Utjecaj ionske jakosti pufera i koncentracije β-merkaptoetanola na učinkovitost imobilizacije lipaze iz Thermomyces lanuginosus

Jelenić, Dragana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:109:137665

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

DRAGANA JELENIĆ

UTJECAJ IONSKE JAKOSTI PUFERA I KONCENTRACIJE β–MERKAPTOETANOLA NA UČINKOVITOST IMOBILIZACIJE LIPAZE IZ *THERMOMYCES LANUGINOSUS*

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Energija i okoliš
Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 28. lipnja 2016. godine.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*
Pomoć pri izradi rada: *Goran Miljić,* mag. ing. proc*., asistent*

UTJECAJ IONSKE JAKOSTI PUFERA I KONCENTRACIJE β-MERKAPTOETANOLA NA UČINKOVITOST IMOBILIZACIJE LIPAZE IZ *THERMOMYCES LANUGINOSUS*

Dragana Jelenić, 291-DI

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je imobilizirati enzim lipazu iz gljive *Thermomyces lanuginosus* na Eupergit CM u ovisnosti o vremenu (12 i 24 sata) i različitim koncentracijama fosfatnog pufera (0,01, 0,1 i 1 M). Ispitan je utjecaj blokatora slobodnih epoksi skupina na Eupergitu CM različite koncentracije (β-merkaptoetanol; 0,05, 0,1, 0,2 M). Učinkovitost imobilizacije procijenjena je na temelju koncentracije proteina i zaostale aktivnosti enzima u filtratima nakon provedene imobilizacije. Najučinkovitijom se pokazala imobilizacija provedena tijekom 24 sata u 1 M fosfatnom puferu pH 7,5 te primjenom 0,05 M β-merkaptoetanola.

Ključne riječi: lipaza iz *Thermomyces lanuginosus,* imobilizacija enzima, Eupergit CM

Rad sadrži: 22 stranica
9 slika
3 tablica
- priloga
14 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	izv. prof. dr. sc. *Ivica Strelec*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Marina Tišma*	član
4.	doc. dr. sc. *Natalija Velić*	zamjena člana

Datum obrane: 21. listopada, 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of thermodynamic and engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Course title: Energy and Environment
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on June 28, 2016.
Mentor: *Sandra Budžaki*, PhD, associate prof
Technical assistance: *Goran Miljić,* mag. ing. proc*., asistent*

IMPACT OF IONIC STRENGH OF BUFFERS AND CONCENTRACIONS OF β-MERCAPTOETHANOL ON EFFICIENCY IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *THERMOMYCES LANUGINOSUS*

Dragana Jelenić, 291-DI

Summary:
The aim of this study was to immobilize the enzyme lipase from the fungus *Thermomyces lanuginosus* to Eupergit CM as a function of time (12 and 24 hours) and different concentrations of phosphate buffer (0.01, 0.1 and 1 M). The influence of different concentrations of blocking agent (β-mercaptoethanol; 0.05, 0.1 and 0.2 M) on immobilization efficiency were investigated as well. The efficiency of immobilization was estimated based on the protein concentration and the residual enzyme activity in the filtrate after completion of the immobilization. The most effective immobilization was proved to be the one conducted during 24 h in 1 M phosphate buffer, pH 7.5 and by using 0.05 M β-mercaptoethanol.

Key words: lipase from *Thermomyces lanuginosus,* enzyme immobilization, Eupergit CM

Thesis contains:
22 pages
9 figures
3 tables
- supplements
14 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1.	*Ivica Strelec*, PhD, associate prof.	chair person
2.	*Sandra Budžaki*, PhD, associate prof	supervisor
3.	*Marina Tišma*, PhD, assistant prof.	member
4.	*Natalija Velić*, PhD, assistant prof.	stand-in

Defence date: October 21, 2016

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se mentorici *izv. prof. dr. sc. Sandri Budžaki* na neizmernoj pomoći oko pisanja ovog rada.

Također bih se zahvalila *izv. prof. dr. sc. Ivici Strelecu* na pomoći i korisnim savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala *mag. ing. proc. Goranu Miljiću* na korisnim savjetima i pomoći oko literature.

M.... hvala na razumjevanju i podršci.

Najveće hvala mojoj obitelji koja mi je omogućila ovo studiranje te pruženoj nezmjernoj potpori i razumijevanju.

Sadržaj:

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Lipaze 2
2.2. Imobilizacija enzima 4
3. EKSPERIMENTALNI DIO 7
3.1. Zadatak 7
3.2. Materijali 7
3.2.1. Aparatura i kemikalije 7
3.2.2. Priprema otopina 8
3.3. Imobilizacija lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* 9
3.3.1. Određivanje koncentracije proteina 11
3.3.2. Određivanje aktivnosti enzima lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* 12
4. REZULTATI I RASPARAVA 15
4.1. Određivanja koncentracije proteina metodom po Bradfordici 15
4.2. Određivanja aktivnosti lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* end-point testom 17
5.ZAKLJUČCI 20
6. LITERATURA 21

Popis oznaka, kratica i simbola

γ – masene koncentracija [mg/mL]

ΔA – apsorbancija

RF – faktor razrjeđenja

V (rs) – volumen reakcijske smjese [mL]

d – duljina kivete [cm]

V (e) – volumen uzorka [mL]

ε – molarni apsorpcijski koeficijent [L/mmol·cm]

U – internacionalna jedinica za mjerenje aktivnosti enzima [µmol/min]

TLL – lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*

m(u) – masa uzorka (mg)

1. UVOD

Posljednjeg desetljeća zamjećen je sve veći razvoj industrije, a time i porast potrošnje energije. Istraživanja u tom području su sve više usmjerena ka pronalaženju alternativnih vrsta goriva (Guo i sur., 2015). Biodizel je jedno od alternativnih vrsta goriva koje uspješno zamjenjuje mineralno dizelsko gorivo. No, s obzirom na sve veći razvoj svijesti o nužnosti zaštite okoliša, trenutna industrijska proizvodnja biodizela prolazi kroz faze prilagodbe postojećim trendovima u smislu pronalaženja jeftinijih sirovina za proizvodnju (Lam i sur., 2010) kao i novih ekološki prihvatljivijih tehnologija proizvodnje. Jedna od mogućnosti je primjena biokatalizatora (enzima) u proizvodnji biodizela (Fernandez-Lafuente, 2010) umjesto trenutno korištenih, kemijskih katalizatora (Aransiola i sur., 2014).

