada je fermentacija prekinuta. Tijek promjene vrijednosti se može povezati s fazama rasta mikroorganizma. Metaboliti koji nastaju rastom mikroorganizama (npr. amino kiseline, lipidi, ugljikohidrati i slično) mogu utjecati na pH vrijednost okoline mikroorganizma (Kumar i sur., 2021). Za većinu sojeva *T. lanuginosus*, optimalna vrijednost pH za rast i razvoj je 6,5 (Singh i sur., 2003). Prema tome, pretpostavlja se da će se postići veće aktivnosti s enzimom koji je ekstrahiran u puferu, o odnosu na onaj koji je ekstrahiran u vodi. Ova pretpostavka je dokazana, a rezultati mjerenja specifične aktivnosti dvaju ekstrakata (ekstrakt u vodi i ekstrakt u puferu) su prikazani u sljedećem poglavlju

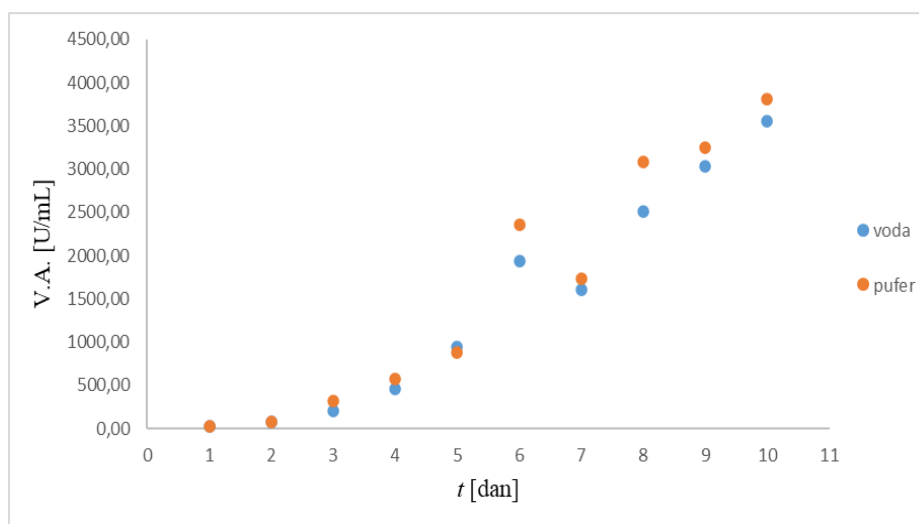
Volumna i specifična aktivnost sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze

Enzim je ekstrahiran u destiliranoj vodi i u fosfatnom puferu (pH = 5,95). Provedene su dvije paralelne probe. Mjerene su volumna i specifična aktivnost prema prethodno opisanim metodama. Volumna aktivnost je izračunata pomoću baždarnе krivulje prikazane na **Slici 11** i ekstincijskog koeficijenta ϵ .

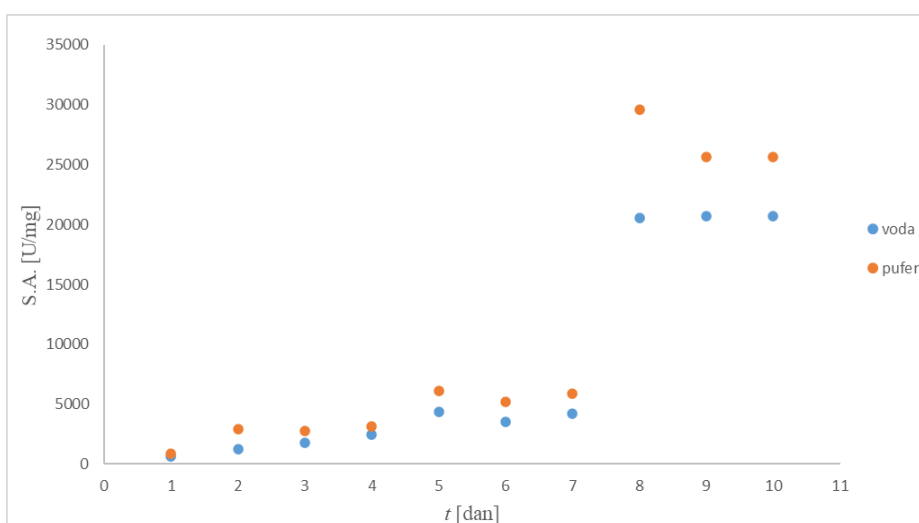


Slika 11 Baždarna krivulja za izračun volumne aktivnosti enzima

Slika 12 prikazuje usporedbu volumnih aktivnosti, a **Slika 13** usporedbu specifičnih aktivnosti sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze ekstrahiranog destiliranom vodom (plava boja) i fosfatnim puferom (narandžasta boja) tijekom 10 dana fermentacije. Izmjerene su veće aktivnosti, i volumne i specifične, s uzrokom koji je ekstrahiran u fosfatnom puferu. Budući da je najveća specifična aktivnost izmjerena nakon osmog dana, svi ostali pokusi provedeni su s enzimom ekstrahiranom u puferu nakon 8 dana fermentacije. 3 mL sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze dobije se ekstrakcijom 2 g materijala u 10 mL fosfatnog pufera.



Slika 12 Ovisnost volumne aktivnosti enzima o vremenu fermentacije.

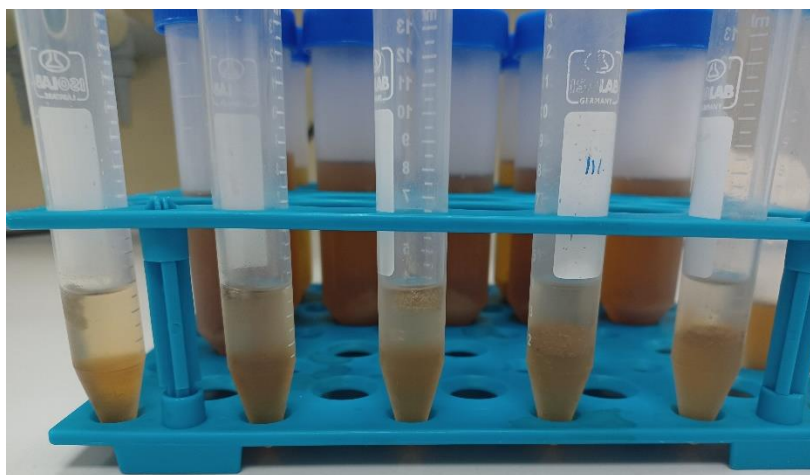


Slika 13 Ovisnost specifične aktivnosti enzima o vremenu fermentacije

4.2. Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze taloženjem u amonijevom sulfatu

Sirovi ekstrakt enzima, ekstrahiran u puferu nakon osmog dana fermentacije *T. lanuginosus* djelomično je pročišćen metodom taloženja različitim koncentracijama (20-70 %) amonijevog sulfata u uzorku.

