

# Izolacija NADH oksidaze iz *Lactobacillus sanfranciscensis*

---

Josić, Elena

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:268345>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**ELENA JOSIĆ**

Izolacija NADH oksidaze iz *Lactobacillus sanfranciscensis*

**ZAVRŠNI RAD**

Voditeljica rada: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitne komisije:

izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.

izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2016.

## SAŽETAK

Oksidaze koje ovise o prisustvu nikotinamid koenzima su od sve većeg interesa prilikom pripreme kiralnih molekula, bilo redukcijom prokiralnih prekursora ili iz oksidativne racemične smjese. Regeneracija oksidiranog i reduciranog oblika nikotinamid kofaktora je od iznimne važnosti jer je upotreba kofaktora u stehiometrijskim količinama izrazito skupa, a nemoguće ga je sintetizirati ili zamijeniti nekim jeftinijim produktom. U ovom radu opisane su metode regeneracije koenzima. Iako svi rezultati pokazuju da su trenutno razvijene metode pogodne za regeneraciju koenzima, većina njih zahtjeva daljnju optimizaciju kako bi proces postao održiv. U ovom radu je posebna pažnja posvećena NADH oksidazi iz *Lactobacillus sanfranciscensis* kao biokatalizatoru za regeneraciju koenzima. Karakterizacijom NADH oksidaze iz *Lactobacillus sanfranciscensis* ustanovljeno je enzim najaktivniji između pH 7.0 i 8.5, da producira vodu kao nusprodukt, a specifična aktivnost pročišćenog enzima iznosi 221 U/mg (pri pH 7.0). U radu će biti riječi o uzgoju mikroorganizma za njegovu izolaciju, metodama pročišćavanja, kao i o karakterizaciji enzima.

## ABSTRACT

Oxidases which depend on nicotinamide coenzymes are of increasing interest for the preparation of chiral compounds, either by reduction of a prochiral precursor or by oxidative resolution of their racemate. The regeneration of oxidized and reduced nicotinamide cofactors is a crucial step because the use of these cofactors in stoichiometric amounts is too expensive for application and cannot be replaced by some cheaper compounds. This work describes the methods of cofactor regeneration. Although results indicate that those methods are suitable for the regeneration procedure, most of the processes need additional optimization to make them sustainable. In this work special attention is given to NADH oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* as a biocatalyst for cofactor regeneration. The characterization of NADH oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* has shown that the enzyme is the most active between pH 7.0 and 8.5. The specific activity of the purified enzyme is 221 U/mg (pH 7.0). This paper addresses the cultivation of the microorganism required for its isolation, enzyme purification methods, as well as the characterization of the enzyme.

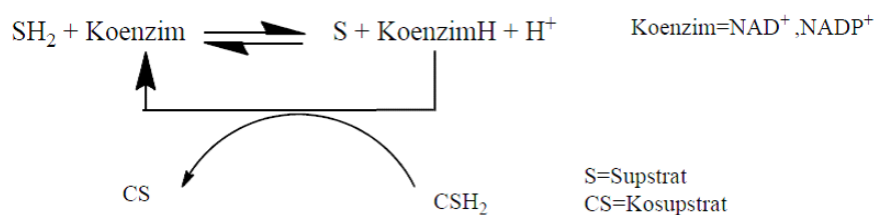
# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Biokatalizatori</i> .....	3
2.1.1 Koenzimi .....	4
2.2 <i>Regeneracija koenzima</i> .....	4
2.2.1 Enzimatska regeneracija.....	5
2.2.2 Elektrokemijska regeneracija koenzima .....	8
2.2.3 Fotokemijska regeneracija kofaktora .....	9
2.2.4 Kemijska regeneracija kofaktora .....	9
2.3 <i>NADH oksidaza</i> .....	10
<b>3. PREGLEDNI DIO .....</b>	<b>11</b>
3.1 <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> .....	11
3.1.1 Opis i značajke .....	11
3.1.2 Metabolizam i proizvodnja kiselog tijesta .....	11
3.2 <i>Karakterizacija NADH oksidaze iz L. sanfranciscensis</i> .....	12
3.3 <i>Soj, medij i uvjeti rasta mikroorganizma L. sanfranciscensis</i> .....	13
3.4 <i>Utjecaj aeracije u MRS-mediju različitih koncentracija fruktoze na rast L. sanfranciscensis te njegovog mutanta</i> .....	15
3.5 <i>Utjecaj koncentracije fruktoze na rast L. sanfranciscensis u aeriranom mediju</i> .....	16
3.6 <i>Inhibicija rasta mikroorganizma L.sanfranciscensis dodatkom oksidansa</i> .....	16
3.7 <i>Tolerancija kisika mikroorganizma L. sanfranciscensis</i> .....	17
3.8 <i>Dokazivanje produkta reakcije katalizirane NADH oksidazom iz L. sanfranciscensis i ubačene u E.coli</i> 18	
3.9 <i>Pročišćavanje NADH oksidaze iz L. sanfranciscensis</i> .....	19
3.9.1 Određivanje aktivnosti NADH oksidaze.....	21
3.10 <i>Kinetika reakcije s NADH oksidazom</i> .....	22
3.11 <i>Aktivnost enzima NADH oksidaze u ovisnosti o pH vrijednosti</i> .....	23
<b>4. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>24</b>
<b>5. LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
<b>6. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>28</b>

## 1. UVOD

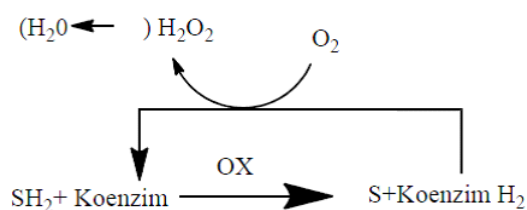
Upotreba biokatalizatora za preparativne svrhe je predmet istraživanja diljem svijeta [41]. Otkriven je velik broj industrijskih procesa u kojima su biokatalizatori upotrijebljeni kao cijele stanice mikroorganizama ili kao pročišćeni enzimi [17,25,41,44]. Iako je upotreba cijelih stanica kao biokatalizatora istraživana od 1950., izolacija enzima zahtijeva skupe i dugotrajne laboratorijske postupke. Većina komercijalno istraženih biološki kataliziranih reakcija kojim nastaju vrijedni produkti su hidrolitičke reakcije. Enzimi koji pripadaju klasi hidrolaza, transferaza, izomeraza i liaza ne zahtijevaju kofaktor za svoju specifičnu aktivnost ili je on čvrsto vezan kao ion metala ili koenzim. Oksidoreduktaze, koje kataliziraju oksidacijske i redukcijske reakcije zajedno s ligazama koje kataliziraju stvaranje ili cijepanje kompleksnih spojeva, zahtijevaju takozvane "slobodne koenzime", koji se ponašaju kao transportni metaboliti vodika, kisika, elektrona, atoma/molekula između paralelnih reakcija. Oksidaze koje ovise o prisustvu nikotinamid koenzima su od sve većeg interesa prilikom pripreme kiralnih molekula, bilo redukcijom prokiralnih prekursora ili iz oksidativne racemične smjese. Regeneracija oksidativnih i reduciranih nikotinamid kofaktora je od iznimne važnosti jer je upotreba kofaktora u stehiometrijskim količinama izrazito skupa [24]. Oksidacije katalizirane oksidazama i dehidrogenazama iz bakterija su najstariji procesi u mikrobiologiji. Proizvodnja octa datira još od 2000 godina prije Krista i bazira se na oksidaciji etanola kataliziranog dehidrogenazom iz octenih bakterija. Pasteur je istražio pretvorbu etanola u octenu kiselinu iz mikrobne suspenzije, a Brown je izolirao *Bacterium xylinum* iz "octenog cvijeta" koja oksidira propanol u propionsku kiselinu te manitol u fruktozu. Selektivna oksidacija katalizirana dehidrogenazom (DH) i oksidazom (OX) predstavlja alternativu uobičajenim sintetičkim metodama. Premda postoje brojni oksidativni katalizatori, njihova upotreba često je limitirana zbog ekoloških razloga te zamijenjena biološkim katalizama koje su visoko regio- i stereoselektivne. Dehidrogenaze i oksidaze široko su raširene među živim organizmima. Dok su dehidrogenaze sveprisutne i mogu se naći u aerobnim i anaerobnim mikroorganizmima, oksidaze nisu striktno prisutne u anaerobnim vrstama. Obje mogu oksidirati organske supstrate dehidrogenacijom putem ionskih mehanizama uključujući vodik i transfer protona iz supstrata u enzime/koenzime. Koenzimi moraju biti reoksidirani kako bi se omogućila nova oksidacija, a način na koji se ova reoksidacija događa razlikuje dvije vrste enzima: 1) dehidrogenaze koriste druge organske