Upotreba biokatalizatora u industriji sve više dobiva na značenju i to ponajviše zbog dobrih osobina koje biokatalizatori posjeduju npr: mogućnost rada pri blagim reakcijskim uvjetima pH i temperature, manja potrošnja energije, visoka katalitička moć, visoka specifičnost i enantioselektivnost.Upotreba biokatalizatora ima i određene nedostatke, a to su prije svega relativno mala stabilnost i visoka cijena. Kako bi se povećala ekonomičnost upotrebe istih u industrijskoj proizvodnji sve se više pozornosti pridaje istraživanju i razvoju imobiliziranih enzimskih sustava (Yucel i sur., 2014) koji dovode do povećanja stabilnosti i mogućnosti ponovnog korištenja.

Zadatak ovog rada bio je provesti imobilizaciju komercijalnog enzima lipaze iz gljive *Thermomyces lanuginosus* na nosač Eupergit CM u ovisnosti o vremenu i koncentraciji fosfatnih pufera. Ujedno, zadatak je bio i istražiti utjecaj koncentracije blokatora (β-merkaptoetanola) slobodnih epoksi skupina na nosaču na aktivnost imobilizirane lipaze. Učinkovitost imobilizacije procijenjena je na temelju koncentracije proteina i zaostale aktivnosti enzima u filtratima nakon provedene imobilizacije. Eksperimentalni dio rada napravljen je u Laboratoriju za procesno inženjerstvo i Laboratoriju za biokemiju na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lipaze

Lipaze (triacilglicerolester hidrolaze EC 3.1.1.3) su enzimi s izrazito značajnim potencijalom za industrijsku primjenu. Kataliziraju reakcije hidrolize triacilglicerola na masne kiseline i glicerol, te esterifikacije i transesterifikacije. Ovi enzimi mogu biti izolirani iz bakterija, kvasaca i gljiva (Lason i Ogonowski, 2010).

Najčešće primjenjivane lipaze u raznim sintezama izolirane su iz kvasaca i plijesni (*Candida rugosa, Rhizopus oryzae, Aspergilus niger)* i gljiva (*Thermomyces lanuginosus)*. Strukturni prikaz lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* prikazan je na **slici 1**.

Lipaze mikrobnog porijekla izolirane su iz mezofilnih (optimalna aktivnost 30-50°C) i termofilnih (optimalna aktivnost 60-80°C) mikroorganizama. Mikrobiološki izolirane lipaze najviše se koriste u sintezi biodizela zbog pristupačnih cijena i postignutih rezultata tijekom provedbe sinteze.

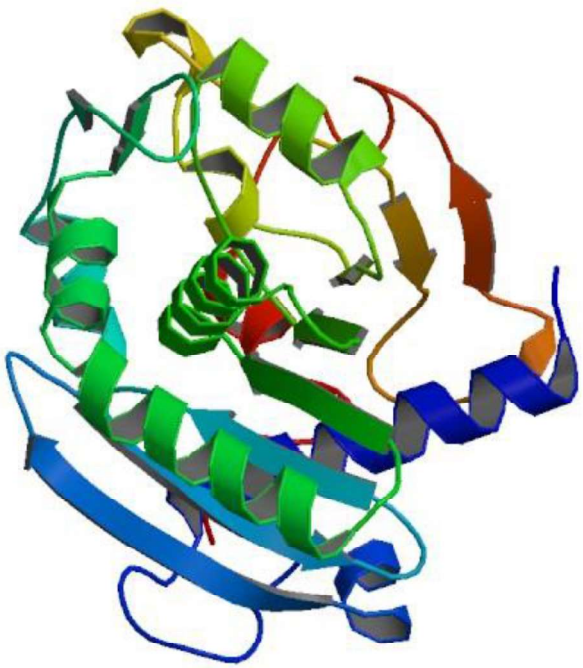
Praktična primjena lipaza zasniva se na njihovoj selektivnosti. Pravilnim izborom lipaze moguće je usmjeriti odvijanje reakcije u pravcu dobivanja visokog prinosa proizvoda.

Lipaze posjeduju nekoliko vrsta specifičnosti: pozicijska specifičnost, specifičnost prema esteru i masnim kiselinama te stehiometrijska specifičnost.

Pod specifičnošću u odnosu na ester smatra se različita brzina hidrolize, di-, tri-, i monoacil glicerola. Za sintezu estera od važnog značenja je specifičnost prema masnim kiselinama čija duljina lanca bitno utječe na brzinu reakcije. S obzirom na pozicijsku specifičnost lipaze se mogu podijeliti u dvije skupine: *sn*-1,3 specifične i nespecifične. *Sn*-1,3 lipaza hidrolizira primarnu estersku vezu u molekuli triacilglicerola dok nespecifična skupina lipaza hidrolizira primarnu i sekundarnu vezu u molekuli triglicerola. Stehiometrijska specifičnost ogleda se u činjenici da enzim djeluje samo na jedan od dva moguća stehiomerijska oblika supstrata. Ova vrsta specifičnosti karakteristična je za lipaze iz *Candida rugosa*, *Pseudomonas aeruginosa* te za pankreasnu lipazu.

Lipaze kao katalizatori primjenjuju se zbog niza prednosti: blagi reakcijski uvjeti uz manji utrošak energije i dobivanje viskokvalitetnog proizvoda s većim prinosom te su prihvatljivije za okoliš (Lucić, 2015). Opseg primjene lipaze je širok. Primjenjuju se u sintezi biodizela (kemijska industrija), za hidrolizu mliječne masti u postupku zrenja različitih vrsta sireva

(prehrambena industrija), u sintezi različitih kemikalija u farmaceutskoj industriji, za odmašćivanje kože (kožarska industrija) te kao dijagnostički alat u medicini.