Taloženjem proteina (enzima) amonijevim sulfatom u uzorku nastanu dva sloja, gornji i donji sloj (**Slika 14**). Koncentracija proteina u gornjem sloju (proteinskom) je veća s obzirom na donji sloj. Za analizu je otpipetiran gornji sloj, dok je donji sloj analiziran kao neformalna provjera rezultata analize gornjeg sloja.



Slika 14 Uzorci sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze podvrgnuti ekstrakciji taloženjem amonijevim sulfatom (uvjeti ekstrakcije: 20-70% amonijev sulfat, $t = 24$ h, $T = 4^{\circ}\text{C}$, centrifugiranje pri 9000 rcf, $t = 15$ minuta) (osobna arhiva).

Rezultati su prikazani u **Tablici 1**. Najveći stupanj pročišćavanja i prinos enzima endo-1,4- β -ksilanaze postigut je koristeći otopinu uzorka s 50 %-im amonijevim sulfatom. Relativno male koncentracije soli, u ovom slučaju amonijevog sulfata, u otopini proteina sprječava njegovu aglomeraciju, te time i taloženje (Duong-Ly i Gabelli, 2014). Veće koncentracije soli u uzorku rezultiraju relativno velikim stupnjem pročišćavanja, ali daju manje prinose. Za ovaj primjer mogu se usporediti rezultati iz **Tablice 1** za uzorke pročišćene s 50 i 70 % amonijevog sulfata u uzorku. Razlika u stupnju pročišćavanja je 0,97, dok je razlika u prinosu 49,20 %.

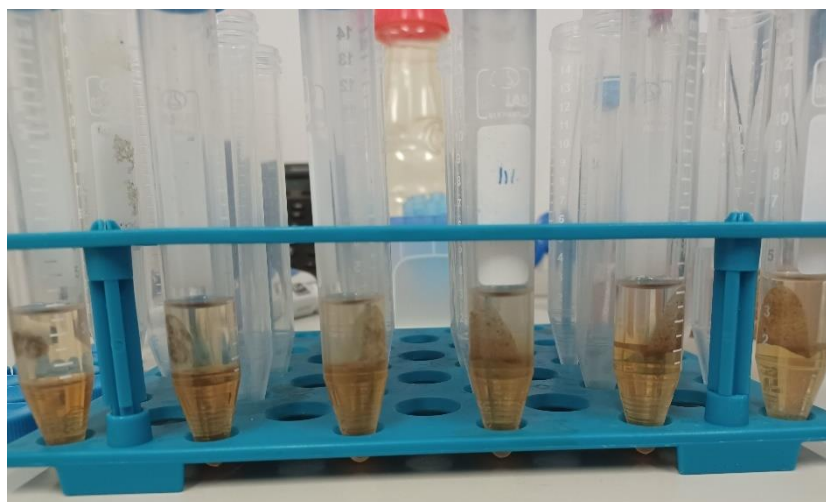
Tablica 1 Rezultati pročišćavanja sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze taloženjem u amonijevom sulfatu (uvjeti ekstrakcije: 20-70% amonijev sulfat, $t = 24$ h, $T = 4^\circ\text{C}$, centrifugiranje pri 9000 rcf, $t = 15$ minuta)

| Uzorak | Stupanj pročišćavanja | Prinos (%) | Koncentracijski faktor |
|-------------------------|-----------------------|------------|------------------------|
| 20 % amonijevog sulfata | 0,47 | 4,56 | 10 |
| 30 % amonijevog sulfata | 0,58 | 5,05 | 10 |
| 40 % amonijevog sulfata | 7,76 | 62,36 | 10 |
| 50 % amonijevog sulfata | 11,06 | 124,67 | 10 |
| 60 % amonijevog sulfata | 8,52 | 80,10 | 10 |
| 70 % amonijevog sulfata | 10,08 | 75,47 | 10 |

4.3. Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze taloženjem u amonijevom sulfatu i *tert*-butanolu

Omjer amonijev sulfat : *t*-butanol = 1:1

U usporedbi s postupkom taloženja s amonijevim-sulfatom, primjenom *t*-butanola na kraju procesa pročišćavanja nastanu tri sloja: gornji sloj (sadrži *t*-butanol), srednji sloj (sloj proteina) i donji sloj (sadrži amonijev sulfat) (**Slika 15**)



Slika 15 Uzorci sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze podvrgnuti ekstrakciji taloženjem amonijevim sulfatom i *tert*-butanolom (uvjeti ekstrakcije: amonijev sulfat:*t*-butanol=1:1, $t = 24$ h, $T = 4^\circ\text{C}$, centrifugiranje pri 9000 rcf, $t = 15$ min) (osobna arhiva).

Rezultati su prikazani u **Tablicom 1**. Pročišćavanje uzorka s 50 % amonijevim sulfatom i *t*-butanolom rezultira najvećim stupnjem pročišćavanja od 2,85 u usporedbi s uzorcima

pročišćavani drugim udjelom amonijeva sulfata (uz *t*-butanol). Uzorak pročišćen s 60 % amonijevim sulfatom i *t*-butanolom rezultira najvećim prinosom od 59,86 %, što je razlika od 1,80 % u usporedbi s prethodno spomenutim uzorkom. Razlika stupnja pročišćavanja ova dva uzorka je 0,54.