supstrate u oksidiranom obliku koji djeluje kao primatelj elektrona (SLIKA 1), 2) oksidaze koriste  $O_2$  koji je reduciran u (toksični)  $H_2O_2$  (SLIKA 2).



SLIKA 1. Djelovanje dehidrogenaza; uključujući koenzim i sistem za regeneraciju

Funkcionalne grupe uključene u te oksidacije su uglavnom hidroksidi primarnih i sekundarnih alkohola, karbonili aldehida, zasićene C-C veze, C-N veze aminokiselina, amini i nitroalkani te tioli. Upotreba izolirane dehidrogenaze i oksidaze nudi prednosti u pogledu selektivnosti u usporedbi sa korištenjem cijelih stanica. Mikrobiološko znanje nije potrebno, a reakcije mogu biti izvršene u bilo kojem laboratoriju organske kemije [42].

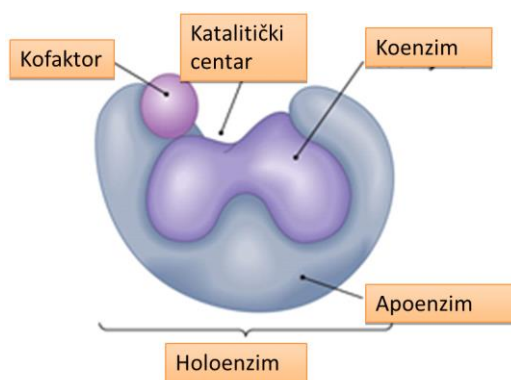


SLIKA 2. Djelovanje oksidaze

## 2. OPĆI DIO

### 2.1 Biokatalizatori

Enzimi su katalizatori biološkog porijekla koloidne prirode. Po kemijskoj strukturi su proteini (polipeptidi nastali spajanjem velikog broja aminokiselina preko amidnih, peptidnih veza) koji omogućuju tok i odvijanje biokemijskih procesa u organizmu (disanje, pretvorbu i prenošenje energije između živih sustava, sinteza različitih makromolekula i staničnih komponenata).



SLIKA 3. Struktura enzima

Mnogi enzimi su isključivo proteini i nazivaju se jednostavni enzimi, dok se enzimi koji sadrže neproteinske skupine nazivaju konjugirani enzimi. Proteinski se dio naziva apoenzim, a neproteinski dio kofaktor (koenzim). Apoenzim i kofaktor zajedno tvore potpun enzim-holoenzim (SLIKA 3). Kad je kofaktor metalni ion, primjerice Mg, Zn, Fe, Cu, govori se o aktivatoru. Kad je kofaktor mala organska molekula koja se lagano odstranjuje naziva se koenzim [18]. Enzimi djeluju vrlo specifično, povećavaju brzinu reakcije i kataliziraju reakcije u oba smjera pa se biokemijske reakcije, za koje bi u kemijskom laboratoriju trebali sati ili dani, odvijaju trenutno i kvantitativno. Enzimi za razliku od kemijskih katalizatora ne zahtijevaju primjenu ekstremnih reakcijskih uvjeta (pH, temperatura, tlak), djeluju pri niskim koncentracijama, dobivaju se iz obnovljivih izvora, biorazgradivi su i kompleksne reakcije provode u jednom stupnju. Enzimske reakcije se ubrzavaju s povišenjem temperature, ali samo do određene vrijednosti, jer pri višim temperaturama počinje denaturacija proteinskog dijela enzima [6].



### 2.1.1 Koenzimi

Poznato je da određeni enzimi za svoju aktivnost zahtijevaju koenzime. Koenzim su neproteinske građe, odnosno mogu biti male organske molekule, metalni ioni ili neka druga jednostavna molekula. Važni su jer svojim vezanjem za apoenzim mijenjaju njegovu konformaciju te tako nastaje katalitički aktivan enzim, odnosno holoenzim. Koenzim se može nalaziti na aktivnom mjestu enzima te je zbog toga esencijalan za katalitičku aktivnost. Nalazi li se pokraj aktivnog mjesta ili nešto udaljenije, bitno je da svojim vezanjem uzrokuje promjenu konformacije proteinskog dijela enzima, a samim time pretvara 'neaktivno' mjesto enzima u aktivno. S obzirom na način povezivanja s enzimom, koenzime dijelimo na prostetske skupine (još se zovu i aktivne grupe) i kosupstrate (koenzimi u užem smislu). Najvažniji koenzimi su AMP/ADP/ATP,  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  te  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ .

$\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  i  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  sudjeluju u reakcijama oksidacije i redukcije koje se primjenjuju u mnogim poljima, ponajviše prilikom dobivanja brojnih vrijednih kiralnih spojeva kao što su hidroksi-kiseline [31], aminokiseline [4,37], steroidi [1] i alkoholi [3,11,32,36,37] iz prokiralnih prekursora. Dehidrogenaze su ovisne o prisutnosti  $\text{NAD(P)}^+$  ili  $\text{NAD(P)H}$  u reakcijskom sistemu. S obzirom da su koenzimi skupi, osobito  $\text{NAD(P)H}$ , ne dodaju se u stehiometrijskim količinama. Zbog toga je istraženo i razvijeno velik broj *in situ* metoda za njihovu regeneraciju. Učinkovit i ekonomičan regeneracijski sustav kofaktora neophodan je za sintezu biološki aktivnih spojeva jer je kofaktor  $\text{NADP(H)}$  kompleksan i nestabilan [6]. Vrijednost dobivena za enzim iz *L. sanfranciscensis* ispod je detekcijskog limita, što ukazuje na gubitak peroksida koji se formira tijekom reakcije s  $\text{NADH}$  oksidazom.

