

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Judith Siveri

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, siječanj 2006.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Smjer: kemijsko inženjerstvo

Judith Siveri

Optimiranje procesa proizvodnje enzima EVOP metodom

**DIPLOMSKI RAD**

Voditelj rada: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Članovi ispitnog povjerenstva: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof.

Dr. sc. Marin Hraste, red. prof.

Zagreb, siječanj 2006.

*Zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Bruni Zeliću, doc. koji mi je svojim stručnim znanjem i brojnim savjetima omogućio realizaciju ovog rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Đurđi Vasić-Rački, red. prof. na stručnoj potpori i pomoći u izradi ovog rada.*

*Velika hvala mr. sc. Ani Vrsalović Presečki i mr. sc. Zyjezdani Findrik na nesebičnom trudu i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela.*

*Najveća zahvala ide mojim roditeljima, sestri Anželiki i dečku Vedranu za svu pomoć i podršku pruženu tijekom školovanja.*

*Zahvaljujem se kolegicama Ines Šimunović i Ivani Vidalin, a posebno kolegici Ivani Roksa na nesebičnom prijateljstvu, potpori i pomoći tijekom studiranja i izrade ovog rada.*

## SAŽETAK

Enzimi pekarskog kvasca su privukli posebnu pažnju, kao potencijalni biokatalizatori, zbog njegove niske cijene, jednostavnog uzgoja i nepatogenosti. Posebno je važna nepatogenost i obnovljivost stanica pekarskog kvasca jer se u današnje vrijeme sve više pažnje poklanja zaštiti i očuvanju okoliša.

Enzim alkohol dehidrogenaza (ADH) je komponenta staničnog metabolizma koji se osim u pekarskom kvascu može pronaći i u drugim živim bićima, pa tako i u ljudskom organizmu, koji ga koristi kao osnovnu obranu od toksičnog djelovanja alkohola. Enzim ADH se koristi u analitičke svrhe za određivanje koncentracije alkohola u krvi, a važan je jer oksidira sve primarne alkohole i reducira aldehide, primjerice acetaldehid i gliceraldehid.

U ovom radu je proučavan proces razbijanja stanične stjenke pekarskog kvasca u svrhu izolacije enzima ADH. Analiziran je utjecaj parametara procesa, temperature, pH i vremena trajanja procesa razbijanja stanične stjenke u homogenizatoru, na specifičnu aktivnost enzima ADH pekarskog kvasca, kao i na ukupnu koncentraciju proteina. Primijenjena je metoda višefaktorskog planiranja pokusa, a dobiveni rezultati su statistički obrađeni upotrebom metode evolucijskih operacija (EVOP). Optimalni radni uvjeti provedbe procesa bili su temperatura 40 °C i pH 7, dok je analiza rezultata pokusa primjenom EVOP metode ukazala na zanemariv utjecaj vremena razbijanja stanične stjenke pekarskog kvasca.

Praćena je i promjena aktivnosti izoliranog enzima ADH pri različitim temperaturama 25, 30, 35 i 40 °C kako bi se odredila ovisnost kinetike deaktivacije o temperaturi.

Pri optimalnim uvjetima provedbe procesa uspoređene su dvije različite metode razbijanja stanične stjenke pekarskog kvasca, mljevenje u mlinu s kuglicama i homogenizatoru, s permeabilizacijom stanica upotrebom detergenta CTAB-a. Specifična aktivnost enzima ADH ostvarena u procesima razbijanja stanične stjenke je bila deset puta manja od one dobivene procesom permeabilizacije što ukazuje na potrebu daljnje optimizacije ovih procesa.

Ključne riječi: pekarski kvasac, enzim ADH, evolucijske operacije (EVOP)

## SUMMARY

Enzymes of baker's yeast have drawn attention as potential industrial biocatalysts while baker's yeast is inexpensive and its cells are simple to grow and have non-pathogenic properties. The last characteristic is especially important because of the increasing attention being dedicated today to the protection of the environment.

Alcohol dehydrogenase (ADH) is an enzyme which is the product of the cell metabolism of baker's yeast. In addition to baker's yeast, this enzyme can be found in other living beings, including humans, who use it as a basis for defense from the poisonous activity of alcohol. ADH enzyme is also used in analytical processes to determine the concentration of alcohol in blood. Moreover, it catalyzes oxidation of primary alcohols and reduces aldehydes, such as acetaldehyde and glyceraldehyde.

In this work isolation of ADH enzyme from baker's yeast has been studied. The influence of parameters, temperature, pH and duration of grinding process in homogenizer on the specific activity of ADH enzyme and overall protein concentration are investigated. A method of multifactor experiment planning and evolutionary operation (EVOP) was used to optimize the operating conditions of isolation of ADH enzyme from baker's yeast. Optimal conditions of experiments has been temperature 40 °C and pH 7, while analyzing results of experiments using EVOP method has shown insignificant effect of milling time.

Changes in the activity of the isolated ADH enzyme under different temperatures 25, 30, 35, 40 °C were also observed.

Two different techniques for milling under optimal conditions were compared to permeabilization with the CTAB detergent. The specific activity of ADH enzyme obtained by breaking cells was ten times smaller than the specific activity of ADH enzyme which was obtained by process of permeabilization. It is suggesting to conclusion for need to further optimization of observed processes.

Key words: enzyme ADH, baker's yeast, evolutionary operation (EVOP)

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| <b>1. UVOD</b> .....   | 1  |
| <b>2. OPĆI DIO</b> .....   | 3  |
| 2.1. KVASCI.....   | 3  |
| 2.2. PEKARSKI KVASAC ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....             | 4  |
| 2.3. PRIMJENA PEKARSKOG KVASCA U INDUSTRIJI .....                          | 4  |
| 2.3.1. Industrijska proizvodnja etanola.....                               | 5  |
| 2.3.2. Proizvodnja kvaščeve biomase.....                                   | 5  |
| 2.3.3. Pekarski kvasac kao izvor biokatalizatora.....                      | 6  |
| 2.4. ENZIMI.....   | 6  |
| 2.4.1. Enzim alkohol dehidrogenaza .....                                   | 10 |
| 2.4.2. Enzim alkohol dehidrogenaza pekarskog kvasca (ADH).....             | 11 |
| 2.4.1.1. Svojstva enzima alkohol dehidrogenaze pekarskog kvasca.....       | 13 |
| 2.5. PLANIRANJE POKUSA.....  | 14 |
| 2.5.1. Faktorski plan .....  | 14 |
| 2.5.1.1. Faktorski plan na dvije razine s dvije varijable .....            | 15 |
| 2.5.1.2. Faktorski plan na dvije razine s tri varijable .....              | 16 |
| 2.6. EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE OPTIMUMA PROCESA.....                     | 17 |
| 2.6.1. Evolucijske operacije (EVOP) .....                                  | 18 |
| 2.6.1.1. Primjena EVOP metode za optimiranje dvoparametarskog procesa .... | 18 |
| 2.6.1.2. Primjena EVOP metode za optimiranje troparametarskog procesa .... | 20 |
| 2.6.1.3. Lingvistička pravila odlučivanja .....                            | 22 |
| 2.7. IZOLACIJA ENZIMA ADH .....  | 23 |
| 2.7.1. Procesi razbijanja stanična stjenke .....                           | 23 |
| 2.7.1.1. Homogenizator .....   | 24 |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....  | 25 |
| 3.1. MATERIJALI .....  | 25 |
| 3.1.1. Kemikalije .....  | 25 |
| 3.1.2. Priprema otopina .....  | 26 |
| 3.1.3. Permeabilizacija stanica pekarskog kvasca.....                      | 26 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2. ANALITIČKE METODE .....  | 27        |
| 3.2.1. Određivanje aktivnosti enzima ADH .....                                | 27        |
| 3.3.2. Određivanje koncentracije proteina.....                                | 28        |
| 3.3. APARATURA .....  | 29        |
| 3.3.1. Centrifuga.....  | 29        |
| 3.3.2. Spektrofotometar .....   | 30        |
| 3.3.3. Homogenizator .....  | 30        |
| 3.3.4. Kuglični mlin.....   | 30        |
| <br>  |           |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>   | <b>31</b> |
| 4.1. OPTIMIRANJE PROCESA RAZBIJANJA STANIČNE STJENKE EVOP<br>METODOM .....    | 31        |
| 4.2. UTJECAJ TEMPERATURE NA AKTIVNOST ENZIMA ADH .....                        | 43        |
| 4.3. OCJENA USPJEŠNOSTI RAZBIJANJA STANIČNE STJENKE U<br>HOMOGENIZATORU ..... | 47        |
| <br>  |           |
| <b>5. ZAKLJUČAK.....</b>  | <b>49</b> |
| <br>  |           |
| <b>6. LITERATURA .....</b>  | <b>50</b> |
| <br>  |           |
| <b>7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA.....</b>                                     | <b>52</b> |
| 7.1. Simboli .....  | 52        |
| 7.1.1. Grčki simboli .....  | 52        |
| 7.2. Skraćenice .....   | 53        |
| <br>  |           |
| <b>8. PRILOZI.....</b>  | <b>54</b> |

## **ŽIVOTOPIS**

## 1. UVOD

U današnje se vrijeme sve više pažnje poklanja zaštiti čovjekovog okoliša, te se u svrhu njegovog očuvanja prelazi na "čistije tehnologije". U "čistiju tehnologiju" se ubraja i primjena enzima u industriji.

U zadnjih pedesetak godina enzimi imaju prednost nad klasičnim katalizatorima primjerice zbog toga što ubrzavaju reakcije  $10^{10}$  puta, reakcije katalizirane enzimima ne zahtijevaju primjenu visokih temperatura i tlakova te ekstremni pH, a imaju veću stereospecifičnost. Ove prednosti rezultiraju smanjenjem troškova procesa i time povećanjem konkurentnosti proizvoda. Također utječu na povećanje iskorištenja procesa, smanjenje utroška reaktanata, smanjenje emisija i otpada što je vrlo važno jer se u današnje vrijeme sve više pažnje poklanja zaštiti i očuvanju okoliša. Iako su veoma djelotvorni, enzimi nisu uvijek idealni za upotrebu jer su općenito nestabilni, te se kao takvi ne mogu koristiti na povišenim temperaturama i u otopinama organskih otapala<sup>2</sup>.

Danas je primjena enzima u kemijskoj industriji već učvrstila svoje mjesto. Najčešće se koriste u prehrambenoj industriji, farmaceutskoj industriji, u analitičke svrhe, te u mnogim drugim industrijama (tekstila, kože, detergenata i sl.). Njihova primjena uglavnom se nalazi u područjima proizvodnje organskih spojeva, lijekova, kemikalija, sredstava za čišćenje i plastičnih materijala.

Jedan od enzima koji je produkt metabolizma pekarskog kvasca je enzim alkohol dehidrogenaza (ADH) koji se koristi u analitičke svrhe za određivanje koncentracije alkohola u krvi. Važan je jer oksidira sve primarne alkohole, a isto tako može reducirati aldehide, kao npr. acetaldehid i gliceraldehid. Osim u kvascu može se pronaći i u drugim živim bićima, pa tako i u ljudskom organizmu, koji ga koristi kao osnovnu obranu od toksičnog djelovanja alkohola.

Dobivanje što točnijih podataka i potpunijih obavijesti o proučavanom kemijskom ili fizikalnom sustavu, uz minimalan broj eksperimenata i minimalne financijske troškove je i nužan preduvjet za uspješan istraživački rad. Stoga je potrebno primijeniti moderne matematičke i statističke metode pri planiranju i analizi eksperimentalnih rezultata u svim područjima i fazama rada<sup>7</sup>.



U ovom radu je pokazana primjena metode višefaktorskog planiranja pokusa i evolucijskog postupka optimizacije za procjenu optimalnih radnih uvjeta pri procesu razbijanja stanične stijenke pekarskog kvasca u svrhu izolacije enzima ADH. Praćen je utjecaj pH, temperature i vremena razbijanja stanične stijenke na volumnu i specifičnu aktivnost enzima kao i na ukupnu koncentraciju proteina. Pri optimalnim uvjetima provedbe procesa, 40 °C i pH 7, uspoređeni su rezultati dobiveni razbijanjem stanične stijenke pekarskog kvasca u homogenizatoru i u kugličnom mlinu sa staklenim kuglicama, s rezultatima dobivenim permeabilizacijom stanice upotrebom detergenta CTAB-a.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. KVASCI

Kvasci pripadaju carstvu *Fungi*, zajedno sa plijesnima i mesnatim gljivama. *Fungi* su eukarioti, a mogu biti jednostanični ili višestanični. S obzirom da nemaju klorofil, nemaju mogućnost obavljanja fotosinteze, pa do hrane dolaze adsorpcijom iz okoline.

Stanice kvasca su kuglastog ili jajolikog oblika, promjera 5-8  $\mu\text{m}$ . Razmnožavaju se najčešće nespolnim načinom, tj. pupanjem. Na roditeljskoj stanici raste pup, jezgra se dijeli i jedna odlazi u pup, koji se otkida kada dostigne veličinu osnovne stanice<sup>5,10</sup>.

Kvasci zasigurno po brojnosti čine ekonomski najznačajniju skupinu mikroorganizama. Zbog svoje klasične industrijske primjene u pekarstvu, te u fermentacijama piva i vina, *Saccharomyces cerevisiae* je najpoznatija vrsta iz roda *Saccharomyces*, tako da se često pojam kvasac i *Saccharomyces cerevisiae* upotrebljavaju kao sinonimi. Inače kvasci iz roda *Saccharomyces* su specifični po tome što se ubrajaju među malobrojne kvasce koji mogu rasti i u anaerobnim uvjetima. Drugi fermentativni kvasci kao što su oni iz rodova *Candida* i *Kluyveromyces* trebaju određenu količinu kisika za rast. Takvi kvasci zahtijevaju strogu kontrolu dobave kisika tijekom procesa, te stoga imaju manju produktivnost pri proizvodnji etanola. Nadalje kvasci iz roda *Saccharomyces* manje su osjetljivi na visoke koncentracije etanola, te se upravo zbog toga koriste za proizvodnju etanola.

U novije vrijeme tradicionalna primjena kvasaca u klasičnim biotehnološkim procesima proširena je i na područje moderne biotehnologije, kao rezultat upotrebe rekombinantne deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Naime od 1978. kada je pokazano da se kvasac može transformirati sa stranom (heterolognom) DNK, napravljen je znatan napredak na tom području. U mnogim industrijskim procesima kvasci se koriste više nego bakterije za proizvodnju mnogih heterolognih proteina, zbog činjenice da pripadaju u eukariotske organizme. To im omogućuje pravilno provođenje post-translacijskih promjena, što ima za posljedicu dobivanje proteina željene biološke aktivnosti. Nadalje, značajna prednost kvasaca u usporedbi s bakterijama je što u hranjivu podlogu mogu izlučiti u potpunosti pravilno nabrane heterologne proteine. Obzirom da kvasci izlučuju samo ograničen broj proteina, strani proteini mogu biti proizvedeni u relativno čistom obliku što ujedno procese izolacije čini manje kompleksnim<sup>2</sup>.

## 2.2. PEKARSKI KVASAC (*Saccharomyces cerevisiae*)

U elementarnom sastavu pekarskog kvasca prevladavaju ugljik (48 %), kisik (31 %), dušik (8 %) i vodik (7 %). Biomasa se također sastoji od kalija, fosfora, magnezija, kalcija, sumpora i ostalih elemenata u tragovima.

Stanice kvasca, uz to što imaju veliku ulogu u proizvodnji kruha, piva, vina i alkohola, se sve više upotrebljavaju za biotransformacije, te u proizvodnji proteina uz modificiranje stanica genetičkim inženjeringom.

Iako se kvasac upotrebljava za proizvodnju alkoholnih pića još od davnih vremena, biokemijski putovi pri proizvodnji etanola i sama uloga kisika u njima još uvijek nije sasvim objašnjena. Kisik je sigurno potreban za biosintezu sterola i zasićenih masnih kiselina i vrlo vjerojatno nikotinske kiseline, te se bez njegovog korištenja ove tvari moraju dodavati u hranjivu podlogu. Kod procesa proizvodnje pekarskog kvasca mora se težiti optimiranju iskorištenja na kvaščevoj biomasi, dok se kod procesa proizvodnje alkoholnih pića zahtijeva broja stanica kvasca, a sam proces je usmjeren na povećanje akumulacije metabolita, posebno etanola. Za proizvodnju kvasca u velikim količinama, potrebno je dodavati supstrat postupno, da se ograniči količina proizvedenog etanola. Iako stanice naknadno mogu rasti na etanolu kada se potroši glukoza, puno je učinkovitije postići veliku gustoću stanica izbjegavanjem proizvodnje etanola<sup>2</sup>.