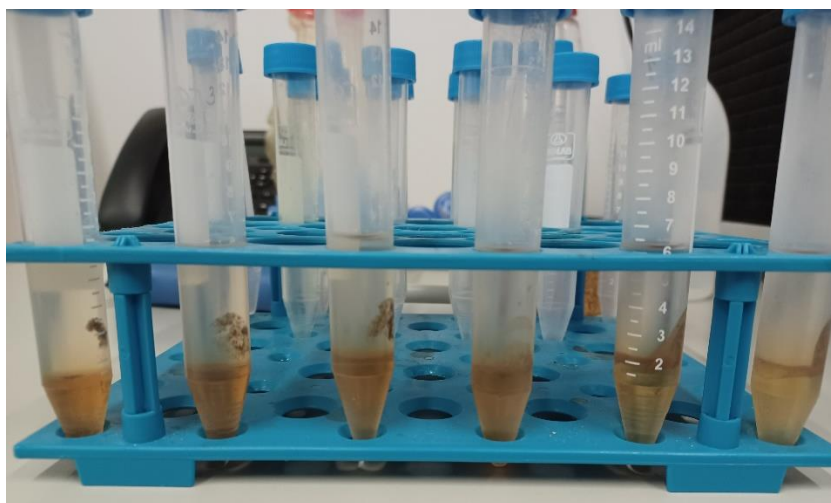
Tablica 2 Rezultati pročišćavanja sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze taloženjem u amonijevom sulfatu i *t*-butanolu (uvjeti ekstrakcije: amonijev sulfat:*t*-butanol=1:1, $t = 24$ h, $T = 4^\circ\text{C}$, centrifugiranje pri 9000 rcf, $t = 15$ min).

| Uzorak | Stupanj pročišćavanja | Prinos (%) | Koncentracijski faktor |
|-------------------------|-----------------------|------------|------------------------|
| 20 % amonijevog sulfata | 0,16 | 1,17 | 10 |
| 30 % amonijevog sulfata | 1,13 | 5,83 | 10 |
| 40 % amonijevog sulfata | 1,56 | 16,34 | 10 |
| 50 % amonijevog sulfata | 2,85 | 58,06 | 10 |
| 60 % amonijevog sulfata | 2,31 | 59,86 | 10 |
| 70 % amonijevog sulfata | 1,64 | 56,89 | 10 |

Omjer amonijev sulfat : *t*-butanol = 1:2

Metoda se razlikuje od prethodne u korištenom volumenu *t*-butanola za analizu koji se određuje prema omjeru amonijev sulfat:*t*-butanol = 1:2. Udjeli amonijevog sulfata ostaju isti (20-70 %).

Završetkom metode pročišćavanja, nastanu tri sloja (**Slika 16**) koja se ne razlikuju značajno od onih u prethodnoj metodi.



Slika 16 Uzorci sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze podvrgnuti ekstrakciji taloženjem amonijevim sulfatom i *tert*-butanolom (uvjeti ekstrakcije: amonijev sulfat:*t*-butanol=1:2, $t = 24$ h, $T = 4^\circ\text{C}$, centrifugiranje pri 9000 rcf, $t = 15$ min) (osobna arhiva).

Rezultati su prikazani u **Tablici 3**. Najveći stupanj pročišćavanja (5,44) postignut je korištenjem 50 % amonijevog sulfata i *t*-butanola (1:2). Korištenje 70 % amonijevog sulfata i *t*-butanola (1:2) rezultira najvećim prinosom od 163,81 %. Razlika u stupnju pročišćavanja u ova dva uzorka je 2,30, a u prinosu je 8,91 %.

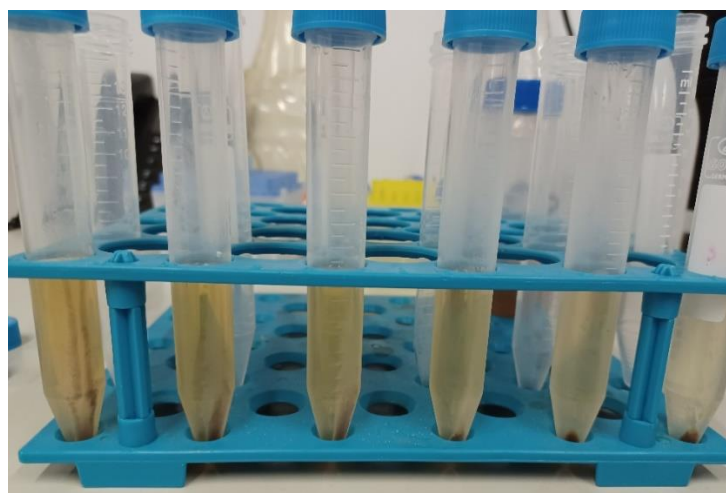
Tablica 3 Rezultati pročišćavanja sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze taloženjem u amonijevom sulfatu i *t*-butanolu (uvjeti ekstrakcije: amonijev sulfat:*t*-butanol=1:2, *t* = 24 h, *T* = 4°C, centrifugiranje pri 9000 rcf, *t* = 15 min).

| Uzorak | Stupanj pročišćavanja | Prinos (%) | Koncentracijski faktor |
|-------------------------|-----------------------|------------|------------------------|
| 20 % amonijevog sulfata | 0,81 | 4,77 | 10 |
| 30 % amonijevog sulfata | 0,86 | 5,51 | 10 |
| 40 % amonijevog sulfata | 3,09 | 32,24 | 10 |
| 50 % amonijevog sulfata | 5,44 | 154,90 | 10 |
| 60 % amonijevog sulfata | 3,09 | 156,55 | 10 |
| 70 % amonijevog sulfata | 3,14 | 163,81 | 10 |

4.4. Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze taloženjem u acetonu

Jednostupanjnsko pročišćavanje u hladnom acetonu

Prikaz uzoraka nakon ekstrakcije u hladnom acetonu, odležavanja i centrifugiranja, prikazan je na **Slici 17**.



Slika 17 Uzorci sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze podvrgnuti ekstrakciji taloženjem hladnim acetonom (uvjeti ekstrakcije: jednostupanjnsko, *T*(aceton) = -20°C, *t* = 24 h, *T*(taloženje) = 4°C, centrifugiranje pri 9000 rcf, *t* = 15 min) (osobna arhiva).