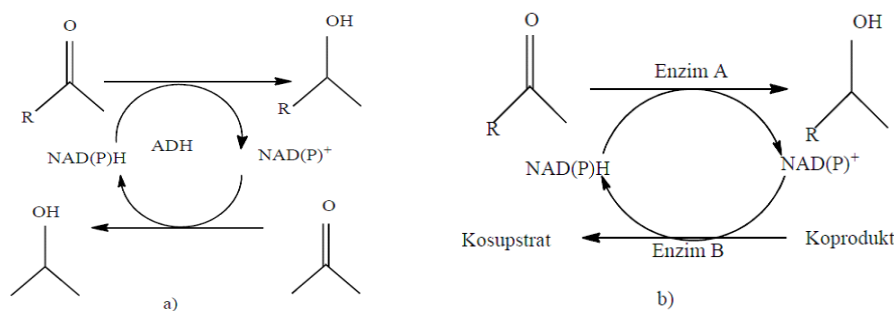
## 2.2 Regeneracija koenzima

Regeneracija  $\text{NAD}^+$  od iznimne je važnosti prilikom reakcija oksidacije koje se koriste u preparativne svrhe [23]. S ciljem smanjenja troškova stereoselektivnih enzimatskih transformacija, regeneracija kofaktora pojednostavljuje i izolaciju produkta, smanjuje problem inhibicije te termodinamički nepovoljne reakcije vodi prema povoljnim regeneracijskim reakcijama [44]. Dostupno je nekoliko metoda u te svrhe: biološke, enzimatske, elektrokemijske, kemijske i fotokemijske. Enzimatska regeneracija predstavlja

najjednostavniji pristup regeneraciji prilikom koje se dodaje drugi enzim u reakcijski sustav[46]. Primjer ove metode za regeneraciju  $\text{NAD}^+$  je upotreba NADH oksidaze, enzima koje je od nedavno postao komercijalno dostupan, međutim po iznimno visokoj cijeni. Alternativna metoda regeneracije  $\text{NAD}^+$  uključuje dodatak enzima koji zahtijevaju prisustvo kofaktora. Primjer su glutamat dehidrogenaza i laktat dehidrogenaza. Kofaktor može uzrokovati dodatne neželjene reakcije, npr. inhibirati enzim, stoga se NADH oksidaza nameće kao najbolje rješenje za regeneraciju  $\text{NAD}^+$  iako njegova stabilnost u nekim slučajevima predstavlja problem [21].

## 2.2.1 Enzimatska regeneracija

Enzimatska regeneracija nikotinamid kofaktora najbolje je istražena i najpogodnija metoda jer dokazuje visoku selektivnost s obzirom na aktivnu formu kofaktora. Od drugih prednosti može se izdvojiti kompatibilnost s reagensima i lako praćenje. Postoje dva principa enzimatske regeneracije nikotinamid kofaktora (SLIKA 4). Prvi pristup zahtijeva prisustvo drugog enzima i drugog supstrata za provođenje regeneracije dok je u drugoj metodi jedan enzim odgovoran za formiranje željenog produkta i za regeneraciju [24].



SLIKA 4. a) Regeneracija dodatkom drugog supstrata; b) Regeneracija dodatkom drugog enzima

### 2.2.1.1 Regeneracija kofaktora pomoću cijelih stanica

Cijele stanice pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korištene su kao regeneracijski sustav kofaktora u industrijskim procesima redukcije ketona [19]. Niska produktivnost, potreba za velikom količinom stanica, jako razrjeđenje otopina, spor oporavak produkta iz reakcijskog medija te niska optička aktivnost zahtijevale su pronalazak novog

soja. Teže je konstruirati proces s cijelim stanicama enzima koji zahtjeva kofaktor kada regeneracija kofaktora mora pratiti biokonverziju, stoga se ovaj proces upotrebljava kada za enzimatsku aktivnost nije potrebna regeneraciju kofaktora. Genetički inženjeri upotrebom heterolognih enzimatskih sustava uspjeli su postići željeni nivo regeneracije. Posebni tipovi stanica sadrže više enzima koji provode istu reakciju, no nažalost u mnogim slučajevima taj enzim proizvodi nusprodukte koji uzrokuju suprotan stereokemijski ishod reakcije. Iz navedenog razloga takvi se enzimi ne mogu upotrijebiti za sintezu enantiomernih produkata. Da bi se povećala stereoselektivnost reakcije s cijelim stanicama, potrebne su tehnike rekombinacije DNA. Česta je ekstracelularna ekspresija enzima koji katalizira zasebnu reakciju u soju kao što je *E. coli*. Visko je učinkovita i simultana ekspresija enzima koji katalizira regeneraciju kofaktora. Rast stanice mora istovremeno osigurati enzim za traženu reakciju, kao i za regeneraciju kofaktora, a takve tzv. "dizajnirane stanice" obećavajuće su za tehničku primjenu. Postoji više opcija za provođenje biotransformacija pomoću cijelih stanica. Svaki enzim može se producirati iz različitog soja, međutim nedostaci ove metode su problemi prilikom difuzije supstrata kroz membranu stanica [24]. Alternativno je moguća i ekspresija u jednom soju [46].

### **2.2.1.2 Regeneracija kofaktora uz izolirane enzime kao biokatalizatore**

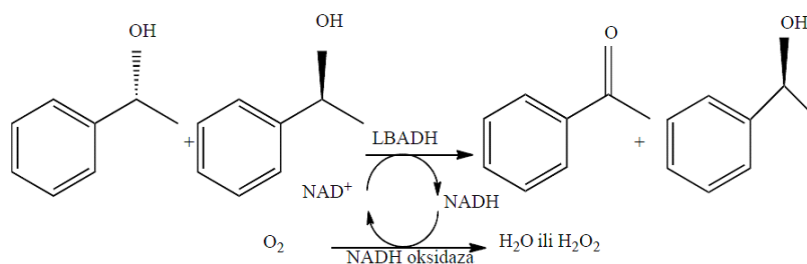
Proces kataliziran izoliranim enzimima rezultira većom volumnom produktivnosti u usporedbi s procesima koji uključuju cijele stanice. Aparatura i izolacija produkta iz reakcijskog medija su jednostavniji, a produkt biokatalize ne utječe na rast mikroorganizma. U takvim sustavima moguća je optimizacija pojedinačnog procesa, što predstavlja prednost u odnosu na regeneraciju pomoću cijelih stanica. S obzirom da se uvjeti nužni za rast stanice i proizvodnju enzima u stanici uvelike razlikuju od reakcijskih uvjeta biotransformacija, ovakvi procesi su najčešće primijenjeni kod hidrolitičkih reakcija. Upotreba oksidoreduktaza (dehidrogenaza i oksidaza), ovisnih o koenzimima NADP(H), u izoliranom obliku je ekonomična samo ako se pronađe prikladan sustav regeneracije koenzima. Reakcije koje zahtijevaju koenzime najčešće su neekonomične zbog cijene kofaktora koji se može reducirati ako se postigne dovoljno visok *Total Turnover Number (TTN)* [26]. *TTN* je definiran kao omjer mola sintetiziranog produkta ( $n_p$ ) i mola konzumiranog kofaktora  $n_{\text{NAD(H)}}$  (jed 1).

$$TTN = n_p / n_{NAD(H)} \quad (1)$$

$TTN$  raste postepeno prilikom smanjenja koncentracije kofaktora na uštrb volumne produktivnosti. Trenutno najviši  $TTN$  u iznosu od 600,000 postignut je tijekom dobivanja L-fenilalanina pomoću L-fenilalanin dehidrogenaze s polimerom NADH u membranskom reaktoru koristeći formijat dehidrogenazu [42].