Slika 1 Strukturalni prikaz lipaze izolirane iz *Thermomyces lanuginosu*

(http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1dt3 [pristupljeno: 16. 8. 2016.])

2.2. Imobilizacija enzima

Imobilizacija enzima je postupak vezivanja enzima na nosač pri čemu se ograničava sloboda kretanja molekula enzima u otopini. Enzim ne gubi svoju katalitičku sposobnost već se samo prevodi iz topljivog oblika u vodi u netopljivi. Prednosti imobilizacije su brojne, npr.: kontinuirano provođenje procesa, uklanjanje katalizatora iz reakcijske smjese je jednostavnije, ne dolazi do kontaminacije željenog produkta produktima nastalim u sporednim kemijskim reakcijama što omogućuje lakše izdvajanje željenog produkta iz reakcijske smjese, mogućnost stabilizacije kao i ponovnog korištenja kroz duže razdoblje bez značajnijeg gubitka aktivnosti imobiliziranog enzima.

Međutim, osim navedenih prednosti postupak imobilizacije ima i određene nedostatkekao što su gubitak početne aktivnost enzima zbog utjecaja površine nosača, prisustva supstrata i ostalih komponenti reakcijskog sustava te visoka cijena koštanja.

Metode i postupci imobilizacije enzima uključuju:

- imobilizaciju enzima uklapanjem u gel,
- imobilizaciju enzima inkapsuliranjem,
- imobilizaciju umrežavanjem enzima, i
- imobilizaciju enzima pričvršćivanjem na krutu podlogu (kovalentno vezivanje i apsorpcija) (Marić i Šantek, 2009).

Imoblizacija enzima uklapanjem u gel - tijekom uklapanja biokatalizatora u strukturu gela ne dolazi do stvaranja kemijske i fizikalne veze između nosača i enzima već se enzim uklapa u strukturu gela. Pore gela onemogućuju kretanje te služe kao matrica. Matricu gela potrebno je prethodno pripremiti, ista može biti pripremljena u obliku: diskova, vlakana, membrana, filmova i kuglica. Nekoliko je prednosti ove metode: brzina, jednostavnost i niska cijena. Međutim, potrebno je spomenuti da gelovi imaju niz nedostataka od kojih možemo istaknuti: „curenje“, otpor prijenosu tvari difuzijom, nestabilnost gela u organskim otapalima, prevelike dimenzije pora gela , stoga se ova metoda preporučuje više za imobilizaciju cijelih stanica nego enzima (Cao, 2000).

Imobilizacija enzima inkapsuliranjem – enzim se uklapa u membranu koja služi kao fizička barijera. Unutar membrane nalazi se tekuća jezgra u kojoj „plivaju“ molekule enzima, pri čemu je membrana građena na način da onemogućuje izlazak enzima, a omogućava cirkulaciju supstrata. Celuloza nitrat, najlon i eritrociti mogu se koristiti kao građevni materijali membrana ili kapsula. Glavni nedostatak ove metode je pucanje membrane i smanjena stabilnost enzima.

Imobilizacija umrežavanjem enzima – jedna od karakteristika ove metode je što se ne koristi nosač. Postupak se sastoji od udruživanja enzima kako bi se formirala tordimenzionalna struktura što se postiže kemijskim ili fizikalnim metodama. Kemijsku metodu karakterizira stvaranje kovalentne veze između molekula. Da bi se omogućilo takvo povezivanje potrebno je dodati određene reagense npr.: toluen-diazicijanat i glutaralaldehid. Fizikalna metoda uključuje postupak flokulacije. Kao flokulanti se koriste: poliamini i polistiren sulfonati. Imobilizacija umrežavanjem nikad se ne koristi kao samostalna metoda nego u kombinaciji s nekom drugom metodom imobilizacije.

Imobilizacija enzima kovalentnim vezivanjem – ovakvim načinom vezivanja sprječava se gubitak enzima s nosača zbog stvaranja stabilnog oblika, što se ujedno smatra prednošću same metode. Međutim kao glavni nedostatak može se navesti gubitak enzimske aktivnosti za oko 20%. Za provedbu kovalentne imobilizacije bitno je odabrati povoljan medij i vrstu nosača jer će o njegovoj kemijskoj strukturi ovisiti kvaliteta imobiliziranog enzima. Hidrofilnost nosača je njegovo najvažnije svojstvo jer enzimi trebaju minimalnu količinu vode kako bi sačuvali svoju aktivnost i aktivnu strukturu (Blažević, 2013).

Prilikom izbora nosača treba obratiti pozornost na sljedeća svojstva:

- niska cijena,
- inertnost,
- stabilnost i mehanička čvrstoća, te
- poroznost.

U izboru nosača prednost imaju porozni materijali (silikati i staklo) jer nisu podložni mikrobiološkoj kontaminaciju u odnosu na celulozne materijale, koji su zbog svojih građevnih blokova (šećeri) podložni raspadu i mikrobiološkoj infekciji.

Imobilizacija enzima apsorpcijom – ova metoda prvi put je primijenjena 1916 god. kada su znanstvenici Nillson i Griffin imobilizirali enzim invertazu na drveni ugljen. Prednosti ovakve imobilizacije su: reverzibilnost (omogućeno je pročišćavanje proteina i ponovna uporaba nosača), jednostavnost (odvijanje postupka imobilizacije pri blagim uvjetima) i visoko zadržavanje aktivnosti enzima zato što tijekom procesa ne dolazi do kemijske modifikacije. Vodeći nedostatci ovakvog načina imobilizacije su: otežana standardizacija postupka, desorpcija enzima sa nosača što uzrokuje kontaminaciju produkta enzimom (Cao, 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog rada bio je provesti imobilizaciju lipaze iz gljive *Thermomyces lanuginosus* na nosač Eupergit CM u ovisnosti o vremenu (12 i 24 sata) i koncentraciji fosfatnih pufera (0,01, 0,1 i 1 M). Ujedno je ispitan i utjecaj koncentracije blokatora (β-merkaptoetanola; 0,05, 0,1 i 0,2 M) slobodnih epoksi skupina na nosaču na aktivnost imobilizirane lipaze. Učinkovitost imobilizacije procijenjena je na temelju koncentracije proteina i zaostale aktivnosti enzima u filtratima nakon provedene imobilizacije.