## 2.3. PRIMJENA PEKARSKOG KVASCA U INDUSTRIJI

Kvasci se upotrebljavaju u mnogim industrijskim procesima, kao što su proizvodnja alkoholnih pića, biomase (pekarski i krmni kvasac) i različitih metaboličkih produkata. Posljednja grupa uključuje enzime, vitamine, kapsularne polisaharide, karotene, polihidrilne alkohole, lipide, glikolipide, limunsku kiselinu, etanol, ugljični dioksid i produkte dobivene primjenom rekombinantne DNK<sup>2,16</sup>. Većina kvasaca upotrebljivanih u nekim od gore navedenih procesa dobiveni su kao prirodni izolati koji su upotrebom tehnika genetičkog inženjerstva dalje mijenjani i selekcionirani u svrhu postizanja boljih karakteristika, odnosno uklanjanja nepoželjnih svojstava. Malo je informacija dostupno o prirodnim nalazištima takvih kvasaca, te o vektorima odgovornim za njihovo raspoređivanje u prirodi<sup>2</sup>.

### 2.3.1. Industrijska proizvodnja etanola

Etanol se danas proizvodi kemijski iz petrokemikalija i uzgojem pekarskog kvasca. Visoka cijena i ograničene rezerve nafte povećavaju mikrobnu proizvodnju etanola u mnogim zemljama, osobito onima koje nemaju nafte, a raspolažu obnovljivim izvorima sirovina kao što su šećerne, škrobne i celulozne poljoprivredne kulture.

Mikrobiološka proizvodnja etanola provodi se s pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u šaržnim reaktorima, jer je proces relativno jednostavan za vođenje i nema strogih zahtjeva za sterilnošću. Etanol proizveden uzgojem pekarskog kvasca u industrijskom mjerilu upotrebljava se uglavnom za proizvodnju alkoholnih pića i octa, te kao gorivo u nekim zemljama<sup>2</sup>.

### 2.3.2. Proizvodnja kvašćeve biomase

U mnogim zemljama način prehrane ljudi ukazivao je na slabo izbalansiranu i često proteinima nedostatnu prehranu. Upravo je taj problem uvjetovao veliki interes širom svijeta za pronalaženje izvora visoko kvalitetnih proteina. Mikrobna biomasa predstavlja potencijalno bogat proteinski izvor, a u usporedbi sa životinjskim stanicama mikroorganizmi imaju prednost zahvaljujući mnogo bržem rastu i manjim hranidbenim zahtjevima jer se mogu uzgajati na otpadnim tvarima, te na jednostavnim organskim spojevima uz dodatak anorganskih izvora dušika, fosfora i sumpora. Daljnja prednost mikroorganizama je u mnogo većem iskorištenju proteina po jedinici supstrata.

Stoga se pekarski kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, upotrebljava kao proteinska komponenta u ljudskoj prehrani. Proizvodnja tog kvasca isključivo za potrebe pekarske industrije započinje sredinom XIX stoljeća. Kako se proizvedena biomasa prvenstveno upotrebljava za dizanje tijesta stvaranjem ugljičnog dioksida, potrebno je istaknuti da pri njenoj proizvodnji nije dovoljno osigurati samo visoko iskorištenje na biomasi. Naime, potrebno je da ta biomasa na kraju procesa ima niz drugih karakteristika kao što su visoki fermentacijski kapacitet, dobru stabilnost, te mogućnost preživljavanja tijekom skladištenja<sup>2</sup>.

### 2.3.3. Pekarski kvasac kao izvor biokatalizatora

Biotransformacije se u zadnjim desetljećima sve više upotrebljavaju za proizvodnju kemikalija. Mogu se provoditi na dva načina i to upotrebom enzima u cijelim stanicama kao biokatalizatora ili sa izoliranim i pročišćenim enzimima. Prednost prvog načina je izbjegavanje relativno skupog procesa izolacije enzima, dok se upotrebom pročišćenog enzima dobiva produkt visoke čistoće sa vrlo malim brojem sporednih produkata.

Pekarski kvasac kao izvor biokatalizatora ima brojne prednosti pred ostalim mikroorganizmima. Naime on je otporan mikroorganizam<sup>2</sup> koji se stoga može koristiti u industriji. Raste na definiranom, jednostavnom mediju, te nema potreba za nekim posebnim hranjivim tvarima. Vrlo je otporan prema promjeni uvjeta u okolišu zbog širokog raspona fizikalnih i kemijskih parametara pri kojima može rasti. Obzirom da je genetički vrlo stabilan, može se koristiti za kultivacije tijekom dužeg razdoblja<sup>2</sup>. Velika prednost pekarskog kvasca je ta što se smatra sigurnim odnosno nepatogenim mikroorganizmom za proizvodnju hrane i lijekova.

Cijele stanice pekarskog kvasca pokazuju nisku aktivnost. Zato se koriste različiti postupci kako bi se permeabilizirala stanična stjenka, te time smanjio otpor prijenosu tvari za reaktant i produkt i povećala aktivnost enzima u stanicama<sup>16</sup>.

## 2.4. ENZIMI

Enzimi su proteini (prirodni polipeptidni lanci nastali spajanjem velikog broja aminokiselina preko amidnih (peptidnih) veza) velike molekularne mase koji kataliziraju reakcije unutar žive stanice. Enzimi nastaju unutar živih stanica i kataliziraju kemijske reakcije u živom organizmu pa se zbog toga nazivaju biokatalizatori.

Naziv *enzyme* prvi je upotrijebio Fridrich Wilhelm Kuehne (1878. godine), a potječe od grčke riječi *en zyme* koja znači u kvascu. Prva uporaba enzima za ljudske potrebe datira još od vremena prije starog Egipta (uporaba kvasca u proizvodnji kruha). Detaljnija proučavanja enzima počinju u XIX. stoljeću, a prvi enzim u čistom stanju uspio je dobiti Sumner<sup>10</sup>. On je dobio ureazu u kristalnom obliku izvan žive stanice, te dokazao da je riječ o čistom proteinu. 1969. godine prvi put se i uspjelo sintetizirati jedan enzim (ribonukleazu).

Danas postoji čitav niz izoliranih enzima tako da je 1989. izoliran 2461 enzim dok je 1947. bilo tek 200 enzima.

U zadnjih pedesetak godina enzimi imaju prednost nad klasičnim katalizatorima primjerice zbog toga što ubrzavaju reakcije  $10^{10}$ , reakcije katalizirane enzimima ne zahtijevaju primjenu visokih temperatura, tlakova te ekstremni pH. Većina enzimatskih reakcija se provodi u vodenom mediju. Usprkos ovim prednostima, udio enzima kao katalizatora koji se koriste u industriji je tek oko 15 %. Glavni uzroci tome su visoka cijena izolacije enzima, reakcije katalizirane enzimima su često inhibirane supstratom ili produktom pa se ne može ostvariti ekonomska opravdanost proizvodnje, enzimi su najčešće vrlo nestabilni u otopljenom obliku kada su najaktivniji, pa se moraju često imobilizirati (nanositi) na kruti nosač, što izaziva daljnja poskupljenja. Nekada enzimi mogu biti i toksični (izazivaju razne alergijske reakcije), a nekada se tijekom izolacije koriste kemikalije koje izazivaju alergijske reakcije.

Djelovanje enzima započinje tvorbom kompleksa sa supstratom (tvar koja sudjeluje u reakciji koju enzimi kataliziraju) koji ima manju energiju aktivacije nego aktivirani intermedijer supstrata bez enzima. U tom je kompleksu enzim vezan uz supstrat Van der Waalsovim i elektrostatskim privlačenjem, vodikovom vezom ili rjeđe, kovalentnom vezom, što omogućava lagano razdvajanje po završetku reakcije. Kompleksiranje mora biti brzo i reverzibilno, tako da se produkt odvaja od enzima odmah nakon reakcije i oslobađa enzim za daljnje katalitičko djelovanje. Enzimi su vrlo selektivni katalizatori, a ta selektivnost proizlazi iz odnosa enzim-supstrat, koji se opisuje mehanizmom ključ-brava. Aktivnost enzima se mijenja ovisno o uvjetima u njegovom okolišu, od kojih su najvažniji koncentracija supstrata, pH i temperatura. Pri ekstremnim vrijednostima pH i temperature, te utjecaju drugih čimbenika dolazi do denaturacije proteina i gubitka njegove aktivnosti<sup>5</sup>.

Osnovne značajke biokatalizatora su:

- aktivnost (zbog složene strukture),
- visoka selektivnost i enantioselektivnost,
- stereospecifičnost,
- obnovljivost izvora,
- djeluju u blagim reakcijskim uvjetima<sup>13</sup>.

Iako su veoma djelotvorni, nisu uvijek idealni za upotrebu jer su općenito nestabilni, te se kao takvi ne mogu koristiti na povišenim temperaturama i u otopinama organskih otapala<sup>12</sup>. Da bi bili primjenjivi u industriji, moraju po svojstvima biti superiorni klasičnim kemijskim katalizatorima. To znači da moraju imati visoku aktivnost i stabilnost, te da mora postojati mogućnost njihove višekratne uporabe jer im je cijena previsoka, te u suprotnom nisu isplativi.

Razlikujemo unutarstanične i vanstanične enzime. Unutarstanični enzimi se nalaze unutar stanice, vezani za staničnu stjenku ili u citoplazmi. Vrlo su nestabilni, a da bi ih ekstrahirali iz stanice, potrebno je razbiti staničnu stjenku, odnosno permeabilizirati ju primjenom mehaničkih, kemijskih ili mikrobioloških metoda. Zbog prethodno navedenih razloga, unutarstanični su enzimi skuplji od vanstaničnih. Broj vanstaničnih enzima je daleko manji, ali su oni stabilniji. Oni su metaboliti stanica, pa ih one izbacuju nakon sinteze, te stoga nisu potrebni procesi razbijanja stanične stjenke<sup>2</sup>.

Enzimi se mogu, osim u pročišćenom obliku, upotrijebiti i u cijelim stanicama, bilo živim ili neživim. Vrlo često se enzimi upotrebljavaju u imobiliziranom obliku. Imobilizirani enzimi se mogu višekratno upotrebljavati u procesu, stabilniji su u reakcijskoj smjesi, lakše se izdvajaju iz reakcijske smjese, te omogućuju kontinuiranu provedbu procesa<sup>1</sup>.

Imobilizacija je postupak pretvorbe homogenog enzima u heterogeni (heterogeni biokatalizatori). Prvobitno su imobilizirani čisti enzimi, te oni čine prvu generaciju heterogenih biokatalizatora. Drugu generaciju čine imobilizirane cijele stanice. Sam postupak imobilizacije se sastoji u fizičkoj lokalizaciji enzima na nekom nosiocu. Još uvijek ne postoji univerzalni nosilac, niti univerzalne metode imobilizacije. Najvažnije je koristiti metode koje će dati dugotrajno aktivan enzim na jeftinom nosiocu. U imobiliziranom obliku se uglavnom koriste samo skupi enzimi, jer se imobilizacijom omogućuje učinkovito odvajanje produkta, recikliranje i ponovna uporaba skupog enzima.

Prednosti enzima pred klasičnim katalizatorima su:

- ne zahtijevaju primjenu ekstremnih reakcijskih uvjeta (pH, temperatura, tlak),
- djeluju pri niskim koncentracijama,
- izvori enzima su obnovljivi,
- biorazgradljivi su,

provode kompleksne reakcije u jednom stupnju.

Uz navedene prednosti, enzimi imaju i sljedeće nedostatke:

- visoka cijena izolacije i pročišćavanja,
- lako podliježu inhibiciji supstratom i/ili produktom,
- deaktivacija uslijed promjene reakcijskih uvjeta,
- nestabilnost izvan prirodnog okruženja (u otopljenom obliku).

Iz prethodnog proizlazi da su biokatalizatori veoma važni katalizatori jer omogućuju provedbu reakcija koje bi standardnim kemijskim postupcima bilo vrlo teško ili pak nemoguće provesti<sup>2</sup>.

Enzimi se najčešće koriste u prehrambenoj industriji, farmaceutskoj industriji, u analitičke svrhe, te u mnogim drugim industrijama (tekstila, kože, detergenata i sl.)

Prema *International Union of Biochemistry* enzimi se mogu podijeliti prema tipu reakcije koje kataliziraju u šest osnovnih skupina [Loughlin, 2000]<sup>17</sup>:

- oksidoreduktaze,
- transferaze,
- hidrolaze,
- liaze,
- izomeraze,
- ligaze.

Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije u bioprocima. Katalitičko djelovanje ovih enzima ovisi o niskomolekularnoj komponenti koja je nazvana koenzim. Najvažniji oksido-reduktivni koenzim je nikotinamid-adenin-dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) koji primanjem hidrida prelazi u NADH.  $\text{NAD}^+$  je oksidacijsko sredstvo jer dehidrogenira supstrat. Supstrat tek tada može stupiti u kompleks sa enzimom koji zatim prelazi u produkt oslobađajući enzim za novu molekulu supstrata.

Transferaze su enzimi koji kataliziraju reakcije u kojima dolazi do premještanja različitih grupa sa jedne molekule na drugu (npr. aldehidne, ketonske grupe).

Hidrolaze kataliziraju reakcije u kojima dolazi do hidrolize. Na primjer, u grupu hidrolaza pripada enzim lipaza koji hidrolizira masti i ulja stvarajući masne kiseline.

Liaze kataliziraju reakcije u kojima se supstrat raspada na dvije komponente i reakcije eliminacije uz stvaranje dvostruke veze ili adicije na dvostruku vezu.

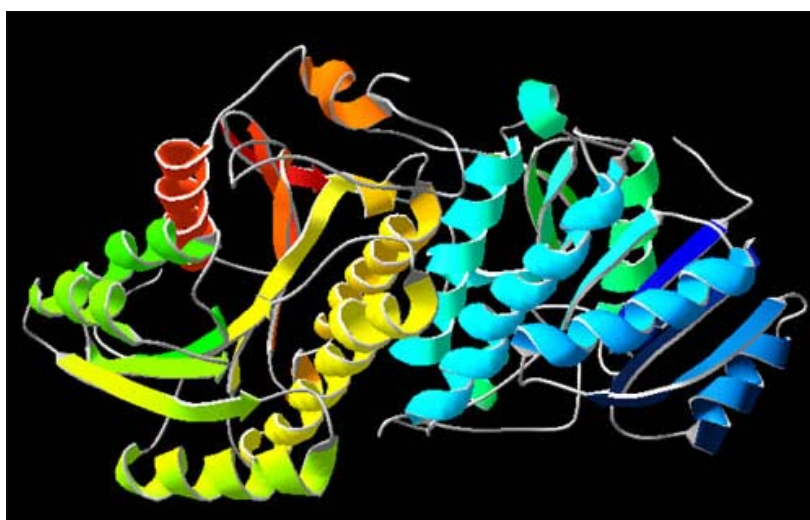


Izomeraze su enzimi koji kataliziraju pregradnju unutar molekula pri čemu se uspostavlja ravnoteža između izomera. Izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije kao što su migracija C=C veze, cis-trans izomerizacija i racemizacija.

Ligaze kataliziraju reakcije u kojima dolazi do nastajanja novih spojeva uz pomoć energije neke treće komponente koja se oslobađa raspadom te komponente (najčešće adenzintrifosfat koji se raspada na adenzindifosfat i fosfat ili adenzinmonofosfat i difosfat). Ovi enzimi kataliziraju stvaranje C-O, C-N i C-C veze.

#### 2.4.1. Enzim alkohol dehidrogenaza (ADH)

Enzim alkohol dehidrogenaza spada u skupinu oksidoreduktaza (Slika 2.1.). Prvi puta je izoliran 1937. iz pekarskog kvasca, odakle se i najčešće dobiva<sup>3</sup>. Osim u kvascu može se pronaći i u drugim živim bićima, pa tako i u ljudskom organizmu, koji ga koristi kao osnovnu obranu od toksičnog djelovanja alkohola. Visoka koncentracija tog enzima u jetri i želudcu pretvara alkohol u acetaldehid koji dalje prelazi u acetat i druge molekule koje stanice mogu koristiti i nisu toksične za organizam. Tako se potencijalno štetne molekule uz pomoć alkohol dehidrogenaze pretvaraju u hranu. Osim alkohola supstrati mogu biti steroidi i masne kiseline.