### 2.2.1.3 Regeneracija kofaktora uz dodatak drugog enzima, tzv. “coupled enzyme approach“

Problem pri regeneraciji kofaktora može alternativno bit riješen uz tzv. “coupled enzyme approach“. Prednost ove metode je smanjenje velikih količina kosupstrata potrebnih za uspostavljanje ravnoteže upotrebom drugog enzima ovisnom o istom koenzimu. Glavni nedostaci ove metode odnose se na troškove drugog enzima koji mora imati slične optimalne uvjete (pH, temperaturu) kao i onaj zadužen za željenu reakciju. Ova metoda najčešće je upotrebljavana za regeneraciju  $NAD(P)^+$  pomoću ADH iz kvasca (YADH - yeast alcohol dehydrogenase) te glutamat dehidrogenaze (GluDH) [40]. U iste se svrhe može koristiti i oksidaza čiji je kapacitet redukcije  $O_2$  veoma atraktivan zbog lakoće i niske cijene te nastanka vode umjesto  $H_2O_2$  koji je neželjeni zbog stabilnosti mnogih enzima, supstrata i produkata. NADH oksidaza iz *Lactobacillus sanfranciscensis* koja ima mogućnost regeneracije  $NADP^+$  i  $NAD^+$ , a njena je aktivnost u reaktoru već kombinirana s (*R*)-ADH iz *L. brevis* za dobivanje acetofenona (SLIKA 5) i (*S*)-feniletanola iz racemičnog (*RS*)-feniletanola [22]. Upotreba drugog enzima omogućava veći izbor supstrata za regeneraciju, što olakšava postizanje velike termodinamičke pokretačke sile za obje reakcije [30].



SLIKA 5. Regeneraciju kofaktora dodatkom drugog enzima

Sa stajališta enzimatskih organskih sinteza, NADH oksidaza (NOX) ključni je enzim koji igra osnovnu ulogu u regeneraciji  $\text{NAD}^+$  tijekom oksidacije racemičnih sekundarnih alkohola [24,35] i aminokiselina [26]. Korištenje prirodnog i jeftinog oksidacijskog sredstva kao što je  $\text{O}_2$  ima veliki značaj tijekom oksidacije racemičnih alkohola [14].

## 2.2.2 Elektrokemijska regeneracija koenzima

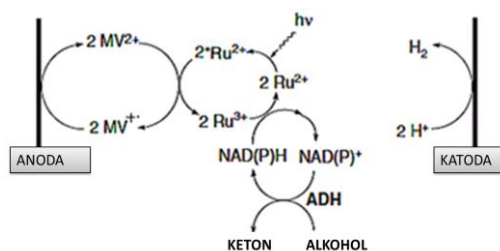
Osim enzimatske regeneracije kofaktora, kemijska i elektrokemijska metoda regeneracije sve više privlače pažnju zbog svoje fleksibilnosti. Prednost elektrokemijske regeneracije je upotreba slobodnih elektrona kao reaktivnog sastojka. Na taj način izbjegnuto je korištenje drugog supstrata i ne formiraju se nusprodukti [45].

### 2.2.2.1 Elektroenzimatska oksidacija NAD(P)H

Direktna elektrokemijska redukcija nikotinamid kofaktora nije korisna zbog formiranja dimera putem neposrednih radikala. Direktna elektrokemijska oksidacija NAD(P)H u  $\text{NAD(P)}^+$  može biti uspješno izvedena, međutim zahtijeva relativno visoke oksidacijske potencijale i može rezultirati pasivnošću elektroda. Da bi ubrzali inače sporu NADH oksidaciju, možemo koristiti ugljične elektrode velike površine. Potencijal anode mora biti minimalno + 900 mV NHE za direktnu elektrokemijsku oksidaciju NAD(P)H. U tim uvjetima samo supstrati s visokom stabilnošću naspram oksidacije mogu biti transformirani bez gubitka selektivnosti. Uvođenje medijatora vodi do bržeg transfera elektrona između NADH i anode te sprječava moguće anodne oksidacije NADH. Ako se koriste medijatori koji se ponašaju kao transferi elektrona prema NADH, moraju biti relativno pozitivnih potencijala. Podloge koje sadrže oksidacijski osjetljive grupe, ne mogu se koristiti. Zbog toga se medijatorski sistemi s vrlo niskim oksidacijskim potencijalima uzimaju u obzir za zadržavanje visoke kemoselektivnosti jer uklanjaju vodikove ione, umjesto da reagiraju kroz transfer elektrona [24].

### 2.2.3 Fotokemijska regeneracija kofaktora

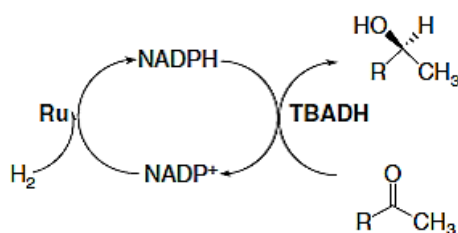
Da bi se povećala gustoća električne struje tijekom direktne elektrokemijske oksidacije NAD(P)H, istražene su fotokemijske metode. Istražena je i razvijena fotokemijska regeneracija NAD(P)<sup>+</sup> na oksidaciji ciklohexanola i butan-2-ola, koristeći alkohol dehidrogenazu (ADH) iz konjske jetre te ADH iz *Thermoanaerobacter brockii*. Fotosenzor (tris (2,2-bipiridil.) rutenij(II)) pobuđen je zrakama vidljive svjetlosti (SLIKA 6). Pobuđen Ru(II)\* kompleks je elektrondonor N,N-dimetil-4,4-bipiridin sulfata (MV<sup>2+</sup>) koji formira tris (2,2-bipiridil) rutenij(III) i MV-kation radikale. Ru(III) kompleks efektivno oksidira NAD(P)H, što regenerira kofaktor za oksidaciju enzima. MV-kation radikal može se ponovno oksidirati na prikladnoj elektrodi, pri čemu kofaktor ostaje stabilan tijekom procesa [24].



SLIKA 6. Fotokemijska regeneracija kofaktora oksidacijom pomoću HLAD ili *Thermoanaerobacter brockii*. Ru<sup>2+</sup> služi kao fotosenzor, dok MV<sup>2+</sup> (metil-viologen) funkcionira kao elektron akceptor koji se može reoksidirati na anodi.

### 2.2.4 Kemijska regeneracija kofaktora

Kemijski regeneracijski sustavi najčešće se sastoje od *o*-kinoid medijatora koji uklanjaju vodikove ione, a vodikov peroksid koji djeluje kao elektron akceptor razgrađuje se katalitički. Da bi proces bio učinkovit, frekvencija izmjene kinoidnog medijatora mora biti visoka. Medijatori tijekom oksidacije i redukcije moraju biti stabilni, topljivi u vodenim otopinama te moraju reagirati selektivno s reduciranim kofaktorima. Primjer ove metode je redukcija 2-heptanona u (*S*)-2-heptanol uz ADH iz *T. brockii* s NADP<sup>+</sup> i uz kompleks rutenija za regeneraciju koenzima (SLIKA 7). Uzorak je miješan pri 60°C pri 5 atm H<sub>2</sub>. Nakon 4h, 18 % 2-heptanona je reducirano tijekom 10 izmjena NADP<sup>+</sup> i rutenija. Istraženi sistemi funkcioniraju, ali je enantioselektivnost ketonske redukcije prespora [24].