3.2. Materijali

3.2.1. Aparatura i kemikalije

Tijekom eksperimentalnog dijela rada za imobilizaciju lipaze, određivanje koncentracije proteina i aktivnosti enzima korištene su slijedeće aparatura i kemikalije: orbitalna tresilica (Enviromental Shaker – Incubator, ES-20, Biosan), vodena kupelj s tresilicom (JUBALO SW 23), vodena kupelj (Memmert WNB 14), spektrofotometar (Spectronic Unicam, HelλOSγ, Njemačka), centrifuga (Tehtnica, Centric 150), pH metar (Hanna Instruments, HI 2211 pH/ORP Metarr), kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4; Alkalod Skopje), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4; Alkaloid Skopje), Tris baza (ACROS Organics, SAD), kloroform (Carlo-Erba Reagents, Španjolska), izoamilni alkohol (Kemika, Zagreb), 2-propanol (Alkaloid, Skopje), Eupergit CM (Sigma Aldich, SAD), lipaza iz *Thermomyces lanuginosus (*Sigma Aldrich, SAD), *p* - nitorfenil acetat (Acros Organics), *p* – nitrofenol (Sigma Aldrich, SAD), β – merkaptoetanol (Sigma Aldrich, SAD), Bradford reagens (BioRad, Njemačka) i arapska guma (Acros Organics).

3.2.2. Priprema otopina

Priprema otopine fosfatnog pufera – pripremljene su tri različite koncentracije otopine fosfatnog pufera prema podacima iz tablice 1. Vrijednost pH otopina fosfatnog pufera, koja je trebala iznositi 7,5, je provjerena pH metrom. Otopine su čuvane u hladnjaku na + 4 °C.

Tablica 1. Odvage K_2HPO_4 i KH_2PO_4 za pripremu 0,01, 0,1 i 1 M fosfatnog pufera

Koncentracije fosfatnog pufera, pH 7,5 (mol/dm^3)	K_2HPO_4 (g) na 100 mL	KH_2PO_4 (g) na 25 mL
0,01	0,174	0,034
0,1	1,74	0,34
1	17,4	3,4

Priprema otopine Tris-HCl otopine pufera — za pripremu 50 mM otopine Tris-HCl pufera pomiješano je 5 mL 1 M Tris baze i 80 mL destilirane vode, a pH vrijednost podešena je klorovodičnom kiselinom na pH 8 te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do 100 mL. Otopina je čuvana u hladnjaku na + 4 °C.

Priprema otopine β-merkaptoetanola – za pripremu otopine β-merkaptoetanola volumena 10 mL i 0,2, 0,1 i 0,05 M koncentracije odmjereno je 140, 70, 35 µL navedenog spoja i 9860, 9930 i 9965 µL fosfatnog pufera. Otopina je čuvana u hladnjaku na + 4 °C.

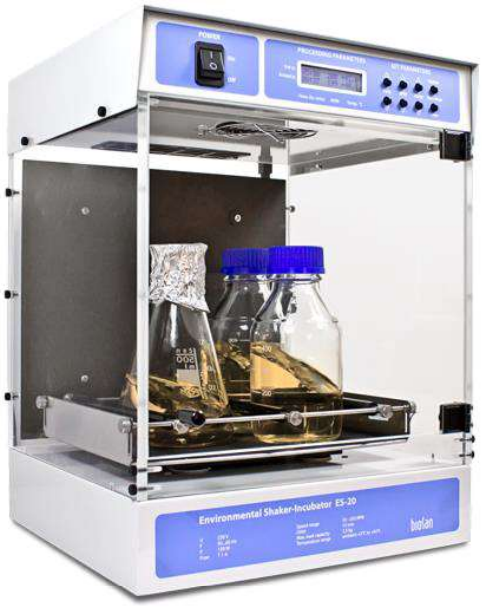
Priprema Marmur otopine – za pripremu Marmur otopine pomiješani su kloroform i izoamilni alkohol u volumnom omjeru 24 : 1. Otopina je čuvana na sobnoj temperaturi (Palacios i sur., 2013).

Priprema otopine lipaze za imobilizaciju **-** otopina lipaze za imobilizaciju pripravljena je od 1 mL početne otopine lipaze komercijano dobavljene i 2 mL otopine fosfatnog pufera