Razlika u supernatantima nastalih korištenjem 20 i 70 % acetonom vidljiva je u njihovoj boji i bistrini (**Slika 18**).



Slika 18 Supernatanti nastali pročišćavanjem sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze hladnim acetonom (uvjeti ekstrakcije: jednostupanjsko, $T(\text{aceton}) = -20^{\circ}\text{C}$, $t = 24$ h, $T(\text{taloženje}) = 4^{\circ}\text{C}$, centrifugiranje pri 9000 rcf, 15 minuta) (osobna arhiva).

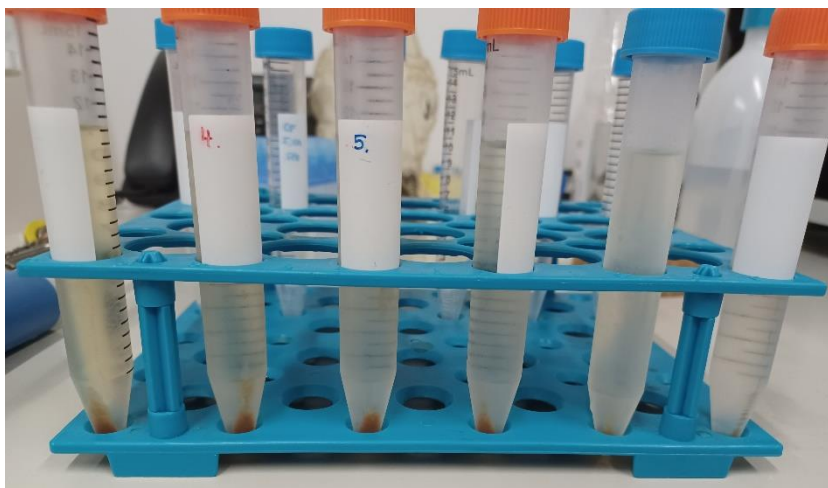
Prema tome, očekivan je najviši stupanj pročišćavanja u uzorku tretiranim sa 70 % acetonom. Međutim, rezultati analiza prikazani u **Tablici 4** ukazuju na najviši stupanj pročišćavanja i najvećim prinosom koristeći 60 % aceton. Zanimljivi su rezultati raspona od 20 do 50 % acetona koji se znatno ne razlikuju u stupnju pročišćavanja i prinosu, dok uspoređujući uzorke za koje je korišteno 50 i 60 % acetona, razlika u stupnju pročišćavanja je 1,35, a u prinosu čak 72,36 %.

Tablica 4 Rezultati pročišćavanja sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze hladnim acetonom (uvjeti ekstrakcije: jednostupanjsko, $T(\text{aceton}) = -20^{\circ}\text{C}$, $t = 24$ h, $T(\text{taloženje}) = 4^{\circ}\text{C}$, centrifugiranje pri 9000 rcf, $t = 15$ min).

| Uzorak | Stupanj pročišćavanja | Prinos (%) | Koncentracijski faktor |
|--------------|-----------------------|------------|------------------------|
| 20 % acetona | 0,05 | 0,70 | 20 |
| 30 % acetona | 0,05 | 1,15 | 20 |
| 40 % acetona | 0,04 | 1,10 | 20 |
| 50 % acetona | 0,16 | 4,24 | 20 |
| 60 % acetona | 1,51 | 76,60 | 20 |
| 70 % acetona | 1,26 | 69,93 | 20 |

Dvostupanjsko pročišćavanje u hladnom acetonu

Prvi korak ove metode je jednostupanjsko pročišćavanje hladnim acetonom ($T = -20^{\circ}\text{C}$). Zatim, u supernatant iz prvog koraka, otpipetira se hladni aceton u omjeru 1:1. Uzorci nakon provedbe metode (**Slika 19**) izgledaju identično s obzirom na faze, dok se razlikuju u prozirnosti supernatanta u usporedbi s metodom jednostupanjskog pročišćavanja acetonom.



Slika 19 Uzorci sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze podvrgnuti ekstrakciji taloženjem hladnim acetonom (uvjeti ekstrakcije: dvostupanjsko, $T(\text{aceton}) = -20^{\circ}\text{C}$, $t = 24$ h, $T(\text{taloženje}) = 4^{\circ}\text{C}$, centrifugiranje pri 9000 rcf, $t = 15$ minuta) (osobna arhiva).

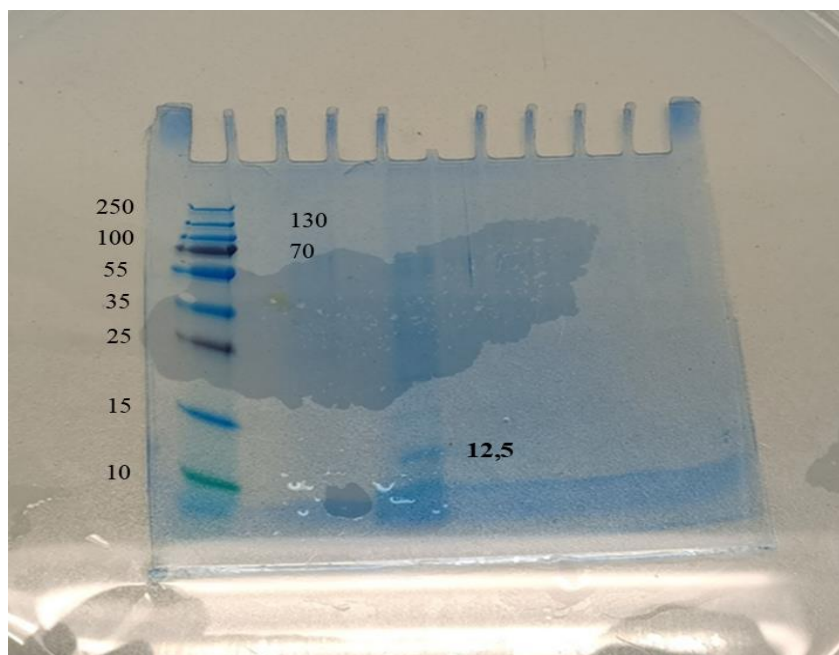
U **Tablici 5** prikazani su rezultati drugog stupnja pročišćavanja ovom metodom, te ukazuju na najveći stupanj pročišćavanja od 123,78 i prinosa od 82,36 % koristeći 50 % aceton. 20-40 % acetonom se u ovom koraku stupanj pročišćavanja i prinosa uvelike povećalo kako je i očekivano s obzirom na niske vrijednosti u prvom koraku koje upućuju na relativno malu količinu pročišćenih proteina. Suprotni je slučaj koristeći 60 i 70 % aceton, gdje se u prvom koraku metode pročisti veća količina proteina od drugog koraka uspoređujući rezultate prinosa. Prvi korak metode rezultira s 76,60 % prinosa, a drugi s 1,44 % za 60 % aceton i 69,93 % prinosa u prvom koraku za 70 % aceton, a u drugom 0,05 %.