TBADH=ADH iz *T. brockii*

SLIKA 7. Kemijska regeneracija kofaktora

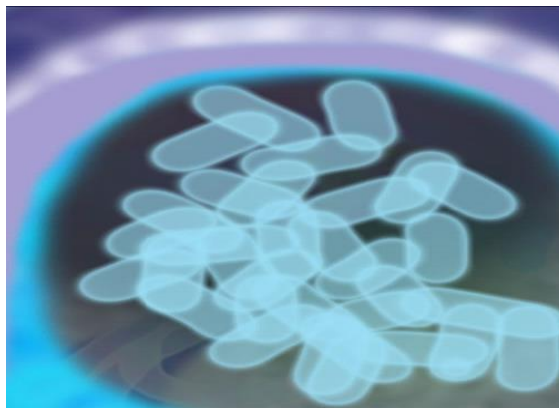
## 2.3 NADH oksidaza

NADH oksidaza katalizira dvoelektronsku redukciju molekularnog kisika u peroksid (Nox-1) ili četveroelektronsku redukciju u vodu (Nox-2). Oba enzima su flavoproteini, no kako potvrđuje sekvencijalna analiza enzima samo su djelomično povezani [33]. NADH oksidazu moguće je izolirati iz anaerobnih bakterija kao što su *Streptococcus* [13], *Thermotoga* [12], *Clostridium* [5], *Eubacterium* [10], *Lactobacillus* [1], iz arheja kao što je *Sulfolobus* [11], *Thermus* [4], i *Archaeoglobus* [16,3], odnosno iz organizama kao što su *Streptococcus mutans* [30,33], *Streptococcus faecalis* [36], *Arhaeoglobus fulgidis* [37], *Lactobacillus brevis* [39,27], *Borrelia burgdorferi* [28] i mnogih drugih. Nox-1, koji proizvodi peroksid manje je pogodan u procesima za enzimsku regeneraciju jer peroksid šteti enzimima te bi se trebao što prije razgraditi *in situ*. NADH oksidaza (NOX) koristi se prilikom reakcija dobivanja R-alkohola u reakciji sa S-alkohol dehidrogenazom, S-alkohola s R-alkohol dehidrogenazom ili u sintezi D-aminokiselina uz dodatak dehidrogenaze L-aminokiselina [24]. U anaerobnim organizmima NOX igra važnu ulogu uklanjanja kisika kada je organizam pod oksidativnim stresom. U aerobnim mikroorganizmima aktivnost NOX rezultira reakcijom transfera elektrona iz NADH u O<sub>2</sub> kroz citokrome membrano-graničnih enzima. NADH oksidaza iz *Corynebacterium* izolirana je iz membrane, no taj se proces rijetko provodi kod aerobnih bakterija zbog poteškoća u pročišćavanju proteina membrane [29].

### 3. PREGLEDNI DIO

#### 3.1 *Lactobacillus sanfranciscensis*

##### 3.1.1 Opis i značajke



SLIKA 8. *Lactobacillus sanfranciscensis*

*Lactobacillus sanfranciscensis* (*L. sanfrancisco*) je gram pozitivna bakterija koja proizvodi mliječnu kiselinu, te daje kruhu karakterističan okus. Smatra se ključnom bakterijom u biotehnologiji i proizvodnji pekarskih proizvoda [32]. Ime je dobila po gradu u kojem su mikroorganizmi ove vrste prvi izolirani. Obligatan je heterofermentativan laktobacil filogenetske veze s *Lactobacillus casei-pediococcus* grupom. Prvi su je izolirali Kline i Sugihara 1971. [38], a potom su je Weiss i Schillinger 1984. [47] naknadno revidirali kako bi se upisala u odobrenu listu imena bakterija. Različiti sojevi sadrže različit broj plazmida. DNA-DNA hibridizacija pokazuje da je *L. sanfrancisco* vrlo sličan *Lactobacillus brevis* [15].

##### 3.1.2 Metabolizam i proizvodnja kiselog tijesta

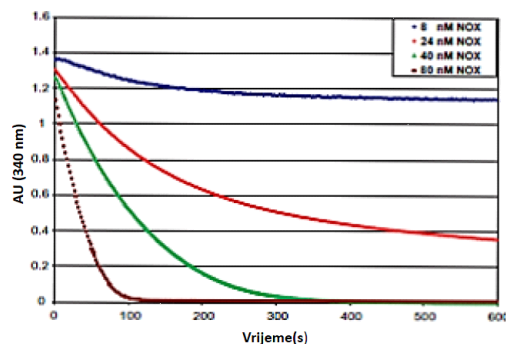
Rast *L. sanfranciscensis* je uvjetan jer zahtijeva ekstrakt svježeg kvasaca, nezasićene masne kiseline, naročito oleinsku kiselinu i preferira fermentaciju maltoze u odnosu na glukozu. Aeroban rast *L. sanfranciscensis* uz maltozu rezultira većim prinosom nego tijekom anaerobnog rasta. Tijekom rasta, u mediju bogatom maltozom, glukozom i fruktozom kao elektron akceptorom generira se određena količina ATP tijekom ciklusa acetat kinaze. *L. sanfranciscensis* koristi acetat kada elektron akceptor kao fruktoza ili kisik nisu prisutne te



tako povećava energiju i prinos rasta [20]. Organizam je visoko kompetitivan i prevladava u tradicionalnoj pripremi kiselog tijesta gdje količina nastalog acetata snažno utječe na okus i teksturu u finalnoj fazi pripreme [15]. U ranoj fazi pripreme tijesto sadrži velike količine kisika, što daje prednost tolerantnim organizmima u odnosu na striktne anaerobe [20]. Mnoge mliječno-kisele bakterije, naročito laktobacili, sadrže velike količine Mn(II). Mangan djeluje kao obrana od toksičnih oksigenih vrsta ili kao kofaktor za neke enzime kao što su katalaze. Tradicionalna proizvodnja tijekom različitih faza kontinuiranog razmnožavanja i proizvodnje kiselog tijesta s komercijalno dostupnim kulturama efektivna je za reduciranje rasta neželjenih bakterija i skladištenje. Proizvodnja tijesta igra važnu ulogu u nutricionizmu i kulturi već 10 000 godina i dalje je od velike važnosti pri izradi dijetnih proizvoda i u pekarskoj industriji [9].