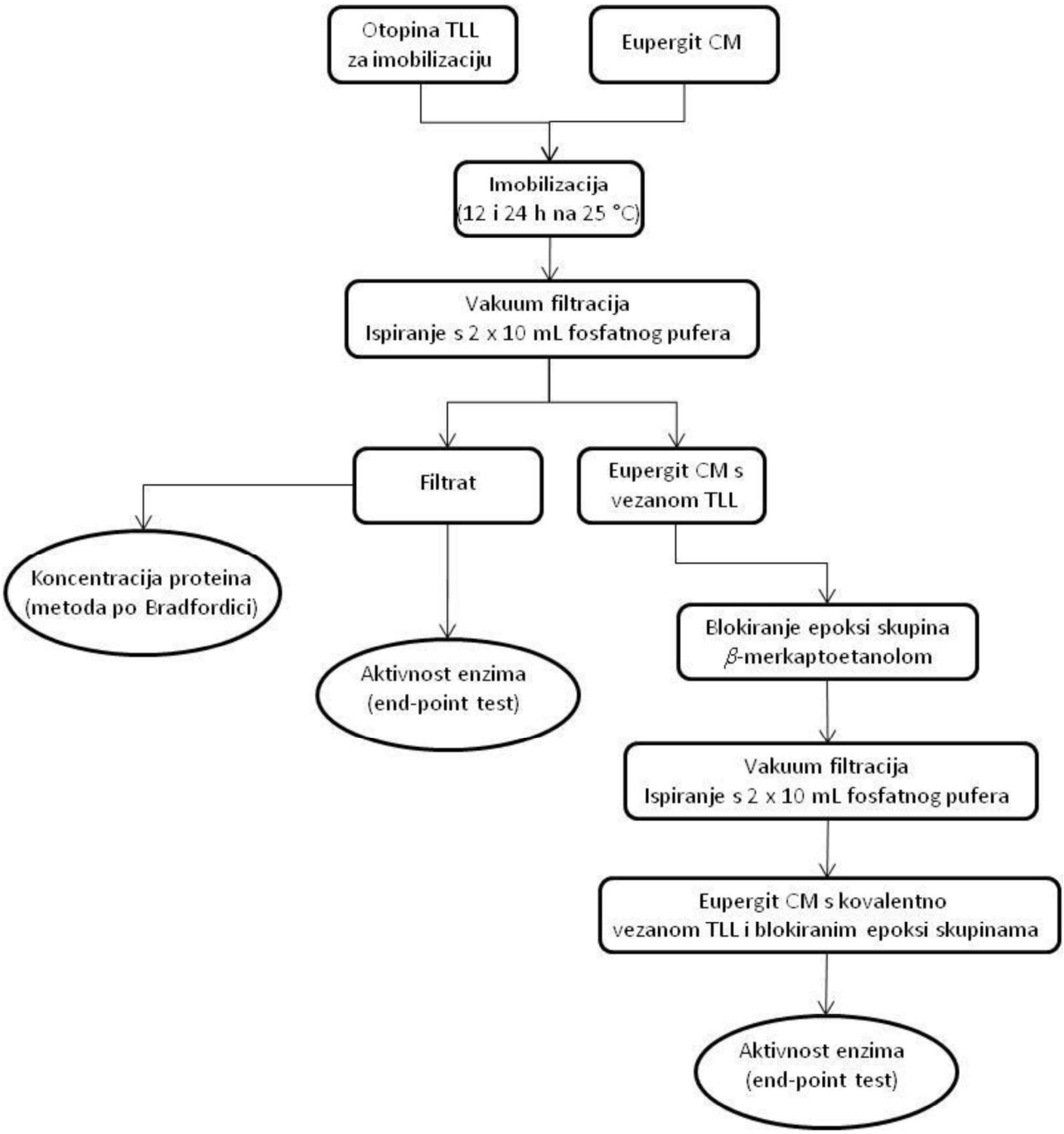
odgovarajuće koncentracije. Svježa otopina enzima pripremana je svaki put prije postavljanja imobilizacije.

3.3. Imobilizacija lipaze iz *Thermomyces lanuginosus*

Imobilizacija lipaze iz *T. lanuginosus* (TLL) na nosač Eupergit CM provedena je u fosfatnom puferu koncentracije 0,01, 0,1 i 1 M tijekom 12 i 24 sata na 25 °C uz miješanje na orbitalnoj tresilici (120 o/min) prikazanoj na **slici 2**. Postupak imobilizacije prikazan je blok dijagramom na **slici 3**.



Slika 2 Orbitalna tresilica Enviromental Shaker – Incubator ES-20, Biosan



Slika 3 Postupak provedbe imobilizacije lipaze iz *T. lanuginosus* na nosač Eupergit CM

Otopina lipaze za imobilizaciju pripremljena u fosfatnom puferu odgovarajuće koncentracije (1 mL početne otopine lipaze i 2 mL fosfatnog pufera) pomiješana je s 500 mg Eupergita CM. Smjesa je stavljena na inkubaciju u orbitalnu tresilicu na 25 °C tijekom 12 i 24 sata uz miješanje od 120 o/min u svrhu kovalentnog vezanja lipaze na nosač. Nakon završenog postupka imobilizacije smjesa je profiltrirana vakuum filtracijom pri čemu je nosač s kovalentno vezanom lipazom ispran dva puta sa po 10 mL fosfatnog pufera odgovarajuće koncentracije. U filtratu je određena koncentracija proteina i aktivnost lipaze.

Eupergit CM sa kovalentno vezanom lipazom je tretiran pomoću 0,05, 0,1 i 0,2 M β-merkaptoetanola u svrhu blokade zaostalih slobodnih epoksi skupina na koje se nije vezala lipaza tijekom procesa imobilizacije. Blokiranje slobodnih epoksi skupina na nosaču provedeno je tijekom 4 sata na + 4 °C. Nakon provedene blokade smjesa je profiltrirana vakuum filtracijom tijekom koje je Eupergit CM s kovalentno vezanom lipazom ispran s 20 mL fosfatnog pufera odgovarajuće koncentracije. Aktivnost lipaze vezane za Eupergit CM određena je *end-point* testom.

3.3.1. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u početnoj otopini lipaze i u filtratima nakon provedene imobilizacije određena je metodom po Bredfordici. Metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Briliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein: boja, koji u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri 595 nm (Strelec i Kovač, 2014). Koncentracija proteina u otopini lipaze pripremljenoj razrijeđenjem početne otopine lipaze u puferu određene koncentracije, provedena je na način da je volumenu od 25 µL pripremljenog uzorka, dodano 75 µL fosfatnog pufera i potom 2 mL Bradford reagensa. Nakon razvijanja boje na sobnoj temperaturi, po isteku 5 min, mjerena je apsorbancija uzorka na 595 nm uz slijepu probu koja se sastojala od 100 µL fosfatnog pufera odgovarajuće koncentracije i 2 mL Bradford reagensa.

Postupak mjerenja proveden je u tri paralele. Koncentracija proteina u filtratima nakon imobilizacije lipaze određena je na način da je volumenu od 100 µL filtrata dodano 2 mL Bradford reagensa te je nakon 5 minuta, apsorbancija uzorka mjerena pri 595 nm uz

slijepu probu.

Mjerenje apsorbancije je određeno na spektrofotometru Spectronic Unicam, HelλOSγ, Njemačka koji je prikazan na **slici 4**.