Tablica 5 Rezultati pročišćavanja sirovog ekstrakta enzima endo-1,4- β -ksilanaze hladnim acetonom (uvjeti ekstrakcije: dvostupanjsko, $T(\text{aceton}) = -20^{\circ}\text{C}$, $t = 24 \text{ h}$, $T(\text{taloženje}) = 4^{\circ}\text{C}$, centrifugiranje pri 9000 rcf, $t = 15 \text{ min}$).

| Uzorak | Stupanj pročišćavanja | Prinos (%) | Koncentracijski faktor |
|--------------|-----------------------|------------|------------------------|
| 20 % acetona | 46,04 | 69,61 | 40 |
| 30 % acetona | 65,81 | 63,24 | 40 |
| 40 % acetona | 65,61 | 72,63 | 40 |
| 50 % acetona | 123,78 | 82,36 | 40 |
| 60 % acetona | 2,25 | 1,44 | 40 |
| 70 % acetona | 0,21 | 0,05 | 40 |

4.5. Rezultati provedbe elektroforeze: određivanje molekulske mase enzima endo-1,4- β -ksilanaze

Sirovi uzorak enzima endo-1,4- β -ksilanaze podvrgnut je metodi pročišćavanja koristeći 50 % amonijev sulfat, te dijalizi kojom su uklonjene zaostale soli u uzorku. Kako bi se dokazalo prisutstvo enzima endo-1,4- β -ksilanaze, uzorak je ispitan SDS-PAGE elektroforezom. Nakon postupka odbojavanja i dodatnog ispiranja ultra čistom vodom, dobiven je gel prikazan **Slikom 20**. Na **Slici 20** označene su molekulske mase proteinskih markera (kDa) u lijevom stupcu, dok je u desnom stupcu označena molekulska masa enzima endo-1,4- β -ksilanaze.



Slika 20 Gel nakon postupka SDS-PAGE elektroforeze za enzim endo-1,4- β -ksilanazu; molekulske mase standarda proteina (Thermo Fisher Scientific) izražene u kDa (lijevi stupac), molekulska masa enzima endo-1,4- β -ksilanaze izražena u kDa (desni stupac) (uvjeti SDS-PAGE elektroforeze: t (elektroforeza) = 40 min, T (inkubacija) = 85°C, t (inkubacija) = 10 min, U = 200 V, t (bojanje) = 1 h, t (odbojavanje) = 12 h) (osobna arhiva).

Koristeći ljestvicu „26619“ za standarde proteina (10 – 250 kDa) dostupnu na službenim stranicama proizvođača opreme (Thermo Fisher Scientific), procijenjena je molekulska masa enzima endo-1,4- β -ksilanaze od 12,5 kDa.

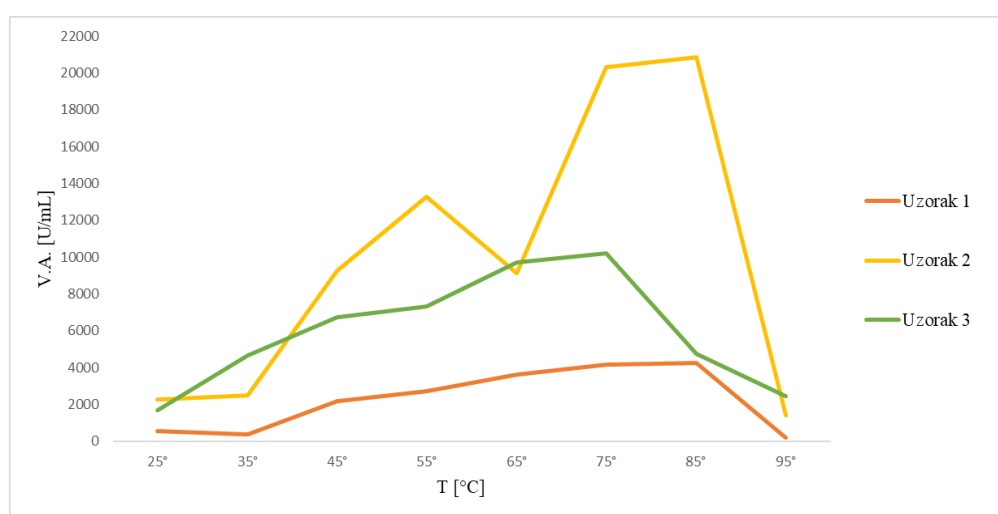
Milagres i sur. (2005) navode molekulsku masu enzima endo-1,4- β -ksilanaza porijeklom iz gljiva u rasponu od 7 do 60 kDa.