Slika 2.1. Enzima alkohol dehidrogenaza (ADH).

Enzim ADH koristi se u analitičke svrhe za određivanje koncentracije alkohola u krvi i voćnim sokovima te za dobivanje heksanal iz heksanola koji se koristi kao dodatak hrani (Slika 2.2. i 2.3.).



**Slika 2.2.** Industrijska proizvodnja heksanala.

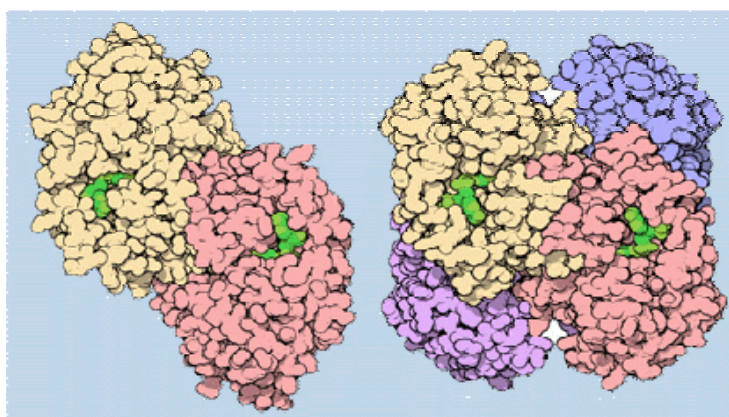


**Slika 2.3.** Industrijska proizvodnja heksanala.

#### **2.4.2. Enzim alkohol dehidrogenaza pekarskog kvasca (ADH)**

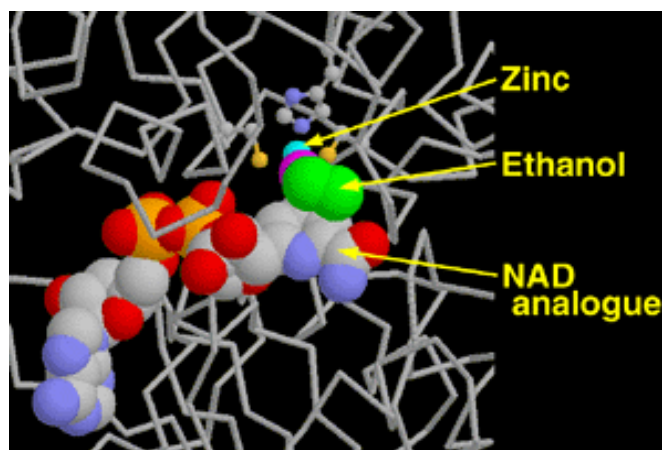
Enzim alkohol dehidrogenaza je jedan od prvih izoliranih i pročišćenih enzima. Postoji više metoda njegove izolacije. Obično se provode tako da se nakon razbijanja stanične stjenke, ona ukloni, te se dobije bezstanični ekstrakt s unutarstaničnim produktima. Stanica se može razbiti upotrebom mlina ili ultrazvučnih igala, dok se enzim iz ekstrakta izolira upotrebom različitih separacijskih tehnika kao što su ionska izmjena, ultrafiltracija i gel filtracijska kromatografija.

Izoliran enzim ima molekularnu masu 140 000 i sadrži najviše 20 % od ukupne mase reaktivne komponente<sup>2</sup>. Enzim ADH ima kvarternu strukturu, stabiliziranu ionima cinka te time spada u skupinu metalo-enzima. Postoje dvije teorije koje objašnjavaju strukturu enzima ADH. Prema prvoj teoriji kvarternu strukturu enzima izgrađuju četiri identična polipeptidna lanca molekularne mase 35 000 (ukupno 140 000), dok je po drugoj teoriji molekula ADH asimetrična zbog dva para neidentičnih polipeptidnih lanaca, što se pripisuje postojanju dva izoenzima (Slika 2.4.).



**Slika 2.4.** Struktura enzima ADH.

Svaka molekula enzima ADH sadrži četiri iona  $Zn^{+}$  koji su vrlo bitno za katalitičku aktivnost enzima ADH (Slika 2.5.). Enzim ADH spada u skupinu tiolenzima jer u svom aktivnom centru sadrži tiolne -SH grupe (20 do 36 slobodnih -SH grupa) od kojih su četiri jednako katalitički aktivne, mada u reakcijama sudjeluju samo dvije -SH grupe.



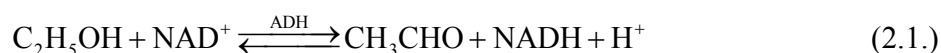
**Slika 2.5.** Struktura enzima ADH.

U zadnje vrijeme otkriven je i treći izoenzim ADH pa je, dakle, enzim ADH smjese tri genetski različita izoenzima (označavaju se kao izoenzimi I, II, III) koji ga čine heterogenim. Izoenzim I je konstitutivni enzim odgovoran za nastajanje etanola tijekom reduktivnog metaboličkog puta glukoze, a izoenzimi II, III za razgradnju etanola, preko acetaldehida u octenu kiselinu. Izoenzimi I, II, III nastaju u kvascu ovisno o uvjetima u kojima se provodi njegov uzgoj. Izoenzim I nastaje u anaerobnim uvjetima (pri manjku kisika), a druga dva kada se etanol koristi kao supstrat.

#### 2.4.2.1. Svojstva enzima alkohol dehidrogenaze pekarskog kvasca

Enzim ADH oksidira sve primarne alkohole, ali isto tako može reducirati aldehide, kao npr. acetaldehid i gliceraldehid. Aktivnost mu opada kako raste duljina lanca, a karakteristično je da je enzim ADH prvi enzim koji se koristio da se pokaže kako je prijelaz vodika kataliziran sa dehidrogenazama, stereospecifičan, te bez utjecaja otapala.

Dakle, enzim alkohol dehidrogenaza katalizira reakciju dehidrogenacije etanola u acetaldehid prema reakciji:



U ovoj reakciji se alkohol oksidira do acetaldehida s koenzimom  $\beta$ -nikotinadeninukleotidom ( $\text{NAD}^+$ ) o kojem ovisi katalitičko djelovanje enzima alkohol

dehidrogenaze. Ravnoteža ove reakcije je pomaknuta u lijevo pa se na desno pomiče dodavanjem  $\text{NAD}^+$ -a u suvišku, povećanjem pH i uklanjanjem aldehida sa semikarbazidom.

Količina NADH nastalog u reakciji, ekvivalentna je izreagiranoj količini etanola i mjerljiva je veličina koja se određuje na osnovu količine svjetlosti koju ona apsorbira pri valnoj duljini od 340 nm.

Ukupna reakcija dehidrogenacije supstrata se odvija u dva stupnja:



Optimalna temperatura reakcije dehidriranja etanola je između 25 i 30 °C.

## 2.5. PLANIRANJE POKUSA

Glavni cilj planiranja pokusa svodi se na dobivanje maksimalne točnosti uz minimalne troškove, odnosno smanjivanje broja provedenih mjerenja. Skup svih rezultata dobivenih mjerenjem čini jednu plohu, koja se naziva odzivna ploha ili površina, pri čemu svaka točka na plohi predstavlja vrijednost izlazne veličine, odnosno odziva. Za poznavanje nekog procesa potrebno je poznavati njegovu odzivnu plohu kao i ulazne veličine čiji je utjecaj na izlazne veličine značajan. Da se mjerenjem ne određuje cijela ploha, odnosno da se ne radi beskonačno mnogo mjerenja, područje u kojem se dobiva maksimalan odziv procesa može se odrediti primjenom metoda planiranja pokusa<sup>7</sup>.

Dvije su metode koje se upotrebljavaju u tu svrhu: klasično i statističko planiranje pokusa.

### 2.5.1. Faktorski plan

Najpotpunije obavjesti o proučavanom sustavu, učinak faktora i stupanj interakcije dobiju se primjenom faktorskog planiranja pokusa.

Faktorski plan je metoda što služi pri planiranju pokusa. Svakom faktoru se može pridjeliti nekoliko vrijednosti najčešće (na temelju iskustva). Broj vrijednosti koje pridodjeljujemo faktoru određuje razinu pokusa:

$$S = p^n \quad (2.2.)$$

gdje je:

$S$  - broj pokusa;

$p$  - broj razine faktora;

$n$  - broj faktora.

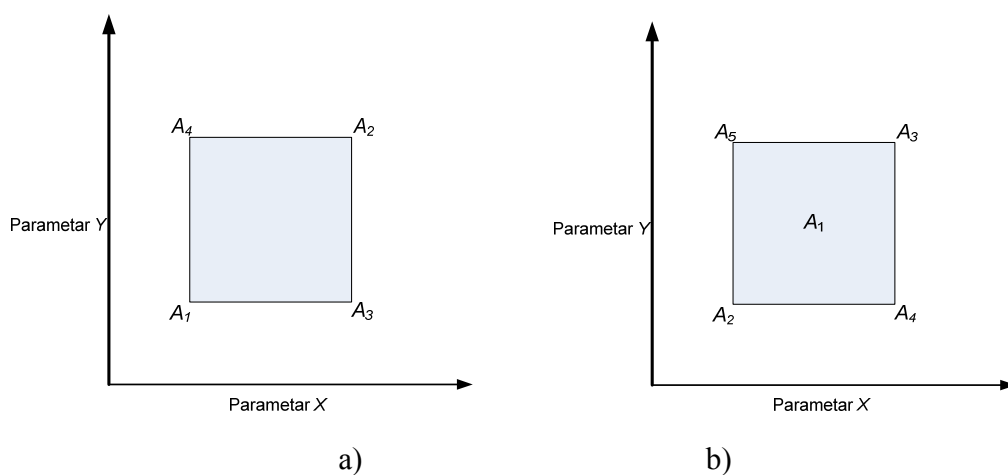
Najznačajnije prednosti faktorskih planova su u tome što omogućavaju:

- utvrđivanje zakonitosti fenomena u cijelom eksperimentalnom području, ispitivanjem faktora na  $p = 1, 2, \dots, m$  razina;
- simultano ispitivanje neograničenog broja faktora;
- određivanje veličine međusobnog djelovanja, tj. interakcije faktora.

Najjednostavnija, ali i najviše obrađivana vrsta faktorskih planova je  $2^n$ , odnosno klasa sa  $n$  faktora na dvije razine<sup>3</sup>.

### 2.5.1.1. Faktorski plan na dvije razine s dvije varijable

Broj potrebnih eksperimenata u slučaju faktorskog plana na dvije razine s dvije varijable prema jednadžbi 2.2. je četiri. Za dvije varijable faktorski plan se može geometrijski predstaviti pravokutnikom, s time da su razine u ovakvom prikazu pravci (Slika 2.6.).



**Slika 2.6.** a) Faktorski plan na dvije razine s dvije varijable.

b) Faktorski plan na dvije razine s dvije varijable i centralnom točkom.

Rezultati u pet nivoa čine jedan ciklus operacija koja će biti zabilježena kao optimalna analiza za koju je potrebno ponavljanje istog eksperimenta najmanje dva puta. Ponavljanje više od dva puta omogućava donošenje boljeg zaključka<sup>3</sup>.

Eksperimenti na pet razina s dva parametara donijet će četiri statistička odgovora:

- 1) Učinak parametara  $X$ ;
- 2) Učinak parametara  $Y$ ;
- 3) Međudjelovanje parametara  $XY$ ;
- 4) Promjena u sredini<sup>3</sup>.

### 2.5.1.2. Faktorski plan na dvije razine s tri varijable

U slučaju faktorskog plana na dvije razine s tri varijable broj okusa prema jednadžbi 2.2. bio bi osam, odnosno devet u slučaju faktorskog plana na dvije razine s tri varijable i centralnom točkom.

U ovom slučaju eksperimentalni uvjeti odnosno kodirani nivoi su podjeljeni u dva bloka pod pravim kutem u trodimenzionalnom prostoru. Parametri  $X$ ,  $Y$  i  $Z$  promatrani su u dvije razine, višu i nižu u odnosu na centralnu točku. Potpuni ciklus eksperimenata prikazan na slici 2.7. je podjeljen u dva bloka sa po pet eksperimenata. Blok 1 čine točke od  $A_1$  do  $A_5$ , dok blok 2 čine točke od  $A_6$  do  $A_{10}$ . U ovom slučaju  $A_1$  i  $A_6$  u centru kocke su identične kodirane vrijednosti, ali svaka od njih čini centar za drugi blok<sup>9</sup> (Slika 2.7.).

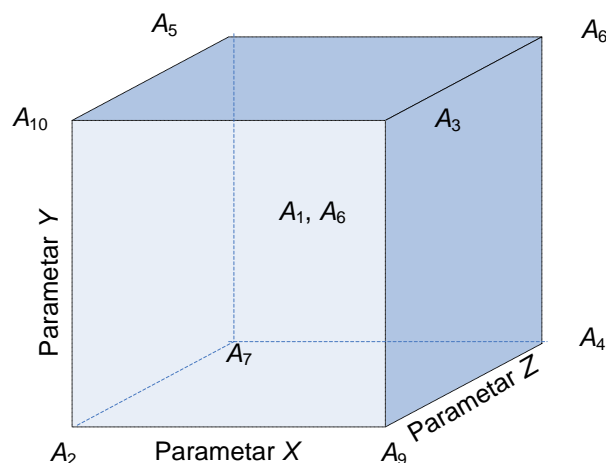
Za razliku od faktorskog plana sa dvije varijable, plan pokusa u slučaju faktorskog plana s dvije varijable i centralnom točkom može se predstaviti kockom, a razine su u troparametarskom sustavu ravnine. Pokusi se također postavljaju u centar i vrhove kocke i tako se dobije  $8 + 1$  pokus.

Treba napomenuti da  $A_1$  i  $A_6$  predstavljaju početne vrijednosti ispitivanih parametara dobivenih iz prethodnog iskustva, ili temeljene na literaturnim podacima.

Eksperimenti provedeni prema ovakvom planu pokusa kao rezultate dati će osam statističkih odgovora:

- 1) Učinak parametara  $X$ ;
- 2) Učinak parametara  $Y$ ;
- 3) Učinak parametra  $Z$ ;

- 4) Međudjelovanje parametara  $XY$ ;
- 5) Međudjelovanje parametara  $XZ$ ;
- 6) Međudjelovanje parametara  $YZ$ ;
- 7) Međudjelovanje parametara  $XYZ$ ;
- 8) Promjena u sredini<sup>9</sup>.



**Slika 2.7.** Faktorski plan na dvije razine s tri varijable i centralnom točkom.

## 2.6. EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE OPTIMUMA PROCESA

Zbog nedostatka matematičkih modela i njihove kompleksnosti velik broj višefaktorskih procesa koji su od praktičnog značenja, ne može biti optimiran numeričkim metodama. To znači da se iz opće poznatih teorijskih znanja koja se odnose na promatrani proces, ne može na zadovoljavajući način definirati sam proizvodni proces te je u najvećem broju slučajeva potrebno provesti pokus.

Prethodno je potrebno odrediti veličine koje mogu utjecati na proces, odnosno na veličinu(e) koja(e) će se pratiti i koja će označavati stanje procesa. Tek tada se pristupa eksperimentu mijenjajući vrijednosti ulaznih veličina i prateći kakav je njihov utjecaj na promatrani proces. Primjenom neke od metoda eksperimentalnog određivanja optimuma procesa moguće je odrediti utjecaj pojedine ulazne veličine na sam proces, odnosno odrediti da li je utjecaj značajan ili se može zanemariti. Također je moguće, na temelju prethodnog mjerenja, a



primjenom neke od metoda, odrediti korak za koji će se mijenjati svaka varijabla koja utječe na proces, tijekom same provedbe optimiranja<sup>7</sup>.

### 2.6.1. Evolucijske operacije (EVOP)

EVOP metoda (*"Evolutionary operation"*) je ekperimentalno razvojno planiranje tj. metoda u kojoj se optimum procesa postiže korak po korak pri čemu se traže optimalni uvjeti provedbe procesa<sup>4</sup>. Pokus treba planirati da on bude optimalan tj. s minimalnim brojem eksperimenata treba dobiti što više informacija o procesu.