Slika 4 Spektrofotometar - Spectronic Unicam, HelλOSγ

3.3.2. Određivanje aktivnosti enzima lipaze iz *Thermomyces lanuginosus*

Enzimska aktivnost lipaze u početnoj otopini enzima, filtratima nakon imobilizacije, te kovalentno vezane na Eupergit CM određena je end-point testom (test fiksnog vremena) uz supstrat *p*-nitrofenil acetat (Palacios i sur., 2013). Apsorbancija supernatanta mjerena je na 410 nm. Molarni apsorpcijski koeficijent određen je mjerenjem apsorbancije otopine *p*-nitrofenola pripremljenog na isti način kao reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti ali bez dodane lipaze. Aktivnost lipaze izražena je u internacionalnim jedinicama za mjerenje aktivnosti enzima (U) pri čemu je jedna jedinica definirana kao ona količina lipaze koja razgradi 1 μmol *p*-nitrofenol acetata za 1 minutu. Postupak mjerenja proveden je u tri paralele. Sastav testa prikazan je u **tablicama 2** (početna otopina lipaze i filtrat) i **3** (Eupergit CM).

Tablica 2. Protokol i sastav reakcijske smjese za određivanje aktivnosti lipaze iz *T. Lanuginosus* u polaznoj otopini lipaze i filtratu zaostalom nakon imobilizacije

Reagensi	**Glavna proba**	**Slijepa proba**
Tris – HCl (pH 8) + 0,1 g arapske gume	3,5 mL	3,6 mL
Supstrat (*p*Np-acetat)	400 µL	400 µL
Predinkubacija	5 min na 40 °C	
Enzim/filtrat	100 µL	/
Inkubacija	5 min na + 25 °C	
Marmur otopina	1,5 mL	1,5 mL
Centrifugiranje	5000 o/min na + 25 °C	

Tablica 3. Protokol i sastav reakcijske smjese za određivanje aktivnosti lipaze iz *T. Lanuginosus* kovalentno vezane na nosač Eupergit CM

Reagensi	**Glavna proba**	**Slijepa proba**
Imob. enzim	1 mg	/
Tris – HCl (pH 8) + 0,1 g arapske gume	3,5 mL	3,6 mL
Predinkubacija	5 min na 40 °C	
Supstrat (*p*Np-acetat)	400 µL	400 µL
Inkubacija	5 min na + 25 °C	
Marmurna otopina	1,5 mL	1,5 mL
Centrifugiranje	5000 o/min na + 25 °C	

Vrijednosti aktivnosti enzima lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* u filtratu i vezane na nosaču Eupergit CM izračunate su iz slijedećih jednadžbi:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta A \cdot RF \cdot V(rs)}{V\ (e) \cdot d \cdot \text{Ɛ}} \quad (1)$$

$$\frac{U}{mg} = \frac{\Delta A \cdot RF \cdot V(rs)}{m\ (u) \cdot d \cdot \text{Ɛ}} \quad (2)$$

gdje je:

ΔA – apsorbancija

RF – faktor razrjeđenja

V(rs) – volumen reakcijske smjese [mL]

d – duljina kivete [cm]

V(e) – volumen uzorka [mL]

Ɛ – molarni apsorpcijski koeficijent [L/mmol·cm]

m (u) – masa uzorka (mg)

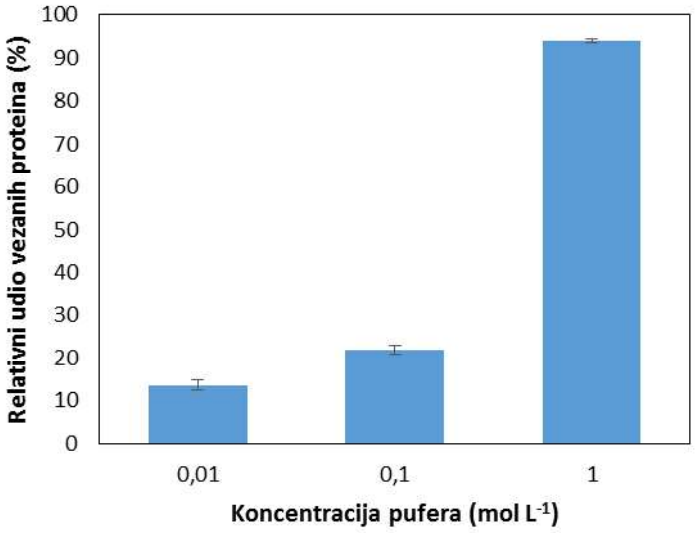
4. REZULTATI I RASPARAVA

4.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordici

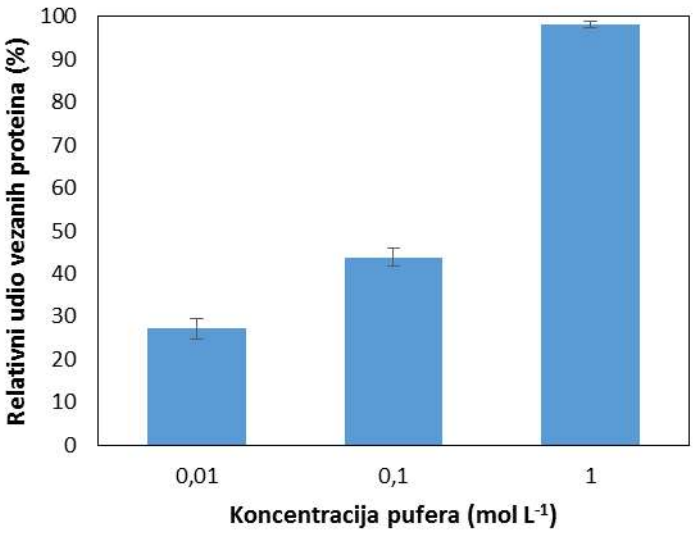
Koncentracija proteina u početnoj otopini lipaze i u filtratima nakon imobilizacije određena je metodom po Bradfordici. Koncentracija proteina u početnoj otopini lipaze iznosila je 22,27 ± 1,61 mg/mL, te je preračunata u masu koja se nalazi u 2,5 mL suspenzije lipaze dodane na 500 mg Eupergita CM, i iznosila je 18,54 ± 1,34 mg.