4.6. Utjecaj temperature i pH vrijednosti na aktivnost pročišćenog enzima endo-1,4- β -ksilanaza

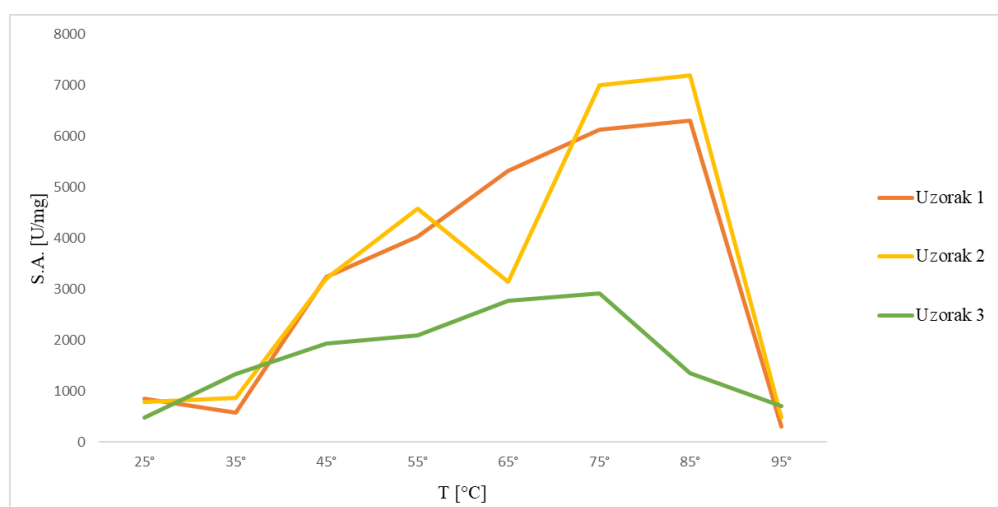
Utjecaj temperature na aktivnost pročišćenog enzima endo-1,4- β -ksilanaza

Uzorci enzima endo-1,4- β -ksilanaza pročišćeni metodama s 50 % amonijevim sulfatom i dvostupanjski, acetonom, te sirovi ekstrakt tijekom metode su podvrgnuti inkubaciji pri temperaturama u rasponu od 25 do 95°C. Ispitan je utjecaj temperature na aktivnost enzima. Rezultati su prikazani na **Slici 21 a) i b)**. Najveća V.A. i S.A. uzoraka je određena pri temperaturi od 85°C za sirovi ekstrakt (Uzorak 1) enzima (V.A. = 4265,55 U/mL, S.A. = 6310,09 U/mg) i uzorak pročišćen metodom 50 % amonijevim sulfatom (Uzorak 2) (V.A. =

20859,44 U/mL, S.A. = 7193,63 U/mg). Analizom uzorka pročišćenog dvostupanjskom metodom acetonom (Uzorak 3) uočena je najviša vrijednosti V.A. i S.A. pri 75°C (V.A. = 10210,30 U/mL, S.A. = 2915,04 U/mg). Rezultati su dosljedni činjenici da enzim endo-1,4- β -ksilanaza potječe iz termofilnog mikroorganizma, *T. lanuginosus*. Stabilnost enzima endo-1,4- β -ksilanaze (s obzirom na uvjete temperature) ovisi o vrsti mikroorganizma koji ga proizvodi. Prema tome, enzim može biti aktivan u relativno velikom temperaturnom rasponu od 50 (izvor enzima termofilni bacili) do 110°C (izvor enzima hipertermofilne bakterije). *T. lanuginosus* tipično proizvodi endo-1,4- β -ksilanazu koja je termostabilna u rasponu od 50 do 80°C (Shahi i sur., 2016).



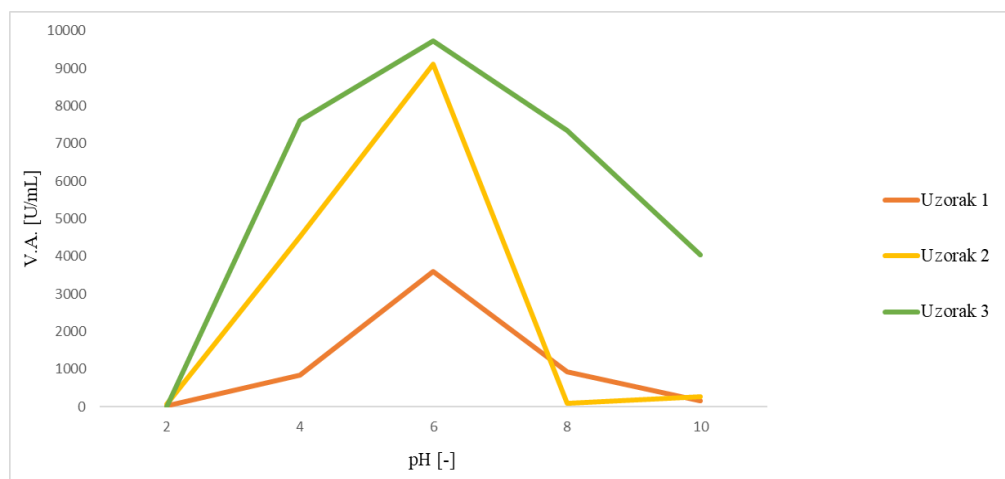
Slika 21 a) Ovisnost volumne aktivnosti enzima endo-1,4- β -ksilanaze o temperaturi; Uzorak 1 = sirovi ekstrakt, Uzorak 2 = uzorak pročišćen 50 % amonijevim sulfatom, Uzorak 3 = uzorak pročišćen acetonom (dvostupanjski).



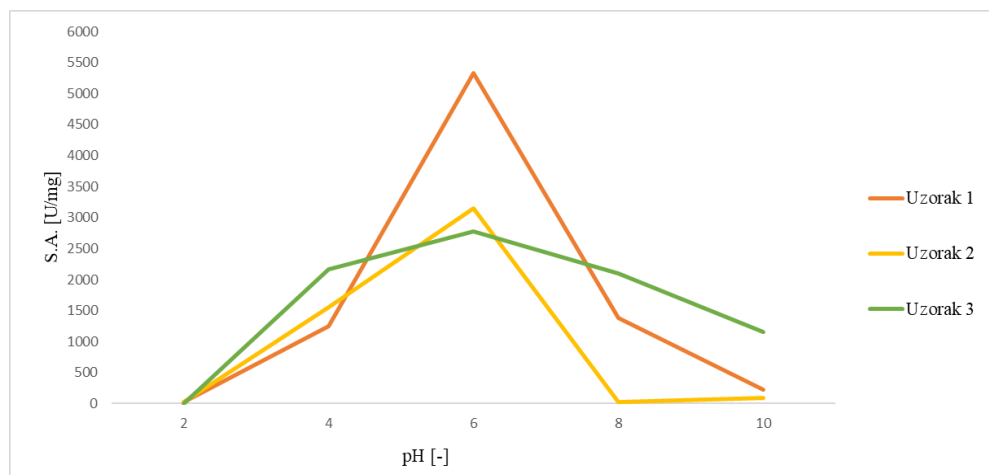
Slika 21 b) Ovisnost specifične aktivnosti enzima endo-1,4- β -ksilanaze o temperaturi; Uzorak 1 = sirovi ekstrakt, Uzorak 2 = uzorak pročišćen 50 % amonijevim sulfatom, Uzorak 3 = uzorak pročišćen acetonom (dvostupanjski).

Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost pročišćenog enzima endo-1,4- β -ksilanaza

Rezultati ovisnosti aktivnosti enzima (3 uzorka: sirovi, uzorak pročišćen 50 % amonijevim sulfatom, uzorak pročišćen acetonom (dvostupanjski)) o pH prikazani su na **Slici 22 a) i b)**. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je optimalna pH vrijednost 6 za sva tri uzorka. Ovu tvrdnju potvrđuju i literaturni podaci (Jiang i sur., 2021; Sunna i Antranikian, 1997). Promjena V.A. i S.A. sva tri uzorka slijedi isti obrazac. Pri pH 2, vrijednosti su najniže, te povećanjem pH vrijednosti do 6, V.A. i S.A. rastu. Povećanje vrijednosti pH od 6 pa nadalje, rezultira postepenim smanjenjem vrijednosti V.A. i S.A. enzima. Uzorak 1 (sirovi ekstrakt) pri pH 6 ima najnižu volumnu, a najvišu specifičnu aktivnost enzima (V.A. = 3600,32 U/mL, S.A. = 5325,99 U/mg). Obrnuto, uzorak 3 (dvostupanjska metoda acetonom) pri pH 6 ima najvišu volumnu, a najnižu specifičnu aktivnost enzima (V.A. = 9729,61 U/mL. S.A. = 2777,81 U/mg).



Slika 22 a) Ovisnost volumne aktivnosti enzima endo-1,4- β -ksilanaze o temperaturi; Uzorak 1 = sirovi ekstrakt, Uzorak 2 = uzorak pročišćen 50 % amonijevim sulfatom, Uzorak 3 = uzorak pročišćen acetonom (dvostupanjski).



Slika 22 b) Ovisnost specifične aktivnosti enzima endo-1,4- β -ksilanaze o temperaturi; Uzorak 1 = sirovi ekstrakt, Uzorak 2 = uzorak pročišćen 50 % amonijevim sulfatom, Uzorak 3 = uzorak pročišćen acetonom (dvostupanjski).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi obrade eksperimentalnih podataka doneseni su zaključci:

- tijekom fermentacije s *T. lanuginosus*, masa fermentacijske smjese se smanjila za 20,84% (s početnih 50 g na 10,41 g desetog dana fermentacije),
- u pokusima ekstrakcije enzima nakon fermentacije, ispitivanjem utjecaja vrste otapala na aktivnost enzima, pokazano je da se veća aktivnost enzima postiže nakon ekstrakcije fermentacijske smjese u puferu (V.A. = 3816,78 U/mL, S.A. = 29630,87 U/mg) nego u vodi (V.A. = 3556,13 U/mL, S.A. = 20734,87 U/mg),
- najveća specifična aktivnost enzima postignuta je nakon osmog dana fermentacije (S.A. = 29630,87 U/mg),
- pročišćavanje enzima s amonijevim sulfatom rezultira najvišom specifičnom aktivnosti (S.A. = 35432,67 U/mg), prinosom (124,67 %) i stupnjem pročišćavanja (11,06) koristeći 50 % amonijev sulfat,
- pročišćavanje enzima s amonijevim sulfatom i *t*-butanolom (1:1) rezultira najvišom specifičnom aktivnosti (S.A. = 4776,24 U/mg), prinosom (58,06 %) i stupnjem pročišćavanja (2,85) koristeći 50 % amonijev sulfat,
- pročišćavanje enzima s amonijevim sulfatom i *t*-butanolom (1:2) rezultira najvišom specifičnom aktivnosti (S.A. = 18980,27 U/mg), i stupnjem pročišćavanja (5,44) koristeći 50 % amonijev sulfat, a najviši prinos (163,81 %) s 70 % amonijevim sulfatom,
- pročišćavanje enzima s hladnim acetonom ($T = -20^{\circ}\text{C}$, jednostupanjski) rezultira najvišom specifičnom aktivnosti (S.A. = 9593,80 U/mg), prinosom (76,60 %) i stupnjem pročišćavanja (1,51) koristeći 60 % aceton,
- pročišćavanje enzima s hladnim acetonom ($T = -20^{\circ}\text{C}$, dvostupanjski) rezultira najvišom specifičnom aktivnosti (S.A. = 463035,75 U/mg), prinosom (82,36 %) i stupnjem pročišćavanja (123,78) koristeći 50 % aceton,
- usporedbom svih provedenih metoda pročišćavanja enzima, zaključeno je da se dvostupanjskom metodom s 50 % hladnim acetonom ostvaruje najviša vrijednost specifične aktivnosti enzima (S.A. = 463035,75 U/mg), prinosa (82,36 %) i stupnja pročišćavanja (123,78),
- enzim endo-1,4- β -ksilanaza ima molekulsku masu 12,5 kDa,

- analizirajući ovisnost aktivnosti enzima o temperaturi, najviše vrijednosti volumne i specifične aktivnosti svih uzoraka enzima postignute su pri temperaturi $T = 85^{\circ}\text{C}$ i $\text{pH} = 6$ (1. sirovi ekstrakt: V.A. = 4265,55 U/mL, S.A. = 6310,09 U/mg; 2. ekstrakt pročišćen 50 % amonijevim sulfatom: V.A. = 20859,44 U/mL, S.A. = 7193,63 U/mg, 3. ekstrakt pročišćen dvostupanjskom metodom hladnim acetonom: V.A. = 10210,30 U/mL, S.A. = 2915,04 U/mg),
- analizirajući ovisnost aktivnosti enzima o pH vrijednosti, najviše vrijednosti volumne i specifične aktivnosti svih uzoraka enzima postignute su pri $\text{pH} = 6$ i temperaturi $T = 65^{\circ}\text{C}$ (1. sirovi ekstrakt: V.A. = 3600,32 U/mL, S.A. = 5325,99 U/mg; 2. ekstrakt pročišćen 50 % amonijevim sulfatom :V.A. = 9118,56 U/mL, S.A. = 3144,64 U/mg; 3. ekstrakt pročišćen dvostupanjski hladnim acetonom: V.A. = 9118,56 U/mL, S.A. = 2777,81 U/mg).