Osnovne faze evolucijskih operacija su:

- 1) Definiranje kriterija i ograničenja;
- 2) Izbor varijabli koje treba optimirati;
- 3) Kreiranje plana pokusa;
- 4) Obrada eksperimentalnih rezultata Jets-ovim algoritmom;
- 5) Pronalaženje optimalnih vrijednosti varijabli<sup>11</sup>.

EVOP metoda je vrlo učinkovita, ali ujedno i jedina predvidiva kod optimiranja procesa s dvije ili tri varijable<sup>6</sup>.

U EVOP metodi se učinci dvije ili tri varijable promatraju zajedno te se preko statističke analize rezultata pokusa i primjenom lingvističkih pravila odlučivanja dolazi do zaključaka.

#### 2.6.1.1. Primjena EVOP metode za optimiranje dvoparametarskog procesa

Za dobivanje rezultata optimiranja dvoparametarskog procesa EVOP metodom treba slijediti tri koraka:

##### **Korak 1:**

Na osnovu najmanje dva ciklusa eksperimentalnih rezultata potrebno je izračunati srednju vrijednost i razliku prateći sljedeće korake<sup>3</sup>:

Kodirane vrijednosti parametara procesa:

$A_1$     $A_2$     $A_3$     $A_4$     $A_5$

Vrijednosti odziva u tokama plana pokusa za 1. ciklus:

$$a_{11} \quad a_{12} \quad a_{13} \quad a_{14} \quad a_{15}$$

Vrijednosti odziva u tokama plana pokusa za 2. ciklus:

$$a_{21} \quad a_{22} \quad a_{23} \quad a_{24} \quad a_{25}$$

Razlika vrijednosti u točkama plana pokusa 1. i 2. ciklusa:

$$(a_{11}-a_{12}) (a_{12}-a_{22}) (a_{13}-a_{23}) (a_{14}-a_{24}) (a_{15}-a_{25}) \quad (2.3.)$$

Srednja vrijednost odziva u točkama plana pokusa:

$$\frac{(a_{11} + a_{21})}{2} \quad \frac{(a_{12} + a_{22})}{2} \quad \frac{(a_{13} + a_{23})}{2} \quad \frac{(a_{14} + a_{24})}{2} \quad \frac{(a_{15} + a_{25})}{2} \quad (2.4.)$$

### Korak 2:

Srednje vrijednosti izračunate u koraku 1 se koriste za izračunavanje učinaka pojedinih varijabli, njihovo međudjelovanje te odstupanje u sredini (Tablica 2.1.).

**Tablica 2.1.** Proračun učinaka pojedinih varijabli, njihovog međudjelovanja i odstupanja u sredini za dvoparametarski plan pokusa.

|                      |  |
|----------------------|--|
| $X$                  | $\frac{1}{2}(\bar{a}_3 + \bar{a}_4 - \bar{a}_2 - \bar{a}_5)$                 |
| $Y$                  | $\frac{1}{2}(\bar{a}_3 + \bar{a}_5 - \bar{a}_2 - \bar{a}_4)$                 |
| $XY$                 | $\frac{1}{2}(\bar{a}_2 + \bar{a}_3 - \bar{a}_4 - \bar{a}_5)$                 |
| odstupanje u sredini | $\frac{1}{2}(\bar{a}_2 + \bar{a}_3 - \bar{a}_4 - \bar{a}_5 - 4 * \bar{a}_1)$ |

### Korak 3:

Izračunavanje standardne devijacije prema jednadžbi:

$$\sigma = \text{Raspon} * f \quad (2.5.)$$

gdje je:

”*Raspon*” - razlika između ”najveće razlike” i ”najmanje razlike” izračunate u koraku 1,  
 $f$  - statistički faktor određen na osnovu broja ciklusa eksperimenata i jednak je 0,3 za dva ciklusa.

Granica pogreške se računa prema sljedećim pravilima:

- za ”srednju vrijednost” i ”učinak”: granica pogreške =  $\pm K * \sigma$  (2.6.)

- za promjenu u sredini: granica pogreške =  $\pm M * \sigma$  (2.7.)

$$K = \frac{2}{\sqrt{n}} = 1,414 \text{ za } n = 2; \quad (2.8.)$$

$$M = \frac{1,78}{\sqrt{n}} = 1,259 \text{ za } n = 2; \quad (2.9.)$$

gdje je:

$\sigma$  - standardna devijacija izračunata u koraku 3,

$K$  i  $M$  - statistički faktori,

$n$  - broj ciklusa eksperimenata u pet točaka plana pokusa.

### 2.6.1.2. Primjena EVOP metode za optimiranje troparametarskog procesa

U ovom slučaju eksperimentalni uvjeti odnosno kodirani nivoi su podjeljeni u dva bloka pod pravim kutem u trodimenzionalnom prostoru. bloku 1 pripadaju vrijednosti aktivnosti enzima od  $A_1$  do  $A_5$ , dok bloku 2 pripadaju vrijednosti aktivnosti enzima od  $A_6$  do  $A_{10}$ .

Za dobivanje rezultata optimizacije troparametarskog procesa treba slijediti tri koraka:

#### Korak 1:

Na osnovu najmanje dva ciklusa eksperimentalnih rezultata potrebno je u bloku 1 i bloku 2 izračunati srednju vrijednost i razliku prateći sljedeće korake:

Kodirane vrijednosti parametara procesa

$A_1$      $A_2$      $A_3$      $A_4$      $A_5$      $A_6$      $A_7$      $A_8$      $A_9$      $A_{10}$

Vrijednosti odziva u točkama plana pokusa za 1. ciklus:

$a_{11}$      $a_{12}$      $a_{13}$      $a_{14}$      $a_{15}$      $a_{16}$      $a_{17}$      $a_{18}$      $a_{19}$      $a_{110}$

Vrijednosti odziva u točkama plana pokusa za 2. ciklus:

$$a_{21} \quad a_{22} \quad a_{23} \quad a_{24} \quad a_{25} \quad a_{26} \quad a_{27} \quad a_{28} \quad a_{29} \quad a_{210}$$

Razlika vrijednosti odziva u točkama plana pokusa 1. i 2. ciklusa:

$$(a_{11} - a_{21}) \quad (a_{12} - a_{22}) \quad (a_{13} - a_{23}) \quad (a_{14} - a_{24}) \quad (a_{15} - a_{25})$$

$$(a_{16} - a_{26}) \quad (a_{17} - a_{27}) \quad (a_{18} - a_{28}) \quad (a_{19} - a_{29}) \quad (a_{110} - a_{210})$$

(2.10.)

Srednja vrijednost odziva u točkama plana pokusa:

$$\frac{a_{11} - a_{21}}{2} \quad \frac{a_{12} - a_{22}}{2} \quad \frac{a_{13} - a_{23}}{2} \quad \frac{a_{14} - a_{24}}{2} \quad \frac{a_{15} - a_{25}}{2}$$

$$\frac{a_{16} - a_{26}}{2} \quad \frac{a_{17} - a_{27}}{2} \quad \frac{a_{18} - a_{28}}{2} \quad \frac{a_{19} - a_{29}}{2} \quad \frac{a_{110} - a_{210}}{2}$$

(2.11.)

### Korak 2:

Na osnovu izračunatih srednjih vrijednosti odziva u kodiranim točkama plana pokusa izračunaju se učinci pojedinih varijabli, njihovo međudjelovanje te odstupanje u sredini.

**Tablica 2.2.** Proračuna učinaka pojedinih varijabli, njihovog međudjelovanja i odstupanja u sredini za troparametarski plan pokusa.

|            |   |
|------------|---|
| <b>X</b>   | $\frac{1}{4}(a_3 + a_4 + a_8 + a_9 - a_2 - a_5 - a_7 - a_{10})$ |
| <b>Y</b>   | $\frac{1}{4}(a_3 + a_5 + a_8 + a_{10} - a_2 - a_4 - a_7 - a_9)$ |
| <b>Z</b>   | $\frac{1}{4}(a_4 + a_5 + a_7 + a_8 - a_2 - a_3 - a_9 - a_{10})$ |
| <b>XY</b>  | $\frac{1}{4}(a_2 + a_3 + a_7 + a_8 - a_4 - a_5 - a_9 - a_{10})$ |
| <b>XZ</b>  | $\frac{1}{4}(a_2 + a_4 + a_8 + a_{10} - a_3 - a_5 - a_7 - a_9)$ |
| <b>YZ</b>  | $\frac{1}{4}(a_2 + a_5 + a_8 + a_9 - a_3 - a_4 - a_7 - a_{10})$ |
| <b>XYZ</b> | $\frac{1}{4}(a_7 + a_8 + a_9 + a_{10} - a_2 - a_3 - a_4 - a_5)$ |

|                      |  |
|----------------------|--|
| odstupanje u sredini | $\frac{1}{10}(a_2 + a_3 + a_4 + a_5 + a_7 + a_8 + a_9 + a_{10} - 4a_1 - 4a_6)$ |
|----------------------|--|

**Korak 3:**

Izračunavanje standardne devijacije i granice pogrešaka:

Standardna devijacija

$$S_1 = \text{Raspon}(\text{blok 1}) * f_{n,k} \quad (2.12.)$$

$$S_2 = \text{Raspon}(\text{blok 2}) * f_{n,k} \quad (2.13.)$$

$$S = \frac{1}{2}(S_1 + S_2) = \sigma \quad (2.14.)$$

gdje je:

”Raspon” - razlika između ”najveće razlike” i ”najmanje razlike”

$f$  - statistički faktor određen na osnovu broja ciklusa eksperimenata i jednaka je 0,3 za dva provedena ciklusa mjerenja.

Granica pogreške se računa prema sljedećim pravilima:

- za ”srednju vrijednost”: granica pogreške =  $\pm \frac{2}{\sqrt{n}} \sigma$  (2.15.)

- za ”učinak”: =  $\pm 0,71 \frac{2}{\sqrt{n}} \sigma$  (2.16.)

- za promjenu u sredini: granica pogreške: =  $\pm 0,63 \frac{2}{\sqrt{n}} \sigma$  (2.17.)

**2.6.1.3. Lingvistička pravila odlučivanja**

Nakon završetka proračuna potrebno je donijeti odluku na koji način kreirati sljedeći plan pokusa. EVOP metoda u tu svrhu koristi sljedeća lingvistička pravila odlučivanja:

1.) Ako je učinak pozitivan i velik u usporedbi s granicom odstupanja i odstupanje u sredini je malo:

- a) povećanje vrijednosti promatranih varijabli će pomoći maksimiziranju odziva procesa
- b) smanjivanje vrijednosti promatranih varijable će pomoći minimiziranju odziva procesa

2.) Ako je učinak negativan i veći u usporedbi s granicom odstupanja i odstupanje u sredini je malo:

- a) smanjivanje vrijednosti promatranih parametara varijabli će pomoći maksimiziranju odziva procesa
- b) povećanje promatranih parametara varijabli će pomoći minimiziranju odziva procesa

3.) Ako je učinak mali u usporedbi s granicom odstupanja, a odstupanje u sredini je veliko:

- a) minimum je postignut ako je promjena u sredini pozitivna
- b) maksimum je postignut ako je promjena u sredini negativna<sup>9</sup>

## 2.7. IZOLACIJA ENZIMA ADH

### 2.7.1. Procesi razbijanja stanične stjenke

Razbijanje stanica je jedna od najvažnijih operacija za pridobivanje željenih komponenti iz stanica. Mnoge tvari, kao što su enzimi, proteini, masti, steroidi i antibiotici, se dobivaju na ovaj način. Razbijanje mikroorganizama u laboratorijskom mjerilu ne predstavlja tolike probleme kao kada se radi u pilot-postrojenju ili industrijskom procesu, naročito uzimajući u obzir ekonomičnost procesa.

Problemi otvaranja stanične membrane se javljaju pri izolaciji unutarstaničnih bioprodukata i postaju sve izraženiji što je stanična membrana čvršća. U tom se slučaju stanična membrana mora razbiti, tj. otvoriti, a da se bioprodukt ne ošteti.

Operacijom mljevenja (usitnjavanja) smanjuje se veličina čestica, a provodi se u mlinovima od kojih se najčešće upotrebljavaju sljedeći mlinovi:

- 1.) mlinovi s čekićima koji usitnjuju do veličine čestica od 50-5000  $\mu\text{m}$ ;
- 2.) kuglični mlinovi za usitnjavanje krutih materijala, a dobivena veličina čestica se podešava karakteristikama mlina;
- 3.) rezači su mlinovi koji se upotrebljavaju za usitnjavanje žilavih i vlaknastih materijala, kao što su biljne sirovine, a dobivena veličina je od 200-1000  $\mu\text{m}$ ;
- 4.) mlaznim mlinovima, koji melju na temelju sraza čestica u struji zraka dobivaju se veličine od 1-30  $\mu\text{m}$ ;

5.) mlinovi tipa trovaljka, koloidnog mlina i homogenizatora se koriste za mljevenje i homogeniziranje ljekovitih masti i krema.

Količina energije koja se mora uložiti za razbijanje stanice ovisi o vrsti organizma i u određenoj mjeri o fiziologiji organizma. Neke stanice se lako razbijaju samo blagom obradom npr. osmotskim šokom, dok su druge vrlo otporne na razbijanje. Kvasci, zelene alge, gljive te neke gram(+) bakterije imaju takvu staničnu stjenku i membransku strukturu da se mogu odupirati unutarnjem osmotskom tlaku od oko 20 atm.

Metode razbijanja stanica se mogu podijeliti na mehaničke i nemehaničke<sup>12</sup>. Mehaničke metode se dijele prema agregatnom stanju tretiranog uzorka na tekuće i čvrste načine razbijanja stanica. Tu valja spomenuti metode kao što su ultrazvuk, mehanička obrada, obrada tlakom i mljevenje. Od nemehaničkih metoda koriste se fizičke metode, primjerice sušenje, osmotski šok, kemijske metode (kationski i anionski detergentsi, antibiotici, glicin) i enzimatske metode.

#### **2.7.1.1. Homogenizator**

Velike količine potencijalno korisnih bioprodukata nisu izravno prisutne, nego se nalaze unutar stanice. Zbog toga je potrebno takvim stanicama razbiti, tj. otvoriti staničnu stjenku da bi se oslobodio unutarstanični enzim. To predstavlja početni korak u pridobivanju enzima i ostalih bioprodukata. U tu svrhu se veoma često koristi kuglični mlin iz razloga što je brz i djelotvoran. Također, često se kuglični mlin koristi i za istovremeno izdvajanje više enzima i bioprodukata.

Smatra se da je proces oslobađanja enzima iz stanice proces prvog reda, a brzina oslobađanja pojedinih enzima iz stanice je tada proporcionalna količini enzima koji je preostao unutar stanice.

Uspješnost razbijanja stanične membrane u homogenizatoru ovisi o brzini razbijanja stanične membrane, količini stanica prisutnih u procesu mljevenja, brzini okretanja noža i promjeru samog homogenizatora, kao i o mjestu gdje se enzim, ili neki drugi bioprodukt, nalazi unutar stanice.

### 3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu provedeno je optimiranje procesa pridobivanja enzima ADH pekarskog kvasca metodom evolucijskog planiranja. Analizirani su utjecaji vremena homogeniziranja, temperature i pH medija na učinkovitost procesa razbijanja stanične stjenke. Praćena je i promjena aktivnosti izoliranog enzima ADH pri različitim temperaturama. Kao referentna metoda razbijanja stanične stjenke u homogenizatoru analizirani su mljevenje u kugličnom mlinu sa staklenim kuglicama i permeabilizacija detargentom CTAB-om.