Masa proteina vezanog na Eupergit CM izračunata je kao razlika dodane količine proteina na početku postupka imobilizacije i količine proteina određene u filtratu zaostale nakon imobilizacije. Udio proteina vezan na nosač izražen je u % - tku kao odnos mase proteina vezane na Eupergit CM i mase proteina u polaznoj otopini za imobilizaciju.

Rezultati su prikazani na **slikama 5 i 6** kao udio vezanih proteina na nosaču Eupergit CM izražena u postotcima.



Slika 5 Udio vezanih proteina na Eupergit CM u ovisnosti o koncentraciji fosfatnog pufera nakon 12 sati imobilizacije



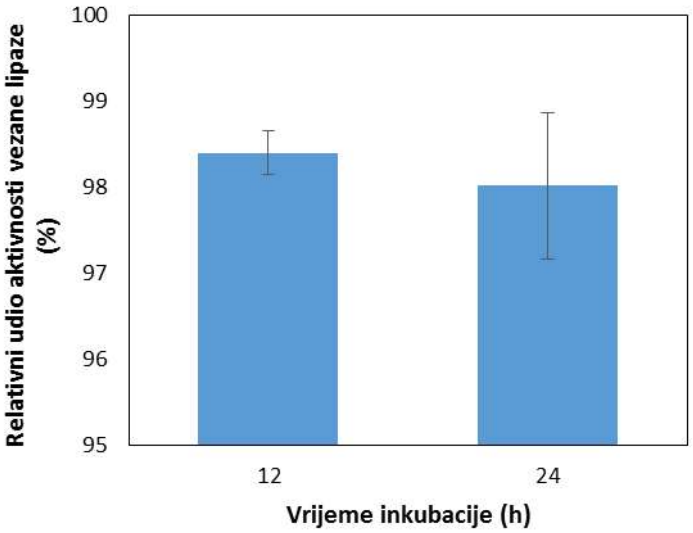
Slika 6 Udio vezanih proteina na Eupergit CM u ovisnosti o koncentraciji fosfatnog pufera nakon 24 sata imobilizacije

Iz **slika 5 i 6** vidljivo je kako je najveće vezanje proteina na Eupergit CM postignuto nakon 24 sata inkubacije u 1 M fosfatnom puferu, te je iznosilo 98,11 ± 0,72% od ukupne količine proteina koja je primjenjena za imobilizaciju. Nešto manja količina lipaze se vezala na Eupergit CM nakon 12 sati imobilizacije također primjenom 1 M fosfatnog pufera i iznosila je 94 ± 0,51% od ukupne količine proteina. Uporaba fosfatnog pufera niže koncentracije rezultirala je nižom količinom lipaze vezanom za Eupergit CM. Dobiveni rezultati ukazuju na važnost ionske jakosti fosfatnog pufera na imobilizaciju lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* na Eupergit CM.

4.2. Određivanje aktivnosti lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* end-point testom

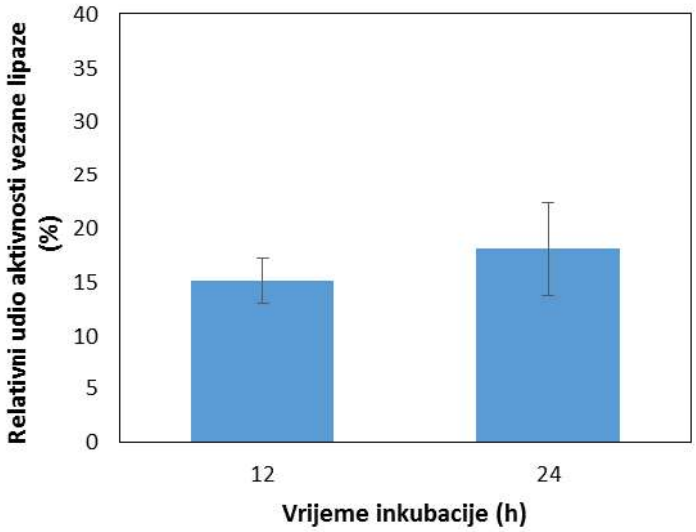
Aktivnost lipaze iz *T. lanuginosus* određena je end-point testom u polaznoj otopini, filtratima i kovalentno vezanoj na Eupergit CM. Aktivnost enzima u polaznoj otopini lipaze iznosila je 9348,42 ± 683,98 U/mL, a aktivnost lipaze u 2,5 mL primijenjene za imobilizaciju 7782,56 ± 569,4 U.

Obzirom da se najviše lipaze vezalo uz 1 M fosfatni pufer (slike 5 i 6) blokiranje slobodnih epoksi skupina na Eupergitu CM provedeno je standardnim postupkom s 0,2 M β-merkaptoetanolom. Rezultati su prikazani na **slici 7** gdje je prikazana aktivnosti kovalentno vezane lipaze iz *T. lanuginosus* na Eupergit CM na temelju razlike aktivnosti lipaze primjenjene za imobilizaciju i aktivnosti lipaze određene nakon imobilizacije na 12 i 24 sata u zaostalim filtratima.