### 3.2 Karakterizacija NADH oksidaze iz *L. sanfranciscensis*

NADH oksidaza (nikotin amid dinukleotid oksidaza) je intracelularni enzim relativne enzimске mase 110 000 na koji je kovalentno vezan FAD (flavin adenin dinukleotid) [35]. FAD-ovisna oksidoreduktaza, NADH oksidaza (Nox-2) u *L. sanfranciscensis* katalizira četveroelektronsku redukciju kisika u vodu i služi kao elektron akceptor tijekom aktivnog aerobnog metabolizma [23]. Enzim je aktivan između pH 7.0 i 8.5. [7]. Prilikom reakcije (30 °C, pH 7.5, 0.2 mM NADH), NADH oksidaza nije deaktivirana pod utjecajem temperature, ali je ograničena brojem konverzija koji se očituje smanjenjem apsorpcije NADH pri 340 nm dodatkom različitih koncentracija NADH oksidaze. Pri niskim koncentracijama NADH oksidaze (do 40 mM) reakcija stagnira s nepotpunom konverzijom NADH (SLIKA 9). Inaktivacija enzima testirana je dodatkom NADH, no daljnja konverzija NADH nije postignuta. S obzirom da su koncentracija NADH oksidaze i broj konverzija NADH povezane, izračunat je njihov broj pri svakoj koncentraciji enzima: omjer broj molova konvertiranog NADH supstrata i molarne koncentracije aktivnih mjesta pri različitoj koncentraciji enzima. S obzirom na jedno aktivno mjesto po podjedinici 48.8 kDa i 95%-tnoj razini čistoće NADH oksidaze, pronađeno je da je ukupan broj izmjena  $5000 \pm 1500$ . Navedeni podaci su dobiveni u odsutnosti bilo kojeg tiol zaštitnog sredstva kao što je  $\beta$ -merkaptioetanolom ili ditiotreitrol (DTT). U prisustvu 5 mM DTT broj izmjena povećan je 20 puta, do  $> 112,500$ , a enzim je toliko stabilan nakon 24 h ne dolazi do deaktivacije [8].



SLIKA 9. Stabilnost NADH oksidaze iz *L. sanfranciscensis* tijekom reakcija

Značajno pitanje je kako NADH oksidaza uspijeva provesti transfer četiriju elektrona. FAD može maksimalno pohraniti dva elektrona (u obliku FADH<sub>2</sub>) pa je potreban drugi reakcijski centar. NOX je homolog NADH peroksidaze iz NOX *Enterococcus faecalis* koji koristi vodikov peroksid kao elektron akceptor, te drugi reakcijski centar u obliku sadržanog cisteinskog ostatka u direktnom susjedstvu flavinskog prestenastog dijela FAD. Taj cistein može prijeći u oksidirano stanje tijekom reakcije, npr. u sulfeničnu kiselinu Cys-SOH. NADH oksidaza također sadrži takav cisteinski ostatak (Cys42) na odgovarajućoj poziciji, što pretpostavlja da reakcija katalizirana s NADH oksidazom počinje s potpuno oksidiranim oblikom enzima koji sadrži FAD i Cys42-S-OH i prolazi kroz transfer 4 elektrona karakteriziran s FADH<sub>2</sub> i Cys42-SH [34].

### 3.3 Soj, medij i uvjeti rasta mikroorganizma *L. sanfranciscensis*

*L. sanfranciscensis* DSM20451 se uzgaja na MRS podlozi čiji je sastav dan u tablici 1 s 5 modifikacija, ovisno o prisutnosti ili odsutnosti mangan/magnezij temeljne otopine koja sadrži 0,1 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,05 g/L MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L cisteina ili 5 g/L fruktoze (TABLICA 2). Za zadržavanje plazmida dodano je 10 µg eritromicina, a *L. sanfranciscensis* DSM2045 uzgojen je anaerobno pri 30 °C. *E. coli* DH5α anaerobno je uzgojena u Lauria-Bertani mediju (TABLICA 3) pri 37 °C u koji je dodano 100 µg/L amplicina. Anaerobne kulture inkubirane su u falcon bocama od 50 ml, dok je soj *L. sanfranciscensis* inkubiran u 50 mL medija u tikvice od 500 mL pri 30 °C u tresilici pri 200 rpm [2].

TABLICA 1: Sastav MRS hranjive podloge

Komponenta	Koncentracija g/L
Pepton iz kazeina	10
Ekstrakt mesa	5.0
Ekstrakt kvasca	5.0
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{NH}_4\text{Cl}$	3.0
Tween 80	1.0
Biotin	0.0002
Folna kiselina	0.2
Nikotinska kiselina	0.2
Piridoxal fosfat	0.2
Tiamin	0.2
Riboflavin	0.2
Kobalamin	0.2
Pantotenična kiselina	0.2
Maltoza	10.0
Glukoza	5.0

TABLICA 2: Modifikacije MRS podloge

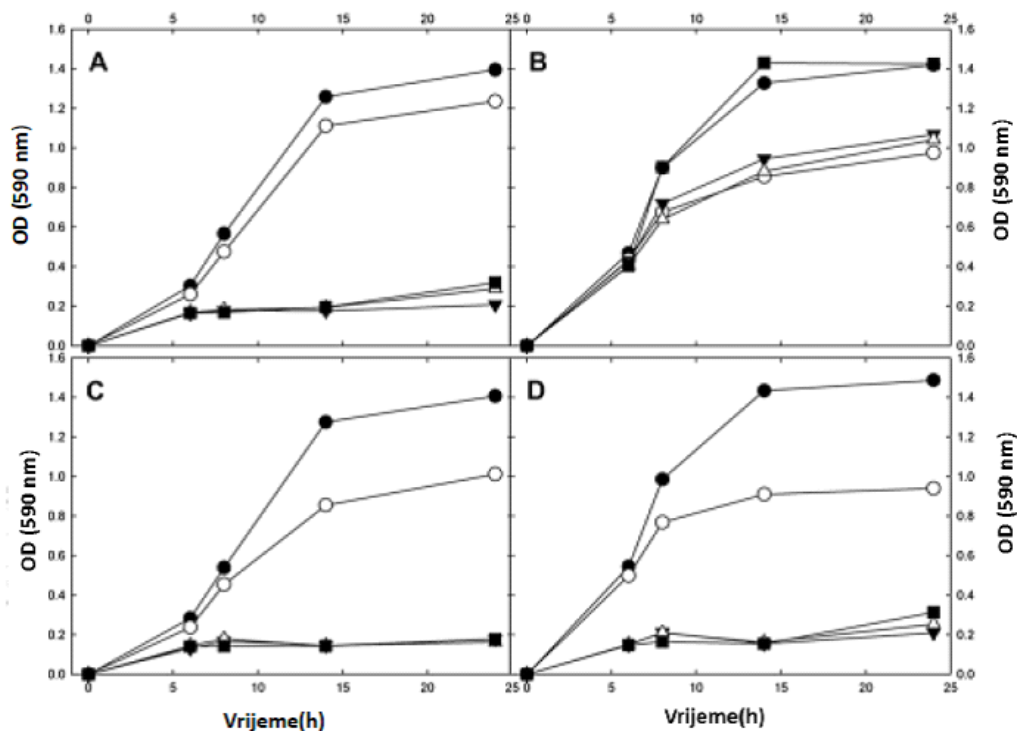
	MRS1	MRS2	MRS3	MRS4	MRS5
Mn/Mg	+	-	-	-	+
Cistein	+	+	-	+	-
Fruktoza	+	+	-	-	-

TABLICA 3: Sastav Lauria-Bertani medija

Komponenta	Koncentracija g/L
Tripton	10
NaCl	10
Ekstrakt kvasca	5

### 3.4 Utjecaj aeracije u MRS-mediju različitih koncentracija fruktoze na rast *L. sanfranciscensis* te njegovog mutanta