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

Tijekom provedbe pokusa su korištene sljedeće kemikalije:

- kalijev hidrogenfosfat ( $K_2HPO_4$ ), *Merck*
- kalijev dihidrogenfosfat ( $KH_2PO_4$ ), *Riedel-de Haen*
- heksadeciltrimetil-amonijev bromid, CTAB, *Fluka*
- natrijev hidrogenfosfat ( $Na_2HPO_4$ ), *Kemika*
- natrijev pirofosfat ( $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ ), *Kemika*
- glicin (l-aminooctena kiselina -  $NH_2CH_2COOH$ ), *Merck*
- semikarbazid-hidroklorid ( $H_2NNHCONHCl$ ), *Kemika*
- natrijev hidroksid (NaOH), *Kemika*
- etanol, 96%-tni, *Kemika*
- $NAD^+$  (b-nikotin-amid-adenin-dinukleotid), *Merck*
- Coomasie Brilliant Blue, *Fluka*
- etanol, 96%-tni, *Kemika*
- fosfatna kiselina, 85%-tna, *Kemika*
- pekarski kvasac, *Kvasac d.d.*



### 3.1.2. Priprema otopina

U ovom radu su korištene sljedeće otopine:

a) određivanje aktivnosti enzima ADH

1) glicin-sodium-pirofosfatni pufer

- 10 g  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  i 0,5 g glicina otopljeno je u 300 ml redestilirane vode, a pH je podešen na 9 dodatkom 1 M HCl

2) otopina semikarbazid-hidroklorida

- 2,5 g semikarbazid-hidroklorida je otopljeno u 10 ml 2 M NaOH

3) otopina  $\text{NAD}^+$

- 0,287 g  $\text{NAD}^+$  je otopljeno u 10 ml redestilirane vode

b) određivanje koncentracije proteina

1) reagens

- 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250, Fluka, je pomiješan sa 50 ml etanola, 100 ml

$\text{H}_3\text{PO}_4$  i 850 ml redestilirane vode

c) mljevenje

1) fosfatni pufer prema Sorensenu

pH = 7,0

- 37,89 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 36,321 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  potrebno je otopiti u 2  $\text{dm}^3$  redestilirane vode

d) permeabilizacija kvasca

1) 0,2 % otopina CTAB-a

- 0,2 g CTAB-a je otopljeno u 100  $\text{cm}^3$  fosfatnog pufera (pH = 7,  $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ )

2) fosfatni pufer

- 10,71 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i 5,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  potrebno je otopiti u 1  $\text{dm}^3$  redestilirane vode

### 3.1.3. Permeabilizacija stanica pekarskog kvasca

U kiveti je izvagano 0,5 g pekarskog kvasca te je dodano 10 cm<sup>3</sup> 0,2 %-tne otopine CTAB-a (jednadžba 3.1.).

$$V_{0,2\%CTAB} [\text{cm}^3] = m_{\text{m.b.}} [\text{g}] \cdot k [\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}] \quad (k = 10 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (3.1.)$$

Permeabilizacija je provedena mješanjem na vortexu 15 minuta, te je nastala suspenzija centrifugirana 10 min pri  $n = 5000 \text{ min}^{-1}$ . Nastali kapljevinski ostatak je oddekantiran i bačen, a permeabilizirane stanice oprane sa približno 10 cm<sup>3</sup> fosfatnog pufera ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,0). Suspenzija permeabiliziranih stanica pekarskog kvasca je ponovno odcentrifugirana 10 min,  $n = 5000 \text{ min}^{-1}$ . Kapljevinski ostatak je bačen, a preostale stanice suspendirane su u fosfatnom puferu do koncentracije 0,1 g cm<sup>-3</sup>.

## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. Određivanje aktivnosti enzima ADH

Aktivnost enzima ADH porijeklom iz pekarskog kvasca je određena spektrofotometrijskim testom koji se temelji na reakciji oksidacije etanola u acetaldehid u pirofosfatnom puferu pri pH 8,7. Shematski se ona može prikazati jednadžbom 2.1.

Spektrofotometrijski je mjerena promjena apsorbancije nastalog NADH pri  $\lambda = 340 \text{ nm}$ . Naime, reducirani nikotin-amid-adenin-dinukleotid (NADH) apsorbira maksimalnu količinu svjetla valne duljine od 340 nm, dok njegova oksidirana forma (NAD<sup>+</sup>) u valnom području od 300 do 400 nm ne apsorbira svjetlo.

U kvarcne kivete volumena 3 cm<sup>3</sup> potrebno je odpipetirati volumen svake komponente prema vrijednostima danim u tablici 3.1.

**Tablica 3.1.** Sastav otopina u kiveti za ispitivanje aktivnosti enzima ADH.

| Materijal                 | slijepi uzorak<br>[cm <sup>3</sup> ] | mjerni uzorak<br>[cm <sup>3</sup> ] |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| glicin-pirofosfatni pufer | 2,0                                  | 2,0                                 |
| semikarbazid-hidroklorid  | 0,1                                  | 0,1                                 |
| NAD <sup>+</sup>          | 0,2                                  | 0,2                                 |
| Etanol                    | 0,1                                  | 0,1                                 |

|                    |     |     |
|--------------------|-----|-----|
| Uzorak             | -   | 0,5 |
| redestilirana voda | 0,5 | -   |

Tijekom reakcije dolazi do nastanka NADH što se na spektrofotometru registrira kao promjenu apsorbancije u vremenu. Apsorbancija je proporcionalna aktivnosti enzima ADH. Volumna aktivnost, ( $A_v$ ) enzima računa se iz izraza 3.2.:

$$A_v = \frac{V_r}{\epsilon_{340} \cdot d \cdot V_u} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (3.2)$$

gdje je:

$V_r$  - volumen uzorka [ $\text{cm}^3$ ]

$V_u$  - ukupni volumen [ $\text{cm}^3$ ]

$\epsilon_{340}$  - ekstincijski koeficijent [ $\text{cm}^2 \mu\text{m}^{-1}$ ], ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{m}^{-1}$ )

$d$  - promjer kivete [cm]

$\Delta ABS/\Delta t$  - promjena apsorbancije u vremenu [ $\text{min}^{-1}$ ], (nagib pravca)

Specifična aktivnost enzima ADH po gramu kvasca računa se prema izrazu 3.3.:

$$A_{s,k} = \frac{A_v}{c_k} \quad (3.3)$$

gdje je:

$A_{s,k}$  - specifična aktivnost po gramu kvasca [ $\text{U g}^{-1}$ ]

$A_v$  - volumna aktivnost [ $\text{U cm}^{-1}$ ]

$c_k$  - koncentracija kvasca [ $\text{g cm}^{-3}$ ]

Specifična aktivnost enzima ADH po gramu proteina računa se prema izrazu 3.4.:

$$A_{s,p} = \frac{A_v}{c_p} \quad (3.4)$$

gdje je:

$A_{s,k}$  - specifična aktivnost po gramu proteina [ $\text{U g}^{-1}$ ]

$A_v$  - volumna aktivnost [ $\text{U cm}^{-3}$ ]

$c_p$  - koncentracija proteina [ $\text{g cm}^{-3}$ ]

Reakcija (jednadžba 2.1.) je reverzibilna, a dodatkom semikarbazid-hidroklorida koji veže nastali acetaldehid ravnoteža se pomiče u desno.

### 3.2.2. Određivanje koncentracije proteina

0,8 cm<sup>3</sup> uzorka je pomiješano sa 0,2 cm<sup>3</sup> reagensa i inkubirano u kiveti 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga je pri  $\lambda = 595$  nm očitana apsorbancija na spektrofotometru.

Za očitane apsorbancije koncentracija proteina je izračunata pomoću jednadžbe baždarnog pravca. Baždarni pravac (prilog) određen je mjerenjem apsorbancije ABS pri istoj valnoj duljini za modelnu otopinu BSA (Bovine serum albumin) različitih poznatih koncentracija, pri čemu je baždarni pravac eksperimentalno određen prije svake serije mjerenja nepoznate koncentracije proteina.

### 3.3. APARATURA

Aparatura na kojoj je proveden proces razbijanja stanične stjenke prikazana je na slici 3.1.



Slika 3.1. Aparatura za provedbu procesa razbijanja stanične stjenke.

#### 3.3.1. Centrifuga

Uzorci su centrifugirani na stojećoj, horizontalnoj centrifugi proizvođača TEHTNICA (Slovenija) na  $5000 \text{ min}^{-1}$ .

### **3.3.2. Spektrofotometar**

Mjerenje koncentracije proteina i volumne aktivnosti enzima ADH provedeno je upotrebom spektrofotometrijskih metoda na dvoznačnom spektrofotometru SHIMADZU UV-1601 (Japan).

### **3.3.3. Homogenizator**

Razbijanje stanične stijenke pekarskog kvasca provedeno je u homogenizatoru Ivan Sorvall Inc., Connecticut, USA pri  $5000 \text{ min}^{-1}$ .

### **3.3.4. Kuglični mlin**

Razbijanje stanične stijenke pekarskog kvasca provedeno je u laboratorijskom kugličnom mlinu sa staklenim kuglicama promjera 0,3 mm.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu je optimiran proces razbijanja stanične stijenke pekarskog kvasca u svrhu izolacije enzima ADH. Praćen je utjecaj pH, temperature i vremena razbijanja stanične stijenke u

homogenizatoru na volumnu i specifičnu aktivnost enzima kao i na ukupnu koncentraciju proteina. Praćena je promjena aktivnosti enzima ADH dobijenog razbijanjem stanica pekarskog kvasca u homogenizatoru pri različitim temperaturama. Na kraju su uspoređene dvije različite metode razbijanja stanica pekarskog kvasca, mljevenje u mlinu i homogenizatoru, u odnosu na pereabilizaciju stanica detergentom CTAB-om.

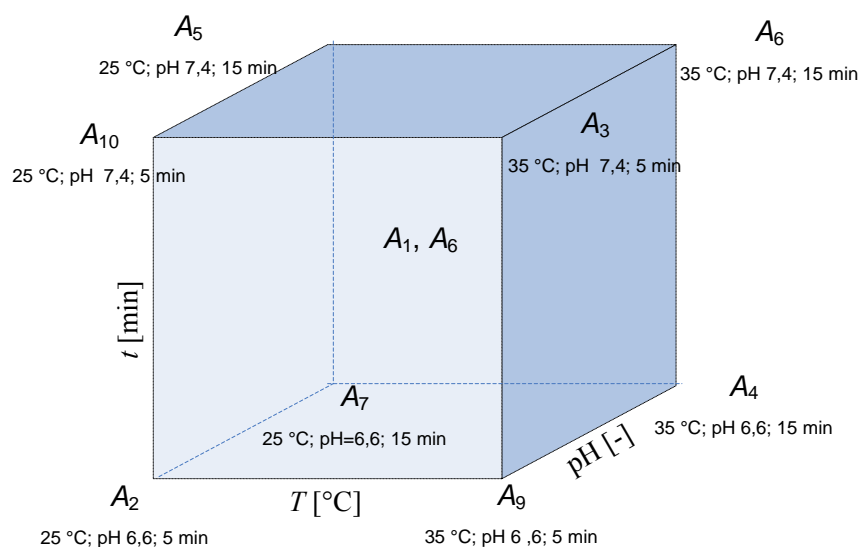
#### 4.1. OPTIMIRANJE PROCESA RAZBIJANJA STANIČNE STJENKE EVOP METODOM

Proučavan je utjecaj parametara procesa, temperature, pH medija i vremena trajanja procesa razbijanja stanične stjenke u homogenizatoru na specifičnu aktivnost enzima ADH pekarskog kvasca, kao i na ukupnu koncentraciju proteina. Na temelju prethodnih saznanja o ovom procesu kreiran je prvi plan pokusa na dvije razine s centralnom točkom. Za centralnu točku prvog plana pokusa ( $A_1$ ,  $A_6$ , Tablica 4.1.) uzete su sljedeće vrijednosti izučavanih parametara, temperatura 30 C, pH 7,0 i vrijeme razbijanja stanične stjenke 10 minuta. Kao vrijednosti parametara na gornjoj razini uzete su temperatura 35 °C, pH, 7,4 i vrijeme razbijanja 15 minuta dok su vrijednosti parametara na donjoj razini bili  $T = 25^\circ \text{C}$ , pH 6,6 i vrijeme razbijanja stanica 5 minuta (Tablica 4.1., Slika 4.1).

**Tablica 4.1.** Prvi plan pokusa

|       | $T$<br>[°C] | pH<br>[-] | $t$<br>[min] |
|-------|-------------|-----------|--------------|
| $A_1$ | 30          | 7,0       | 10           |

|            |    |     |    |
|------------|----|-----|----|
| <b>A2</b>  | 25 | 6,6 | 5  |
| <b>A3</b>  | 25 | 6,6 | 15 |
| <b>A4</b>  | 25 | 7,4 | 5  |
| <b>A5</b>  | 25 | 7,4 | 15 |
| <b>A6</b>  | 30 | 7,0 | 10 |
| <b>A7</b>  | 35 | 6,6 | 5  |
| <b>A8</b>  | 35 | 6,6 | 15 |
| <b>A9</b>  | 35 | 7,4 | 5  |
| <b>A10</b> | 35 | 7,4 | 15 |



**Slika 4.1.** Prostorni prikaz prvog plana pokusa.

U svakoj točki plana pokusa provedene su dvije serije mjerenja, a izračunate specifične aktivnosti po gramu kvasca i gramu proteina prikazane su u tablici 4.2.

**Tablica 4.2.** Izračunate vrijednosti specifične aktivnosti enzima ADH po gramu kvasca i specifične aktivnosti po gramu proteina za točke prvog plana pokusa.

|  |           |           |           |           |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
|  | $A_{s,k}$ | $A_{s,k}$ | $A_{s,p}$ | $A_{s,p}$ |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|

|            | [U g <sup>-1</sup> ]  | [U g <sup>-1</sup> ]  | [U g <sup>-1</sup> ]  | [U g <sup>-1</sup> ]  |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>A1</b>  | 2,59*10 <sup>-6</sup> | 1,63*10 <sup>-6</sup> | 9,35*10 <sup>-6</sup> | 6,02*10 <sup>-6</sup> |
| <b>A2</b>  | 9,12*10 <sup>-7</sup> | 9,11*10 <sup>-7</sup> | 3,52*10 <sup>-6</sup> | 3,15*10 <sup>-6</sup> |
| <b>A3</b>  | 1,26*10 <sup>-6</sup> | 1,30*10 <sup>-6</sup> | 4,56*10 <sup>-6</sup> | 4,68*10 <sup>-6</sup> |
| <b>A4</b>  | 1,17*10 <sup>-6</sup> | 1,35*10 <sup>-6</sup> | 4,03*10 <sup>-6</sup> | 4,96*10 <sup>-6</sup> |
| <b>A5</b>  | 1,38*10 <sup>-6</sup> | 1,21*10 <sup>-6</sup> | 7,52*10 <sup>-6</sup> | 3,93*10 <sup>-6</sup> |
| <b>A6</b>  | 2,59*10 <sup>-6</sup> | 1,63*10 <sup>-6</sup> | 9,35*10 <sup>-6</sup> | 6,02*10 <sup>-6</sup> |
| <b>A7</b>  | 8,49*10 <sup>-7</sup> | 8,88*10 <sup>-7</sup> | 3,13*10 <sup>-6</sup> | 2,82*10 <sup>-6</sup> |
| <b>A8</b>  | 1,63*10 <sup>-6</sup> | 1,63*10 <sup>-6</sup> | 8,19*10 <sup>-6</sup> | 6,14*10 <sup>-6</sup> |
| <b>A9</b>  | 1,13*10 <sup>-6</sup> | 9,65*10 <sup>-6</sup> | 3,39*10 <sup>-6</sup> | 3,39*10 <sup>-6</sup> |
| <b>A10</b> | 7,39*10 <sup>-7</sup> | 7,25*10 <sup>-7</sup> | 2,11*10 <sup>-6</sup> | 2,56*10 <sup>-6</sup> |

Na temelju izračunatih specifičnih aktivnosti, primjenom EVOP metode, izveden je proračun učinka svake promatrane varijable i njihovog međudjelovanja. Dobiveni rezultati proračuna za prvu seriju mjerenja prikazani primjenom EVOP metode su u tablici 4.3.

**Tablica 4.3.** Učinak parametara procesa na specifičnu aktivnost enzima ADH pekarskog kvasca EVOP metodom za prvi plan pokusa.

|  |                  |
|--|------------------|
| <b>Učinak <i>T</i></b>                         | -0,0101 ± 0,0005 |
| <b>Učinak pH</b>                               | 0,0059 ± 0,0005  |
| <b>Učinak <i>t</i></b>                         | -0,0009 ± 0,0005 |
| <b>Međudjelovanje <i>T</i> i pH</b>            | 0,0022 ± 0,0005  |
| <b>Međudjelovanje <i>T</i> i <i>t</i></b>      | 0,0002 ± 0,0005  |
| <b>Međudjelovanje pH i <i>T</i></b>            | 0,0051 ± 0,0005  |
| <b>Međudjelovanje pH i <i>T</i> i <i>t</i></b> | -0,0040 ± 0,0005 |
| <b>Razlika u sredini</b>                       | -0,0239 ± 0,0004 |
| <b>Standardna devijacija</b>                   | -0,0005          |

Na temelju eksperimentalno određene koncentracije proteina uočeno je da je koncentracija proteina dobivena mljevenjem u homogenizatoru konstantna prilikom različite dužine mljevenja pri različitim temperaturama i pH vrijednostima pufera što je također prikazano u tablici 4.4.