6. LITERATURA

- Aehle, W. (2007) *Enzymes in Industry; Production and Applications*, 3rd edn. Njemačka: Wiley-VCH.
- Ameen, F. (2023) 'Purification and Characterization of Xylanase Produced by *Aspergillus fumigatus* Isolated from the Northern Border Region of Saudi Arabia', *Fermentation* 9(7):595.
- Andrew, S.M., Titus, J.A., Zumstein, L. (2001) 'Dialysis and Concentration of Protein Solutions' in *Current Protocols in Toxicology*. SAD: John Wiley & Sons, Inc.
- Arora, S., Rani, R., Ghosh, S. (2018) 'Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects', *Journal of Biotechnology*, 269:16-34.
- Asad, W., Asif, M., Rasool, S.A. (2001) 'Extracellular enzyme production by indigenous thermophilic bacteria: partial purification and characterization of α -amylase by *Bacillus* sp. wa21', *Pakistan Journal of Botany*, 43(2): 1045-1052.
- Bajpai, P. (2014) 'Purification of Xylanases', in *Xylanolytic Enzymes*, Nizozemska: Elsevier Inc., 53-61.
- Bajpai, P. (2016) *Background and General Introduction, Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*. Njemačka: Springer.
- Basit, A., Jiang, W., Rahim, K. (2021) 'Xylanase and Its Industrial Applications', in *Biotechnological Applications of Biomass*, Intech Open.
- Benavides, J., Rito-Palomares, M., Asenjo, J. A. (2011) 'Aqueous Two-Phase Systems', in *Comprehensive Biotechnology* 2nd edn, Nizozemska: Elsevier Inc., 697-713.
- Dennison, C. (2002) 'Principles of Electrophoresis', in *A Guide to Protein Isolation*, Kluwer Academic Publishers, 115-149.
- Ding, C., Li, M., Hu, Y. (2017) 'High-activity production of xylanase by *Pichia stipitis*: Purification, characterization, kinetic evaluation and xylooligosaccharides production', *Biomac*, volume (1:117), 72-77.
- Duong-Ly, K. C., Gabelli, S. B. (2014) 'Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation', in *Methods in Enzymology*, Nizozemska: Elsevier Inc., 86-94.
- Gupta, M. K., Biswas, P. K. (2023) 'Chromatography: Basic principle, types, and applications', in *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*, SAD: Academic Press, 173-182.
- Jensen, B., Nebelong, P., Olsen, J., Reeslev, M. (2002) 'Enzyme production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*', *Biotechnology Letters*, 24, 41-45.
- Khandeparkar, R. D. S., Bhosle, N. B. (2006) 'Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 wne grown in solid state fermentation', *Enzyme and Microbial Technology*, 4th edn, 732-742.
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K., Singhania, R. R. (2021) 'Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions', *Bioresource Technology*, 323:124566.
- Milagres, A. M. F., Magalhães, P. O., Ferraz, A. (2005) 'Purification and properties of xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*', *FEMS Microbiology Letters* 253(2), 267-272.

- Mistry, V. V., Maubois, J-L. (2004) 'Application of Membrane Separation Technology to Cheese Production', in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, SAD: Academic Press., 261-285.
- Mujtaba, M., Fraceto, L.F., Fazeli, M., Mukherjee, S., Savassa, S. M., Araujo de Medeiros, G., Pereira, A. E. S., Mancini, S. D., Lipponen, J., Vilaplana, F. (2023) 'Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics', *Journal of Cleaner Production*, 402:136815.
- Palmer, T., Bonner, P. L. (2007) 'An Introduction to enzymes', in *ENZYMES: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry*, 2nd edn, Horwood Publishing Limited, 2-13.
- Parlov Vuković, J., Tišma, M. (2024) 'The role of NMR spectroscopy in lignocellulosic biomass characterisation: A mini review', *Food Chemistry: Molecular Sciences* 9:100219.
- Petitjean, M., Lamberto, N., Zornoza, A., Isasi, J.R. (2022) 'Green synthesis and chemometric characterization of hydrophobic xanthan matrices: Interactions with phenolic compounds', *Carbohydrate Polymers*, 288:119387.
- Shahi, N., Hasan, A., Akhtar, S., Siddiqui, M.H., Sayeed, U., Khan, M.K.A. (2016) 'Xylanase: A promising enzyme', *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(3), 334-339.
- Sikdar, D., Majumder, K., Kanungo, I. (2021) 'Exploiting endo- β -1, 4-xylanase enzyme from fungal origin for green leather processing: A novel and sustainable strategy', *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 12:2.
- Singh, S., Madlala, A.M., Prior, B.A. (2003) '*Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases', *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1), 3-16.
- Sunna, A., Antranikian, G. (1997) 'Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria', *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(1), 39-67.
- Šekuljica, N., Jakovetić Tanasković, S., Mijalković, J., Simović, M., Pavlović, N., Đorđević, N., Culetu, A., Gazikalović, I., Luković, N., Bakrač, J., Knežević-Jugović, Z. (2023) 'Xylanase Production by Solid-State Fermentation for the Extraction of Xylooligosaccharides from Soybean Hulls', *International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*, 61(4), 439-450.
- Šibalić, D. (2023) *Razvoj procesa biološke obrade bučine pogače u proizvodnji bioprodukata – koncept rafinerije*, Doktorski rad. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- Tsai, C.S. (2002) 'Dynamic Biochemistry: Enzyme kinetics', in *An Introduction to Computational Biochemistry*, 7th edn, Wiley-Liss, Inc., 123-146.
- Yan, S., Xu, Y., Yu, X-W. (2021) 'Rational engineering of xylanase hyper-producing system in *Trichoderma reesei* for efficient biomass degradation', *Biotechnology for Biofuels* 14, 90.