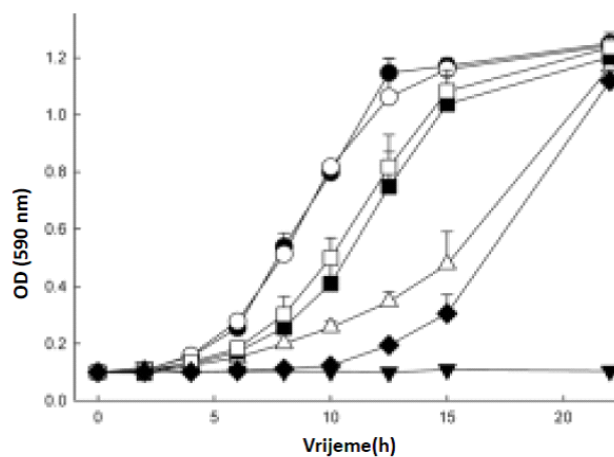
Istražen je rast *L. sanfranciscensis* i njegovog mutanta u različitim MRS podlogama tijekom anaerobnih uvjeta te je uspoređen s brzinom rasta aeriranih kultura (SLIKA 10). Rast stanica divljeg tipa i mutanta u anaerobnim uvjetima moguć je u mediju bogatom fruktozom (MRS1 i MRS2). Nakon 24 h aktivnost enzima u MRS2 podlozi je viša, a brzina rasta divljeg tipa je veća u odnosu na mutant. Tijekom aerobnih uvjeta, divlji tip stanica sposoban je rasti u svih 5 medija, ali njegov je rast uvjetan s obzirom na prisutnost magnezija što vidimo povećanjem brzine rasta u MRS1 i MRS5 (SLIKA 10 B). Aeroban rast mutanta veoma je sličan rastu pri anaerobnim uvjetima u svih 5 medija (Slika 10 D), iako mutant pokazuje povećanu brzinu rasta u MRS1 mediju u odnosu na MRS2 [2].



SLIKA 10. Rast *L. sanfranciscensis* (A i B) te njegovog mutanta (C i D) u anaerobnim uvjetima (A i C) i aerobnim uvjetima (B i D) na modificiranoj podlozi: ●MRS1, ○MRS2, ▲MRS3, △MRS4, ■MRS5

### 3.5 Utjecaj koncentracije fruktoze na rast *L. sanfranciscensis* u aeriranom mediju

Rast *L. sanfranciscensis* DSM20451 i njegovog mutanta DSM20451 $\Delta$ nox u MRS mediju bogatom maltozom s različitim varijacijama koncentracije fruktoze tijekom aerobnih uvjeta (200 okr/min) prikazan je na slici 11. Tijekom aerobnih uvjeta, rast divljeg tipa pokazuje nezavisnost s obzirom na koncentraciju fruktoze, dok se brzina rasta mutanta povećava proporcionalno koncentraciji fruktoze. Kulture mutanta u MRS mediju bez fruktoze dosežu visoke vrijednosti optičke gustoća stanica pri kraju fermentacije [2].



SLIKA 11. Rast na MRS maltozi (10g/L) s različitim konc. fruktoze pri aerobnim uvjetima (220rpm) ● divlji tip na maltozi; ○ divlji tip -maltoza+fruktoza (10mM); ▲ nox-maltoza; △nox maltoza+fruktoza (2 mM); ■ nox maltoza+fruktoza (5 mM); □ nox maltoza+fruktoza (10mM); ◆ nox maltoza bez fruktoze, nakon 6 h+fruktoza (5mM)

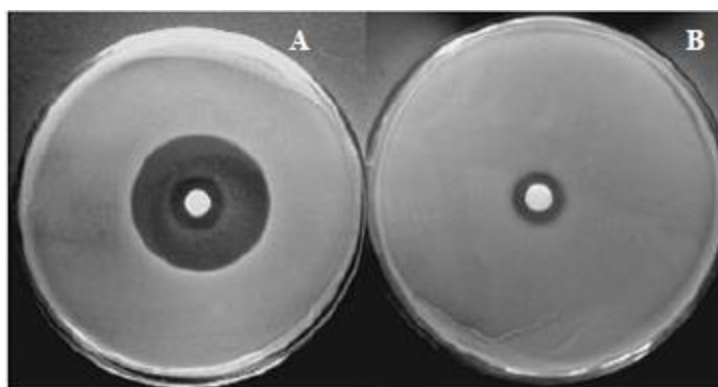
### 3.6 Inhibicija rasta mikroorganizma *L. sanfranciscensis* dodatkom oksidansa

Testirana je zaštitna uloga Nox-a protiv oksidativnog stresa u *L. sanfranciscensis*, osjetljivost stanice divljeg soja i mutanta na oksidanse kao što su diamid (tiol-specifični-oksidansi), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i parakvat. Rezultati u tablici 4 pokazuju da tretiranje stanica diamidom nepovoljnije djeluje na stanicu mutanta, nego na divlji tip pri uzgoju na MRS podlozi bez fruktoze. Inhibicija rasta uz dodatak diamida na MRS-podlozi u koju je dodano 10 g/L maltoze kao izvor karbonata ima veći utjecaj na stanicu mutanta, što možemo vidjeti na slici

12 B. Utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i parakvota nije toliko izražen za razliku od tiol-specifičnih-oksidanasa [2].

Tablica 4: Inhibicija rasta *L. sanfranciscensis* DSM20451 i mutanta DSM20451  $\Delta$ nox dodatkom oksidansa.

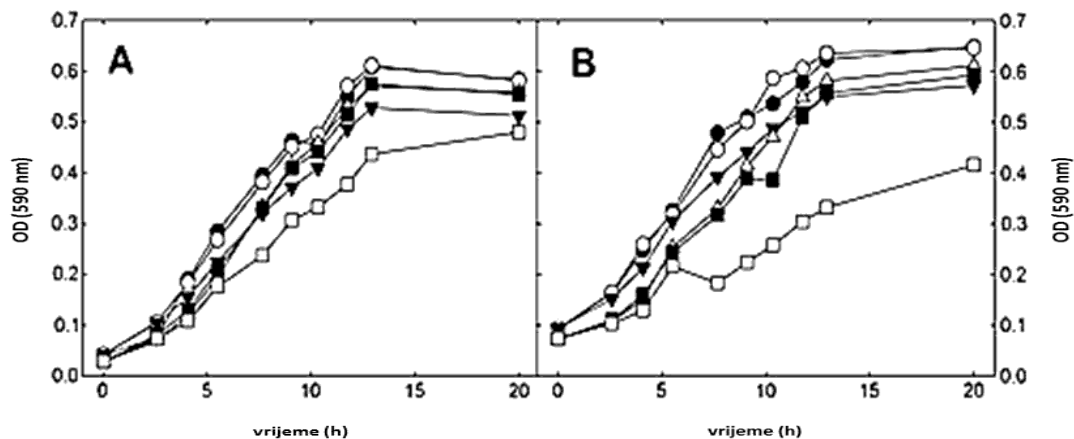
Zona inhibicije-dijametar /mm		Divlji tip					Nox mutant				
Oksidans	MRS1	MRS2	MRS3	MRS4	MRS5	MRS1	MRS2	MRS3	MRS4	MRS5	
Diamid	23±0.9	23±1.3	22±1.4	22±1.5	25±1.3	25±2.4	21±1.2	35±1.9	32±2.2	38±2.4	
Parakvot	6±0.9	6±1.3	10±1.6	6±0.6	10±1.2	10±1.7	6±1.0	16±1.5	12±1.2	18±2.0	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	42±3.2	43±2.4	43±1.8	44±3.2	47±3.5	43±2.8	42±2.0	49±3.2	50±2.1	53±2.5	