Vidljivo je da su i učinak temperature i učinak pH pozitivni i značajno veći od granice greške. Učinak vremena provedbe procesa razbijanja stanične stjenke je negativan što upućuje na potrebu smanjenja vremena razbijanja u idućem planu pokusa. Međutim, kako je učinak vremena



razbijanja neznatno veći od granice pogreške zaključeno je da ovaj parametar ne utječe značajno na karakteristiku procesa. Stoga je drugi plan pokusa napravljen uzimajući u obzir samo analizu utjecaja temperature i pH. Kako je EVOP metoda pokazala njihov značajan pozitivan učinak na specifičnu aktivnost enzima ADH, kao nova centrelna točka uzeta je temperatura 25 °C i pH 7,4 (Tablica 4.6.). Dodatna analiza međudjelovanna parametara procesa pokazala je njihovu nezavisnost. Zadržan je isti korak za svaki analiziran parametar procesa istovjetan onom iz prvog plana pokusa, te su vrijednosti parametara procesa na višoj razini bili: temperatura 30 °C i pH 7,8, a na nižoj razini: temperatura 20 °C i pH 7,0.

**Tablica 4.4.** Ukupna koncentracije proteina u točkama prvog plana pokusa za dva ciklusa mjerenja.

|            | $c_p$<br>[mg dm <sup>-3</sup> ] | $c_p$<br>[mg dm <sup>-3</sup> ] |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>A1</b>  | 2,31                            | 2,26                            |
| <b>A2</b>  | 2,16                            | 2,41                            |
| <b>A3</b>  | 2,31                            | 2,31                            |
| <b>A4</b>  | 2,41                            | 2,26                            |
| <b>A5</b>  | 2,41                            | 2,66                            |
| <b>A6</b>  | 2,31                            | 2,26                            |
| <b>A7</b>  | 2,30                            | 2,62                            |
| <b>A8</b>  | 2,35                            | 2,21                            |
| <b>A9</b>  | 2,70                            | 2,58                            |
| <b>A10</b> | 2,51                            | 2,36                            |

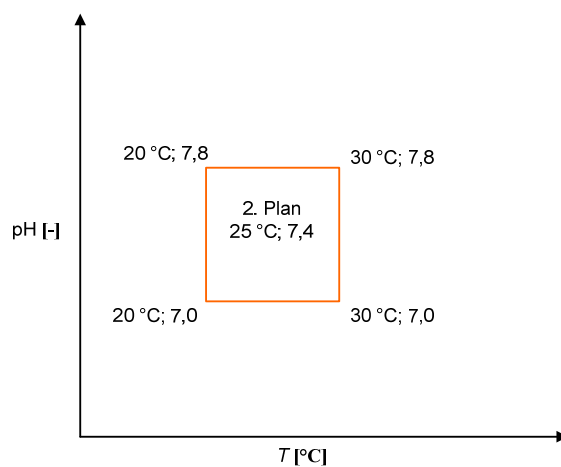
**Tablica 4.5.** Učinak parametara procesa na ukupnu koncentraciju proteina procjenjen EVOP metodom za prvi plan pokusa.

|                               |                      |
|-------------------------------|----------------------|
| Učinak $T$                    | $-0,0095 \pm 0,0074$ |
| Učinak pH                     | $-0,0003 \pm 0,0074$ |
| Učinak $t$                    | $0,0030 \pm 0,0074$  |
| Međudjelovanje $T$ i pH       | $0,0033 \pm 0,0074$  |
| Međudjelovanje $T$ i $t$      | $-0,0010 \pm 0,0074$ |
| Međudjelovanje pH i $T$       | $0,0038 \pm 0,0074$  |
| Međudjelovanje pH i $T$ i $t$ | $0,0008 \pm 0,0074$  |
| Razlika u sredini             | $0,0068 \pm 0,0066$  |
| Standardna devijacija         | 0,0018               |

Na temelju rezultata proračuna za prvi plan pokusa napravljen je novi plan pokusa, a najbolji uvjeti rada iz prethodne faze uzeti su kao središnji uvjeti u idućoj fazi i jedna ili više varijabli zamjenjena je novima. S obzirom da se utjecaj vremena mljevenja može zanemariti u daljnjoj provedbi eksperimenta korištena je metoda višefaktornog planiranja eksperimenta  $2^2$ .

**Tablica 4.6.** Drugi plan pokusa.

|    | $T$<br>[°C] | pH<br>[-] |
|----|-------------|-----------|
| A1 | 25          | 7,4       |
| A2 | 20          | 7,0       |
| A3 | 30          | 7,8       |
| A4 | 30          | 7,0       |
| A5 | 20          | 7,8       |



**Slika 4.2.** Grafički prikaz drugog plana pokusa.

Za svaku točku prvog plana pokusa izmjerena je i ukupna koncentracija proteina, a rezultati mjerenja provedenog u dva ciklusa prikazani su u tablici 4.4. Proračun učinaka pojedinog parametra procesa kao i njihovog međudjelovanja proveden je primjenom EVOP metode kao i u prethodnom slučaju optimiranja specifične aktivnosti enzima ADH. Pokazalo se da proučavani parametri procesa praktički nemaju nikakav utjecaj na ukupnu koncentraciju proteina dobivenih razbijanjem stanične stjenke u homogenizatoru. Točnije, koncentracija proteina je bila jednaka u svim točkama plana pokusa, a odstupanja između pojedinih procesnih uvjeta bila su na nivou eksperimentalne pogreške. Stoga u daljnjem radu više nije analiziran utjecaj procesnih parametara na ukupnu koncentraciju proteina dobivenih razbijanjem stanične stjenke pekarskog kvasca u homogenizatoru.

**Tablica 4.7.** Izračunate vrijednosti specifične aktivnosti enzima po gramu kvasca i specifične aktivnosti po gramu proteina za točke drugog plana pokusa.

|    | $A_{s,k}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,k}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,p}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,p}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| A1 | 1,10*10 <sup>-7</sup>             | 7,37*10 <sup>-9</sup>             | 3,81*10 <sup>-5</sup>             | 2,93*10 <sup>-6</sup>             |
| A2 | 1,16*10 <sup>-8</sup>             | 9,65*10 <sup>-9</sup>             | 3,83*10 <sup>-6</sup>             | 3,68*10 <sup>-6</sup>             |
| A3 | 1,25*10 <sup>-8</sup>             | 1,66*10 <sup>-8</sup>             | 4,67*10 <sup>-6</sup>             | 6,45*10 <sup>-6</sup>             |
| A4 | 2,32*10 <sup>-8</sup>             | 1,96*10 <sup>-8</sup>             | 8,13*10 <sup>-6</sup>             | 6,88*10 <sup>-6</sup>             |
| A5 | 2,30*10 <sup>-9</sup>             | 2,50*10 <sup>-9</sup>             | 8,76*10 <sup>-7</sup>             | 9,52*10 <sup>-7</sup>             |

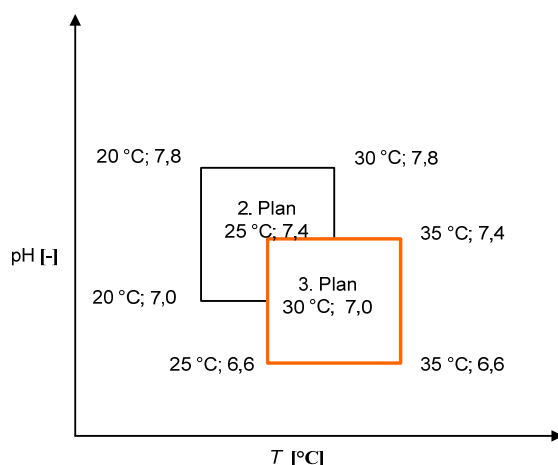
U tablici 4.7. prikazane su izračunate vrijednosti specifične aktivnosti enzima ADH pekarskog kvasca u točkama drugog plana pokusa. Učinci parametara procesa temperature i pH, te njihovog međudjelovanja kao i granične vrijednosti greške prikazane su u tablici 4.8. Vidljivo je da je učinak temperature pozitivan, a učinak pH negativan s tim da su oba značajno veća od granice greške. Pokazalo se da nema međudjelovanja parametara procesa te da je razlika u sredini zanemariva. Stoga je idući, treći, plan pokusa kreiran tako da je za centralnu točku uzeta temperatura 30 °C i pH 7,0 uz zadržavanje istog koraka kao i u prethodnim planovima pokusa. Vrijednosti parametara procesa na višoj razini bili su: temperatura 35°C i pH 7,4, odnosno na nižoj razini temperatura 25 °C i pH 6,6. (Tablica 4.9.). Grafički prikaz trećeg plana pokusa sa prikazanim trendom promjene pojedinih parametara procesa prikazan je na slici 4.3.

**Tablica 4.8.** Učinak parametara procesa na specifičnu aktivnost enzima ADH procijenjen EVOP metodom za drugi plan pokusa.

|   |                      |
|---|----------------------|
| <b>Učinak <math>T</math></b>              | $0,0344 \pm 0,0050$  |
| <b>Učinak pH</b>                          | $-0,0226 \pm 0,0050$ |
| <b>Međudjelovanje <math>T</math> i pH</b> | $0,0021 \pm 0,0050$  |
| <b>Razlika u sredini</b>                  | $0,0062 \pm 0,0044$  |
| <b>Standardna devijacija</b>              | 0,0035               |

**Tablica 4.9.** Treći plan pokusa.

|           | <b><math>T</math></b><br>[°C] | <b>pH</b><br>[-] |
|-----------|-------------------------------|------------------|
| <b>A1</b> | 30                            | 7,0              |
| <b>A2</b> | 25                            | 6,6              |
| <b>A3</b> | 35                            | 7,4              |
| <b>A4</b> | 35                            | 6,6              |
| <b>A5</b> | 25                            | 7,4              |



**Slika 4.3.** Grafički prikaz trećeg plana pokusa.

Na temelju novog (trećeg) plana pokusa provedene su dvije serije mjerenja u svakoj točki i dobiveni su sljedeći rezultati (Tablica 4.10.). U tablici 4.11. prikazani su učinci parametara procesa, te njihovog međudjelovanja kao i granične vrijednosti greške za točke trećeg plana pokusa.

**Tablica 4.10.** Izračunate vrijednosti specifične aktivnosti enzima ADH po gramu kvasca i specifične aktivnosti po gramu proteina za točke trećeg plana pokusa.

|    | $A_{s,k}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,k}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,p}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,p}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| A1 | $7,10 \cdot 10^{-7}$              | $7,32 \cdot 10^{-7}$              | $2,19 \cdot 10^{-6}$              | $2,58 \cdot 10^{-6}$              |
| A2 | $2,00 \cdot 10^{-7}$              | $2,92 \cdot 10^{-7}$              | $7,01 \cdot 10^{-7}$              | $1,00 \cdot 10^{-6}$              |
| A3 | $4,56 \cdot 10^{-7}$              | $8,31 \cdot 10^{-7}$              | $1,74 \cdot 10^{-6}$              | $3,18 \cdot 10^{-7}$              |
| A4 | $1,93 \cdot 10^{-6}$              | $2,00 \cdot 10^{-6}$              | $6,37 \cdot 10^{-6}$              | $7,66 \cdot 10^{-6}$              |
| A5 | $7,53 \cdot 10^{-7}$              | $7,90 \cdot 10^{-7}$              | $2,98 \cdot 10^{-6}$              | $3,10 \cdot 10^{-6}$              |

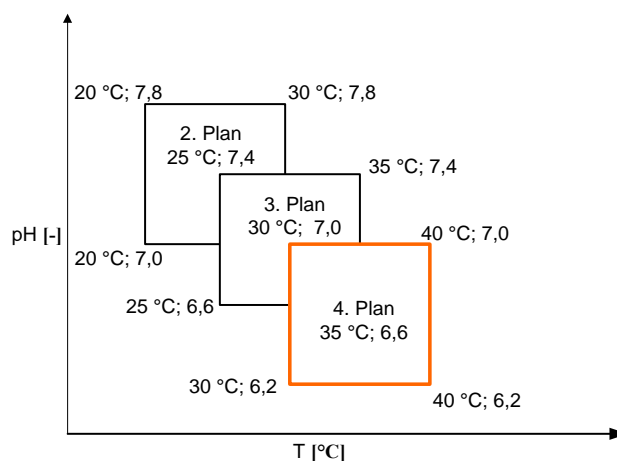
**Tablica 4.11.** Učinak parametara procesa na specifičnu aktivnost enzima ADH procijenjen EVOP metodom za treći plan pokusa.

|   |                      |
|---|----------------------|
| <b>Učinak <math>T</math></b>              | $0,0236 \pm 0,0043$  |
| <b>Učinak pH</b>                          | $-0,0117 \pm 0,0043$ |
| <b>Međudjelovanje <math>T</math> i pH</b> | $-0,0281 \pm 0,0043$ |
| <b>Razlika u sredini</b>                  | $-0,0046 \pm 0,0043$ |
| <b>Standardna devijacija</b>              | $-0,00345$           |

Kao i kod analize rezultata drugog plana pokusa opažen je pozitivan učinak temperature i negativan učinak pH te je kreiran četvrti plan pokusa sa centralnom točkom, temperatura 35°C i pH 6,6. Zadržan je isti korak za svaki od analiziranih parametara procesa, te su njihove vrijednosti bile za višu razinu: temperatura 40 °C, pH 7,0 i za nižu razinu temperatura 30 °C i pH 6,2 (Tablica 4.12.). Pokazalo se da je dobiveno međudjelovanje ova dva parametra prema analizi rezultata EVOP metodom značajno, ali ona nije uzeto u daljnja razmatranja. Grafički prikaz četvrtog plana pokusa sa prikazanim trendom promjene pojedinih parametara procesa prikazan je na slici 4.4.

**Tablica 4.12.** Četvrti plan pokusa.

|           | $T$<br>[°C] | pH<br>[-] |
|-----------|-------------|-----------|
| <b>A1</b> | 35          | 6,6       |
| <b>A2</b> | 30          | 6,2       |
| <b>A3</b> | 40          | 7,0       |
| <b>A4</b> | 40          | 6,2       |
| <b>A5</b> | 30          | 7,0       |



Slika 4.4. Grafički prikaz četvrtog plana pokusa.

Tablica 4.13. Izračunate vrijednosti specifične aktivnosti enzima ADH po gramu kvasca i specifične aktivnosti po gramu proteina za točke četvrtog plana pokusa.

|    | $A_{s,k}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,k}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,p}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,p}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| A1 | 1,73*10 <sup>-6</sup>             | 1,57*10 <sup>-6</sup>             | 6,05*10 <sup>-6</sup>             | 5,51*10 <sup>-6</sup>             |
| A2 | 7,23*10 <sup>-7</sup>             | 1,26*10 <sup>-6</sup>             | 2,51*10 <sup>-6</sup>             | 4,43*10 <sup>-6</sup>             |
| A3 | 2,99*10 <sup>-6</sup>             | 2,34*10 <sup>-6</sup>             | 1,14*10 <sup>-5</sup>             | 8,90*10 <sup>-6</sup>             |
| A4 | 1,96*10 <sup>-6</sup>             | 2,04*10 <sup>-6</sup>             | 6,45*10 <sup>-6</sup>             | 7,77*10 <sup>-6</sup>             |
| A5 | 2,59*10 <sup>-6</sup>             | 1,63*10 <sup>-6</sup>             | 9,74*10 <sup>-6</sup>             | 6,35*10 <sup>-6</sup>             |

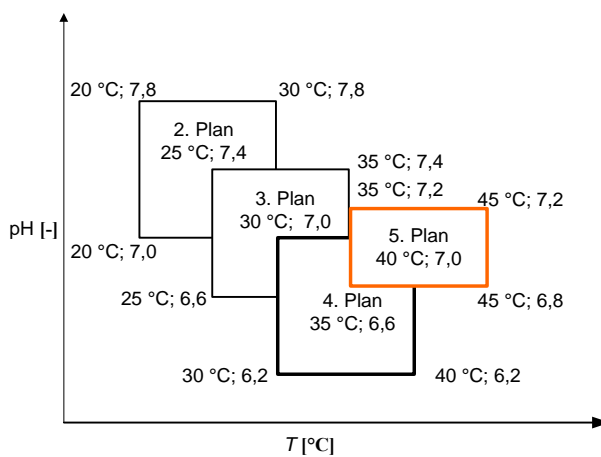
Tablica 4.14. Učinak parametara procesa na specifičnu aktivnost enzima ADH procjenjene EVOP metodom za četvrti plan pokusa.

|                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| Učinak $T$              | 0,0233 ± 0,0040  |
| Učinak pH               | 0,0269 ± 0,0040  |
| Međudjelovanje $T$ i pH | -0,0068 ± 0,0040 |
| Razlika u sredini       | 0,00713 ± 0,0040 |
| Standardna devijacija   | 0,0028           |

Tablica 4.15. Peti plan pokusa.

|    | $T$<br>[°C] | pH<br>[-] |
|----|-------------|-----------|
| A1 | 40          | 7,0       |
| A2 | 35          | 6,8       |
| A3 | 45          | 7,2       |
| A4 | 45          | 6,8       |
| A5 | 35          | 7,2       |

Izračunate vrijednosti specifične aktivnosti enzima ADH za točke četvrtog plana pokusa prikazane su u tablici 4.13., a proračun učinaka EVOP metodom u tablici 4.14. Vidljivo je da su i učinak temperature i učinak pH pozitivni. U prethodnom, trećem planu pokusa učinak pH je bio negativan, a zadržana je, između trećeg i četvrtog plana pokusa, ista vrijednost koraka. Stoga je novi plan pokusa kreiran uz smanjenje koraka za pH. Centralna točka petog plana pokusa bila je temperatura 40 °C i pH 7,0. Vrijednost parametara procesa na višoj razini bili su: temperatura 45 °C i pH 7,2, a na nižoj razini temperatura 35 °C i pH 6,8. Grafički prikaz petog plana pokusa sa prikazanim trendom promjene temperature i pH kroz drugi, treći, četvrti i peti plan pokusa dan je na slici 4.5.