Slika 7 Aktivnost vezane lipaze na Eupergit CM (teorijski određen) u 1 M fosfatnom puferu

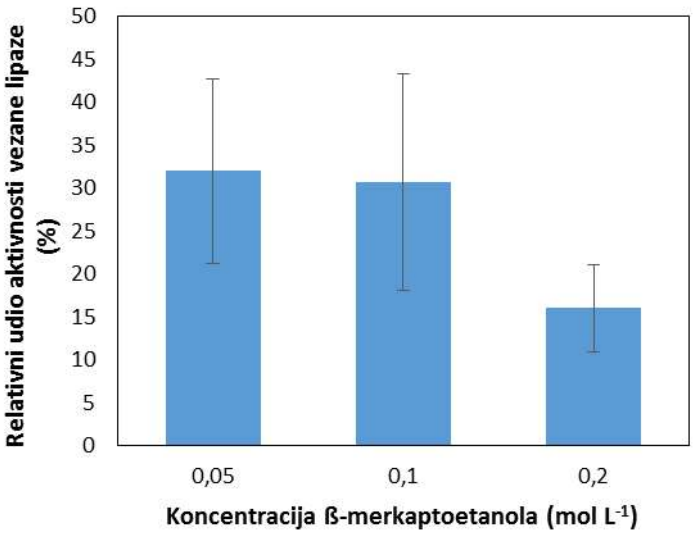
Na **slici 8** prikazana je aktivnosti kovalentno vezane lipaze iz *T. lanuginosus* na Eupergit CM eksperimentalno određen end-point testom nakon provedene imobilizacije u 1 M fosfatnom puferu i provedene blokade zaostalih slobodnih epoksi skupina na nosaču s 0,2 M β-merkaptoetanolom.



Slika 8 Aktivnost vezane lipaze na Eupergit CM (eksperimentalno određen) u 1 M fosfatnom puferu

Usporedbom **slika 7 i 8** vidljivo je kako β-merkaptoetanol značajno utječe na smanjenje aktivnosti vezane lipaze na Eupergit CM s obzirom da su eksperimentalne vrijednosti niže u odnosu na teorijski dobivene. Zbog toga je ispitan utjecaj nižih koncentracija β-merkaptoetanola na aktivnost vezane lipaze.

Primjenom β-merkaptoetanola koncentracija 0,05 i 0,1 M za blokiranje zaostalih slobodnih epoksi skupina na nosaču dobiveni su rezultati prikazani na **slici 9**.



Slika 9 Aktivnost vezane lipaze na Eupergit CM u ovisnosti koncentraciji β-merkaptoetanola (eksperimentalno određen)

Na **slici 9** jasno je uočljivo kako koncentracija β-merkaptoetanola utječe na aktivnost vezane lipaze iz *T. lanuginosus* na Eupergit CM. Veća koncentracija β merkaptoetanola smanjuje aktivnosti kovalentno vezane lipaze na Eupergit CM. Najveća aktivnost vezane lipaze očuvana je primjenom 0,05 M β-merkaptoetanola primjenjenog za blokiranje zaostalih slobodnih epoksi skupina na nosaču.

5.ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata nakon provedene imobilizacije lipaze iz gljive *Thermomyces lanuginosus* na nosač Eupergit CM u ovisnosti o vremenu (12 i 24 sata) i utjecaju različitih koncentracija fosfatnog pufera (0,01, 0,1 i 1 M) i β-merkaptoetanola (0,05, 0,1 i 0,2 M) na učinkovitost imobilizacije, doneseni su slijedeći zaključci:

1. Najviše lipaze, 98,11 ± 0,72% od početne količine proteina primjenjenog za imobilizaciju, se kovalentno vezalo za nosač Eupergit CM tijekom 24 satne imobilizacije uz 1 M fosfatni pufer pH 7,5 na 25 °C.

2. Primjena fosfatnog pufera niže koncentracije rezultirala je smanjenim kovalentnim vezanjem lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* na nosač Eupergit CM.

3. Aktivnost kovalentno vezane lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* najveća je, 31,99 ± 10,71% od početne aktivnosti lipaze koja je primjenjena za imobilizaciju, u slučaju kad se za blokadu zaostalih slobodnih epoksi skupina na nosaču Eupergit CM koristio 0,05 M β-merkaptoetanol.

4. Povećanje koncentracije β-merkaptoetanola za blokiranje zaostalih slobodnih epoksi skupina na Eupergitu CM utječe na gubitak aktivnosti kovalentno vezane lipaze iz *Thermomyces lanuginosus*.

6. LITERATURA

1. Aranisola EF, Oguma TV, Oyekola OO, Madzimbamuto TF, Ikhu-Omoregbe DIO: A review of current technology for biodisel production: State of the art. *Biomass and Bioenergy* 61: 276-297, 2014.
2. Blažević-Frindrik Z: *Bioreakcijska tehnika 1*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb, Zagreb, 2013.
3. Cao L: *Carrier-bond Immobilised Enzymes: Principels, Applications and Desing*, Wiley-VCH VERLAG GmbH & CO. KGaA, 2006.
4. Evelin A, Manoel Jose CS, dos Santos Denise MG, Freire-Nazzoly R, Fernandes-Lafuente R: Immobilization of lipase on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015.
5. Filip M, Stevanović M, Leković E: Imobilizacija amilaze na nanočestice željezovog (III) oksida. *Rektorova nagrada*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb, Zagreb, 2016.
6. Fernadez-Lafuente R: Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Use and prospects as an industrial biocatalyst. *Jurnal of Molecular Catalysis B Enzymatic* 62: 197-212, 2010.
7. Lason E, Ogonovski J: Lipase-Characterization, Applications and Mathods of Immobilization. *CHEMIK*, 64, 2: 97-10, 2010.
8. Lucić M: Sinteza biodizela pomoću imobilizirane lipaze iz *Thermomyces lanuginosus. Diplomski rad.* Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2015.
9. Lam MK, Lee KT, Mohamed AR: Homogenus, heterogenus and enzymatic catalysis for transesterification of hight free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodisel: A review. *Biotechnology Advances* 28: 500-518, 2010.
10. Marić V, Šantek B: *Biokemijsko inženjerstvo*. Tehnička knjiga, Zagreb, 2009.
11. Palacios D, Brusto MD, Ortega N: Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueos media. *LWT-Food Science and Technology* 55: 536-542, 2014.
12. Strelec I, Kovač T: *Praktikum iz biokemije*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2014.

13. Yucef Y, Demir C, Dizge N, Keskinler B: Lipase Immobilization and Their use for Biodisel Production for Vegetable Oil. *Energy Source, Part A*, 36: 1203-1211, 2014.
14. http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1dt3 [pristupljeno: 16. 8. 2016.]