Slika 4.5. Grafički prikaz petog plana pokusa.

Tablica 4.16. Izračunate vrijednosti specifična aktivnosti enzima ADH po gramu kvasca i specifične aktivnosti po gramu proteina za točke petog plana pokusa.



|    | $A_{s,k}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,k}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,p}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] | $A_{s,p}$<br>[U g <sup>-1</sup> ] |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| A1 | 2,99*10 <sup>-6</sup>             | 2,34*10 <sup>-6</sup>             | 1,14*10 <sup>-5</sup>             | 8,92*10 <sup>-6</sup>             |
| A2 | 2,01*10 <sup>-6</sup>             | 1,73*10 <sup>-6</sup>             | 6,97*10 <sup>-6</sup>             | 6,01*10 <sup>-6</sup>             |
| A3 | 1,91*10 <sup>-6</sup>             | 2,36*10 <sup>-6</sup>             | 6,32*10 <sup>-6</sup>             | 9,01*10 <sup>-6</sup>             |
| A4 | 2,85*10 <sup>-6</sup>             | 2,13*10 <sup>-6</sup>             | 1,00*10 <sup>-5</sup>             | 9,54*10 <sup>-6</sup>             |
| A5 | 2,54*10 <sup>-6</sup>             | 2,68*10 <sup>-6</sup>             | 9,56*10 <sup>-6</sup>             | 1,04*10 <sup>-5</sup>             |

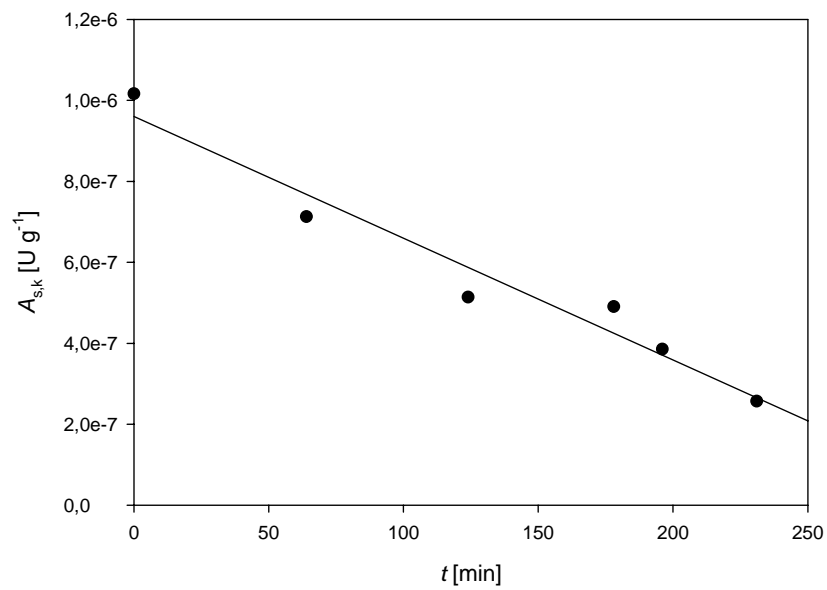
**Tablica 4.17.** Učinak parametara procesa na specifičnu aktivnost enzima ADH procjenjene EVOP metodom za točke petog plana pokusa.

|                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| Učinak $T$              | 0,0043 ± 0,0039  |
| Učinak pH               | 0,0036 ± 0,0039  |
| Međudjelovanje $T$ i pH | -0,0190 ± 0,0039 |
| Razlika u sredini       | -0,0083 ± 0,0039 |
| Standardna devijacija   | 0,0028           |

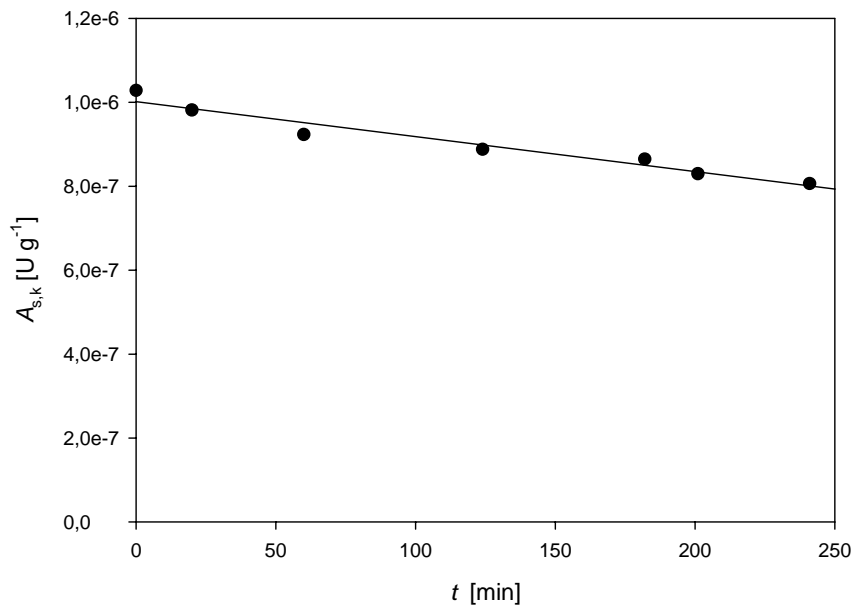
U tablici 4.16. prikazane su izračunate vrijednosti specifične aktivnosti enzima ADH u točkama petog plana pokusa, a u tablici 4.17. proračun učinaka parametara procesa na specifičnu aktivnost enzima ADH EVOP metodom za točke petog plana pokusa. Vidljivo je da su i učinak temperature i učinak pH pozitivni, ali manji od granice greške. Nadalje, razlika u sredini je negativna i značajno veća od granice greške što upućuje na zaključak, a u skladu s lingvističkim pravilima odlučivanja EVOP metode da je optimum procesa postignut u centralnoj točki petog plana pokusa, odnosno pri temperaturi 40 °C i pH 7,0.

## 4.2. UTJECAJ TEMPERATURE NA AKTIVNOST ENZIMA ADH

Osim optimiranja uvjeta provedbe procesa razbijanja stanične stjenke pekarskog kvasca u homogenizatoru praćen je i utjecaj temperature na aktivnost enzima ADH. Analizirana je promjena specifične aktivnosti po gramu kvasca enzima ADH u staničnom ekstraktu dobivenom razbijanjem stanične stjenke pri pH 7,0 i različitim temperaturama, 25, 30, 35 i 40 °C (Slike 4.6. - 4.9.). Opaženo je smanjenje specifične aktivnosti enzima ADH pri temperaturama 25 i 30 °C te povećanje specifične aktivnosti na višim temperaturama, 35 i 40 °C.



**Slika 4.6.** Promjena specifične aktivnosti po gramu kvasca pri termostatiranju pekarskog kvasca na temperaturi 25 °C.



**Slika 4.7.** Promjena specifične aktivnosti po gramu kvasca pri termostatiranju pekarskog kvasca na temperaturi 30 °C.

Ovakav učinak temperature na promjenu specifične aktivnosti enzima ADH može se objasniti primjenom Arrheniusova izraza (jednadžba 4.1.):

$$A_S = A_\infty \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

gdje je:

$A_\infty$  - konstanta aktivacije,

$E_a$  - energija aktivacije,

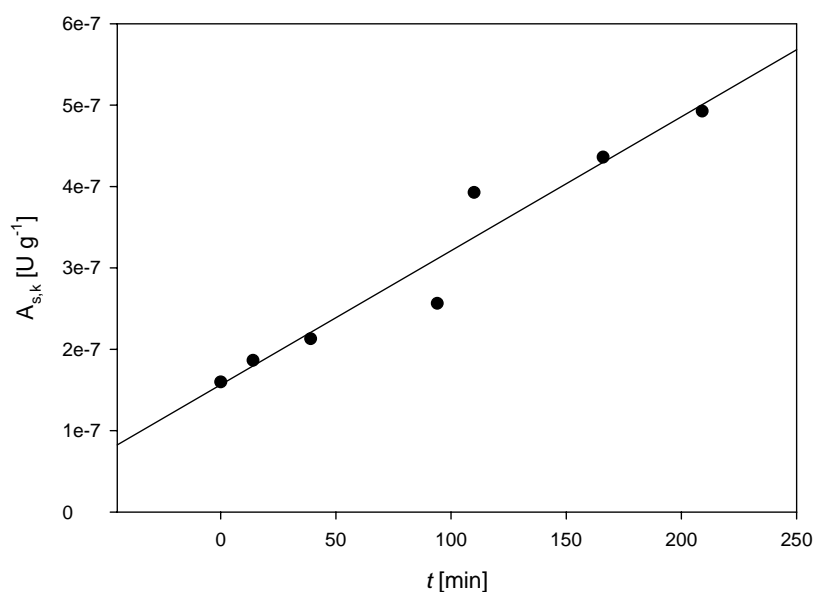
$R$  - opća plinska konstanta,

$T$  - termodinamička temperatura.

Pri nižim temperaturama (do 30 °C) negativan učinak reverzibilne i ireverzibilne deaktivacije enzima ADH koji su uvijek prisutni je značajniji u odnosu na povećanje specifične aktivnosti uzrokovano povećanjem temperature. Na temperaturama iznad 30 °C utjecaj deaktivacije u relativno kratkom vremenu provedbe procesa (četiri sata) je zanemariv u odnosu na pozitivan učinak povećanja temperature na specifičnu aktivnost enzima. Ovo je vidljivo i iz ovisnosti brzine deaktivacije i aktivacije o temperaturi (Tablica 4.18.).

**Tablica 4.18.** Ovisnost brzine deaktivacije i aktivacije o temperaturi.

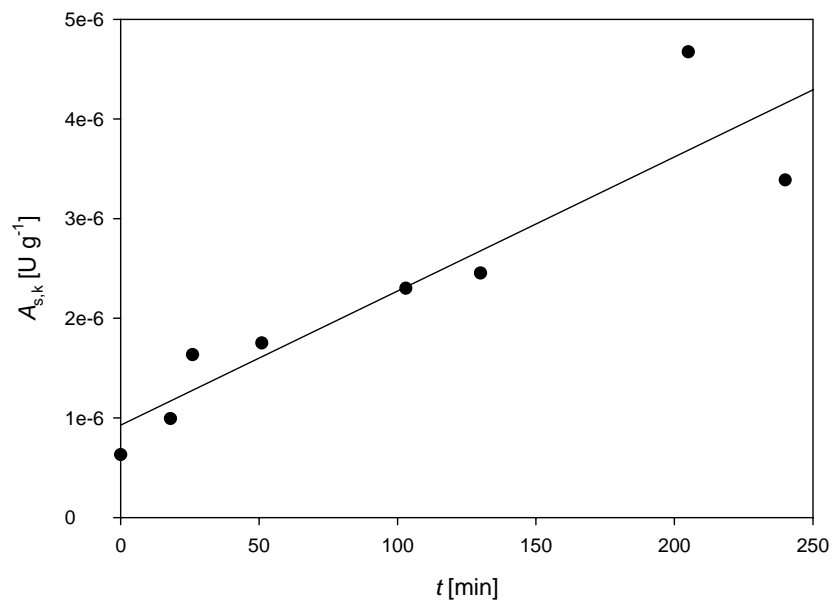
| $T$<br>[°C] | $k_D$<br>[U g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ] |
|-------------|---|
| 25          | +3*10 <sup>-9</sup>                             |
| 30          | +8*10 <sup>-10</sup>                            |
| 35          | -2*10 <sup>-9</sup>                             |
| 40          | -6*10 <sup>-9</sup>                             |



**Slika 4.8.** Promjena specifične aktivnosti po gramu kvasca pri termostatiranju pekarskog kvasca na temperaturi 35 °C.

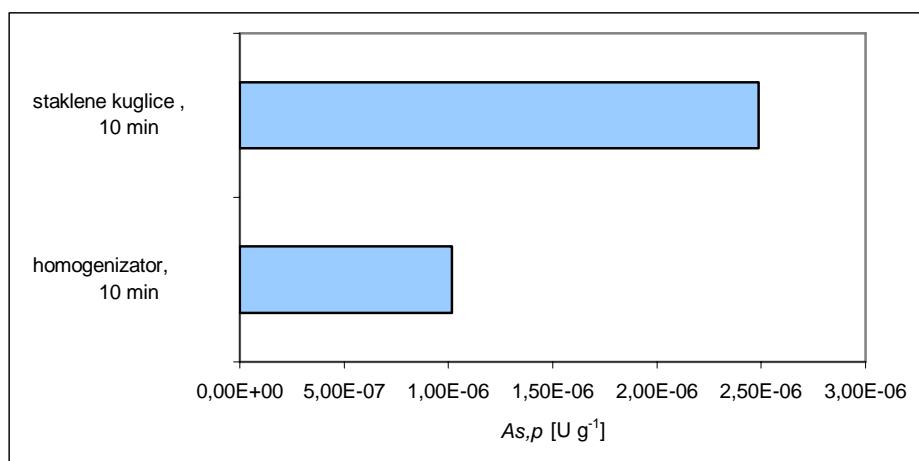
Naime, brzina deaktivacije enzima ADH smanjuje se povećanjem temperature (Slike 4.6. i 4.7.) dok se s druge strane brzina aktivacije enzima ADH povećava s porastom temperature (Slike 4.8. i 4.9.). Kako enzima ADH ne spada u termostabilne enzime daljnje povećanje temperature imalo bi za posljedicu značajno povećavanje udjela deaktiviranog (denaturiranog proteina) te bi pozitivan učinak temperature na specifičnu aktivnost enzima ADH bio sve manji<sup>18</sup>.

Opaženi utjecaj temperature na specifičnu aktivnost enzima ADH može se objasniti i promjenom strukture enzima, a samim tim i njegovih svojstava, primjerice specifične aktivnosti prema određenom supstratu. Naime, povećanjem temperature iznad određene kritične vrijednosti može doći do odmotavanja lanca proteina što ima za posljedicu lakše pristupanje supstrata katalitički aktivnom centru, a samim time i povećanju specifične aktivnosti enzima. Kao i u prethodnom slučaju konstatnim povećanjem temperature povećava se udio denaturiranih proteina pa pozitivni učinci promjene strukture proteina bivaju potisnuti nauštrb njegove denaturacije<sup>19</sup>

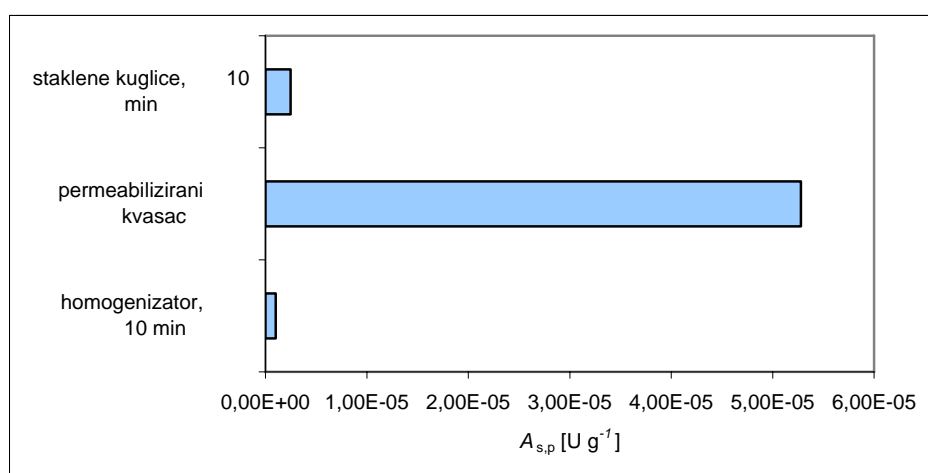


**Slika 4.9.** Promjena specifične aktivnosti po gramu kvasca pri termostatiranju pekarskog kvasca na temperaturi 40 °C.

### 4.3. OCJENA USPJEŠNOSTI PROCESA RAZBIJANJA STANIČNE STJENKE U HOMOGENIZATORU



**Slika 4.10.** Usporedba različitih metoda razbijanja stanične stjenke.



**Slika 4.11.** Usporedba različitih metoda razbijanja stanične stjenke i permeabilizacije.

U svrhu ocjenjene učinkovitosti procesa razbijanje stanične stjenke pekarskog kvasca u hoogenizatoru ista je uspoređena sa mljevenjem u kugličnom mlinu sa staklenim kuglicama. Vrijeme provedbe procesa bilo je jednako i iznosilo je 10 min. Vidljivo je da je učinkovitost procesa u slučaju mljevenja u kugličnom mlinu 2,5 puta veća (Slika 4.10.). Nadalje uspoređene su metode razbijanja stanične stjenke s permeabilizacijom. Specifična aktivnost enzima ADH dobivena u procesu permeabilizacije 50 puta je veća od one dobivene u procesu razbijanja stanične stjenke pekarskog kvasca u homogenizatoru (Slika 4.11.). Uzrok tome treba prije svega

tražiti u premalom broju okretaja noža homogenizatora ( $5000 \text{ min}^{-1}$ ) te u nekonstantnosti njegovog rada.

## **5. ZAKLJUČAK**

Obradom dobivenih rezultata primjenom faktorskog plana pokusa i EVOP metode eksperimentalnog traženja optimuma omogućeno je brzo pronalaženje optimalnih vrijednosti i parametara procesa izolacije enzima ADH iz stanica pekarskog kvasca mljevenjem u homogenizatoru. Optimalni uvjeti provedbe procesa se postižu pri temperaturi od 40 °C i pH pufera 7,0.

EVOP metoda je pokazala da kod razbijanja stanične stjenke homogenizatorom vrijeme mljevenja nema utjecaja na aktivnost enzima ADH te je u daljnjem razmatranju zanemareno.

Usporedbom različitih procesa razbijanja stanične stjenke, a na temelju specifične aktivnosti ADH po gramu proteina pokazala se veća učinkovitost mljevenja u kugličnom mlinu sa staklenim kuglicama.

Ukoliko se usporede specifične aktivnosti enzima ADH po gramu proteina vidljivo je da za istu koncentraciju kvasca permeabilizirane stanice kvasca imaju veću aktivnost od nepermeabiliziranih stanica nakon mljevenja u kugličnom mlinu i homogenizatoru ( $A_{s,p \text{ permeab.}} = 0,0528 \text{ U mg}^{-1}$ ;  $A_{s,p \text{ nepermeab. (homogenizator)}} = 0,00102 \text{ U mg}^{-1}$ ;  $A_{s,p \text{ nepermeab. (staklene kuglice)}} = 0,00249 \text{ U mg}^{-1}$ ).

## 6. LITERATURA

1. **Findrik, Z.:** Biokatalitička oksidacija L-DOPE, Magistarski rad, Zagreb, 2004.



2. **Vrsalović-Presečki, A.:** Studij proces pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca, Magistarski rad, Zagreb, 2003.
3. **Beberjee, R; Bhattacharyya, B.C.:** Evolutionari operation (EVOP) to optimize protease biosynthesis by *Rhizopus oryzae*, *Bioprocess Engineering*, **8** (1992) 151-155.
4. **Barnett, E.B.:** Introduction to Evolutionary Operation, 500-503.
5. **Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A.:** Microbiology, *McGraw-Hill*, 2000, str. 161, 554, 1006.
6. **Zelić, B; Pavlović, N.; Delić, V.; Vasić-Rački, Đ.:** Optimization of pH and Temperature in the Process of Bioconversion of Glucose to 2,5-diketo-D-gluconic Acid, *Chem. Biochem. Eng.*, **16** (2002) 7-11.
7. **Zelić, B; Pavlović, N.; Vasić-Rački, Đ.:** Traženje optimalnih radnih uvjeta u procesu dekolorizacije otopine 2,5-diketo-D-glukonske kiseline EVOP metodom, *Kem. Ind.*, **46**, (1997) 233-243.
8. **Boas, A.H.:** What Optimization Is All About, *Chem. Eng.*, (1962) 147-152.
9. **Beberjee, R; Bhattacharyya, B.C.:** Evolutionary Operation (EVOP) to Optimize Three-Dimensional Biological Experiments, *Biotechnology and Bioengineering*, **41** (1992) 67-71.
10. **Duraković, S.:** Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996, str. 231,232.
11. **Koehler, I.T.:** How Statistics Apply to Chemical Processes, *Chemical Engineering*, (1960) 142-152.
12. **Sekhar, S.; Bhat, N.; Bhat, S.G.:** Preparation of detergent permeabilized Bakers' yeast whole cell catalase, *Process Biochemistry*, **34** (1999) 349-350.
13. **Vasić-Rački, Đ.:** Biokemijsko inženjerstvo, *Kem. Ind.*, **39** (1990) 459-467.
14. **Vasić-Rački, Đ.; Wandrey C.:** Ultrafiltracija i biokatalizatori, Zbornik: Seperacijski procesi v heterogenih sistemih, Maribor, 1992, 82-93.
15. **Sikyta, B.:** Methods in industrial microbiology, *Ellis Horward Limited*, Sussex, 1983.
16. **Andreasen, A.A.; Stier, T.J.B.:** Anaerobic Nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*: II. Unsaturated Fatty Acid Requirement for Growth in a Defined Medium, *J. Cell Comp. Physiol.*, **41** (1954) 271-281.

17. **Loughlin W.A.:** Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technol* **74** (2000) 49.
18. **Boy, M., Dominik, A., Voss, H.:** Fast in-situ characterisation of biocatalysts long-term stability. U: Ballesteros A., Plou, F.J., Iborra, J.L., Halling, P.J.: Stability and stabilization of biocatalysts. *Progres in Biotechnology*, Volume 15, Elsevier, Amsterdam, 1998, pp 35-40.
19. **Tinoco, I., Sauer, K., Wang, J.C.:** Physical chemistry: Principles and applications in biological sciences. Prentice-Hall Inc. New Yersey, 1978.

## **7. POPIS SIMBOLA**

### **7.1. Simboli**

---

|                       |   |
|-----------------------|---|
| $A_S$                 | specifična aktivnost enzima ADH [ $\text{U mg}^{-1}$ ]                |
| $A_V$                 | volumna aktivnost enzima ADH [ $\text{U cm}^{-3}$ ]                   |
| $ABS$                 | apsorbancija [-]  |
| $A_{s,k}$             | specifična aktivnost po gramu kvasca [ $\text{U g}^{-1}$ ]            |
| $A_{s,k}$             | specifična aktivnost po gramu proteina [ $\text{U g}^{-1}$ ]          |
| $A_\infty$            | konstanta aktivacije [-]  |
| $c_{BSA}$             | koncentracija proteina Bovine Serum Albumin [ $\text{g cm}^{-3}$ ]    |
| $c_k$                 | koncentracija kvasca [ $\text{g cm}^{-3}$ ]                           |
| $c_p$                 | koncentracija proteina [ $\text{g cm}^{-3}$ ]                         |
| $d$                   | promjer kivete [cm]   |
| $E_a$                 | energija aktivacije [ $\text{J mol}^{-1}$ ]                           |
| $n$                   | broj faktora [-]  |
| $p$                   | broje razine faktora [-]  |
| $R$                   | opća plinska konstanta [ $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ]          |
| $S$                   | broj pokusa [-]   |
| $t$                   | vrijeme [h]   |
| $T$                   | temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]                                    |
| $V_r$                 | volumen uzorka [ $\text{cm}^3$ ]                                      |
| $V_u$                 | ukupni volumen [ $\text{cm}^3$ ]                                      |
| $\Delta ABS/\Delta t$ | promjena apsorbancije u vremenu [ $\text{min}^{-1}$ ], (nagib pravca) |

### 7.1.1. Grčki simboli

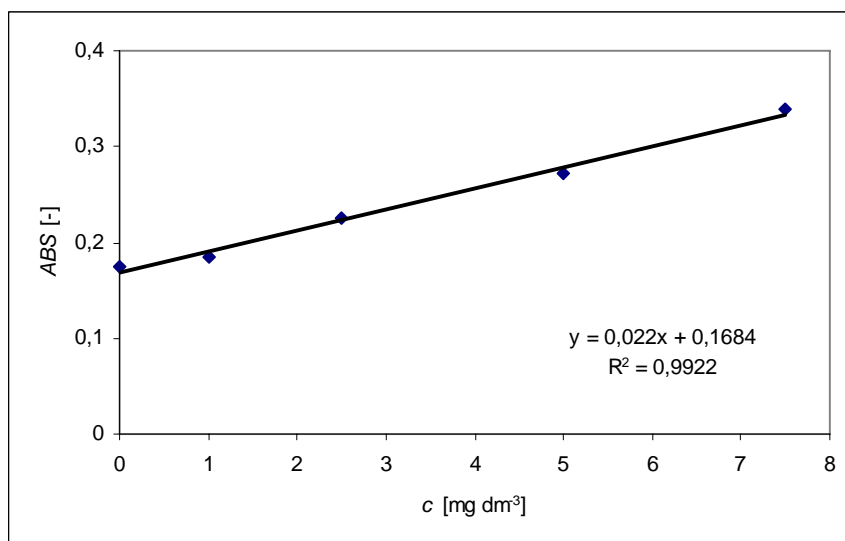
|                     |  |
|---------------------|--|
| $\lambda$           | valna duljina [nm]   |
| $\Delta$            | promjena   |
| $\varepsilon_{340}$ | ekstincijski koeficijent pri valnoj duljini od 340 nm [ $\text{cm}^2 \mu\text{m}^{-1}$ ] |

### 7.2. Skraćenice

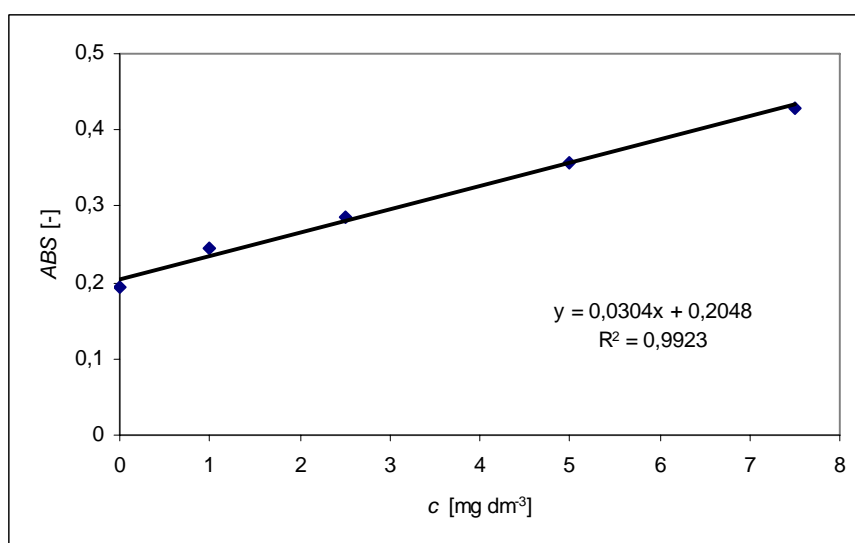
|      |                                    |
|------|------------------------------------|
| ADH  | alkohol dehidrogenaza              |
| CTAB | heksadeciltrimetil-amonijev bromid |

|                  |  |
|------------------|--|
| DNK              | deoksiribonukleinska kiselina                |
| EVOP             | evolucijska operacija                        |
| NAD <sup>+</sup> | nikotin adenin dinukleotid                   |
| NADH             | reducirani oblik nikotin adenin dinukleotida |

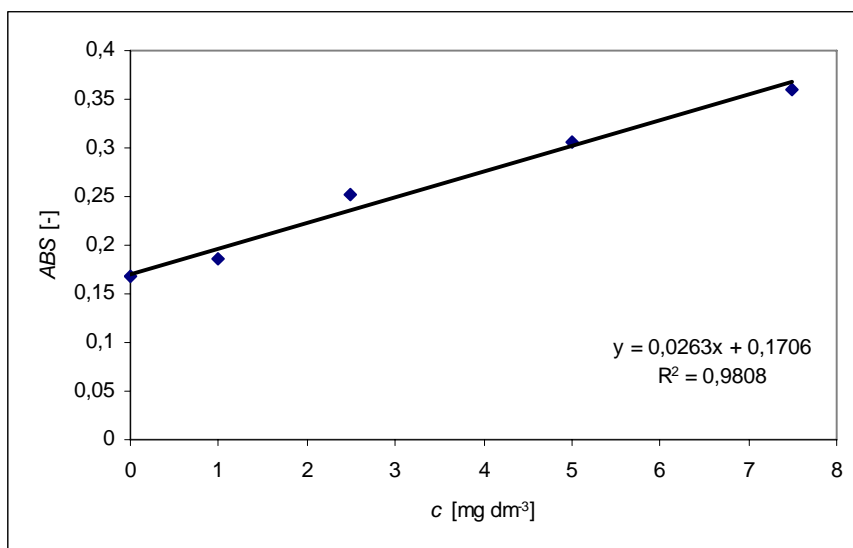
## **8. PRILOZI**



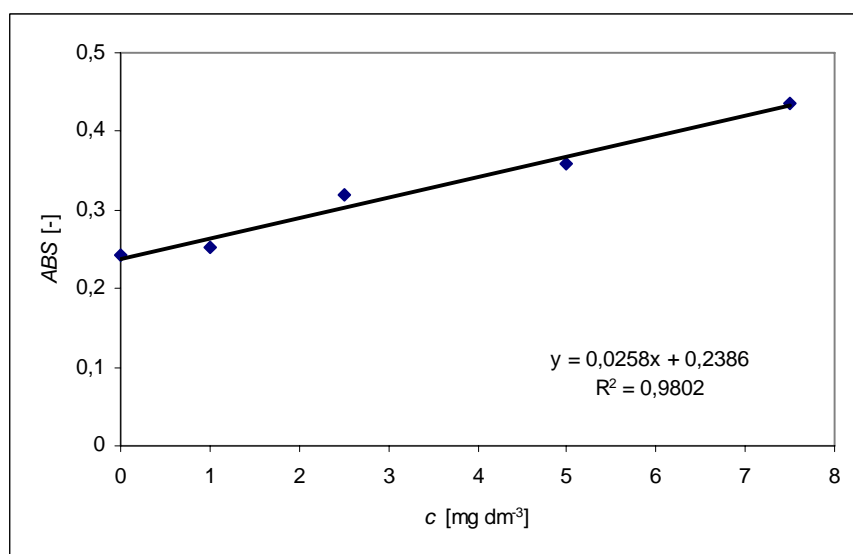
Slika 8.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina.



Slika 8.2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina.



Slika 8.3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina.



Slika 8.4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina.

## **ŽIVOTOPIS**

Judith Siveri je rođena 4. lipnja 1981. u Trebinju, BiH. Završila je Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Varaždinu. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu je upisala 2000. godine. Sudjelovala je sa znanstvenim radom na Prvom susretu studenata i nastavnika na temu: "Primjenjena biokataliza" u Mariboru. Tijekom studiranja je bila demonstrator na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu. 2006. godine završava Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.