SLIKA 12. Inhibicija rasta dodatkom diamida na stanice *L. sanfranciscensis* DSM20451 (A) i mutanta DSM20451  $\Delta$ nox (B) na MRS podlozi sa 10 g/L maltoze dva dana nakon inkubacije pri 30 °C

### 3.7 Tolerancija kisika mikroorganizma *L. sanfranciscensis*

Kultura mutanta uzgojena na MRS podlozi uz dodatak 90 mM parakvota bez cisteina (MRS3 i MRS5) pokazuje sporiji rast u odnosu na mutant kojem je dodan cistein. Povećanje lag – faze i smanjenje brzine rasta uzrokuje smanjenje vrijednosti optičke gustoće stanica (SLIKA 13). Utjecaj parakvota na rast divlje stanice je neznan u oba medija. Utjecaj diamida kod mutanta je znatan. Smanjenje brzine rasta tijekom 5 h ukazuje da tijekom fermentacije dolazi do inhibicije njegovog rasta [2].

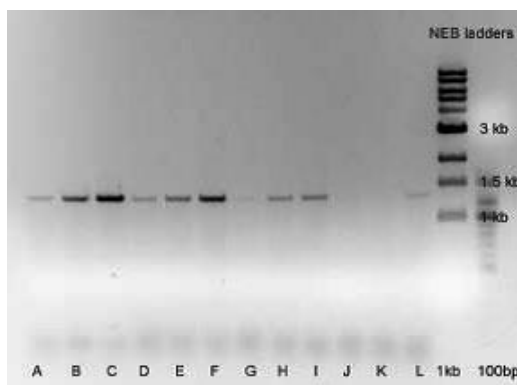


SLIKA 13. Odgovor rasta na MRS podlozi :A) dodatkom 0.5g/l cisteina , B) bez dodatka cisteina ● divlji tip bez parakvota; ○ dt+30mM parakvota; ◆ dt+90mM parakvota; Δnox bez parakvota; ■ nox+30mM parakvota; □ nox+90 m M parakvota

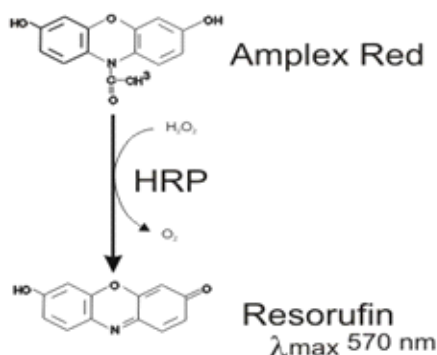
### 3.8 Dokazivanje produkta reakcije katalizirane NADH oksidazom iz *L. sanfranciscensis* i ubačene u *E.coli*

Kod rada s NADH oksidazom važno je poznavati mehanizam reakcije, tj. reducira li enzim kisik u vodu ili u vodikov peroksid. U svrhu istraživanja kinetike reakcije gen NADH oksidaze iz *L. sanfranciscensis* (sfnox) je kloniran i ekspresioniran te enzim pročišćen *sanfranciscensis*. Klonovi su ekspresionirani pri 37 °C te nakon 4 h inducirani (sfnoxK2 i sfnox K6). Kako bi se dokazao produkt reakcije, provedeni su spektrofotometrijski testovi. Bommarius i koautori [6] su proveli test dobivanja resorufina te su pri 570 nm pratili stvaranje crvenog obojenja karakterističnog za reakciju s parakvotom uz peroksidazu. Za kataliziranje oksidacije 9-acetilresorufina (“Amlex red”) u fluorescentni resorufin koristili su peroksidazu iz hrena (HRP) (SLIKA 15). Amplex red reagira s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u stehiometrijskom omjeru 1:1. Detektirano je 0.6 μM resorufina (formirana je ekvivalentna koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tijekom konverzije 300 μM NADH s enzimom iz *L. sanfranciscensis*. Vrijednost dobivena za enzim iz *L. sanfranciscensis* ispod je detekcijskog limita, što ukazuje na gubitak peroksida koji se

formira tijekom reakcije s NADH oksidazom. Istraživanje temeljeno na fluorescenciji resorufina dokazuje da je voda nezaobilazan produkt tijekom reakcija s NADH oksidazom iz *L. sanfranciscensis*. Iako 99.5% toka stvara vodu, nastanak male količine vodikovog peroksida se još uvijek istražuje [6].



SLIKA 14. Amplikacija *sfnox*; visok odziv zabilježen je u puferima B, C, E, F. Slabiji signal A, D, H, I i L. Aplikacija na J i K nije postignuta.



SLIKA 15. Dobivanje malih količina vodikovog peroksida HRP-kataliziranom oksidacijom "Amplex red-a" u resorufin

### 3.9 Pročišćavanje NADH oksidaze iz *L. sanfranciscensis*

Da bi se pročistila NADH oksidaza, potrebno je provesti niz separacijskih stupnjeva. Smrznute stanice su odmrznute i resuspendirane u 10 mL kalij-fosfatnog pufera (100 mM, pH 6.8) u koji je dodano 1mM EDTA, 5mM DTT i 5mM spermina. Takva suspenzija je stavljena 6 x 2 minute u ultrazvučnu kupelj te istovremeno hlađena u ledu. Dobiveni lizat je centrifugiran 45 minuta pri 18 000 okr/min i 4 °C. Slijedila je dijaliza tako pročišćenog lizata

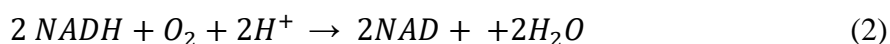


uz 1 L 45% amonij sulfata i 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 6,8) u koji je dodano 1 mM EDTA i 5 mM DTT. Dijaliza je provedena u Spectro/Por regeneriranim celuloznim membranskim cijevima (veličina pora 60 000). Nakon 4 sata uzorak je prenesen u pripremljenu 45%-tnu otopinu amonijevog sulfata. Dijaliza je provođena dodatnih 8 sati tijekom noći, nakon čega je uzorak centrifugiran 15 minuta pri 18 000 okr/min i 4 °C. Tako pripremljen supernatant je dijaliziran s 1 L 1-metilpiperazin puferom pri 30 °C (20 mM, pH 5.0 i 30°C) uz 5 mM DTT na Pierce Slide-A-Lyzer kazeti za dijalizu (veličine pora 10 000). Dijaliza je provođena 2 sata uz miješanje (200 okr/min) na digitalnoj magnetskoj miješalici s termometrom uz zagrijavanje i održavanje temperature pri 30 °C. Izmjena pufera je provođena 1 sat, nakon čega je uzorak centrifugiran 15 minuta pri 18 000 okr/min pri 4 °C. Supernatant je prenesen na kolonu (Amersham Pharmacia HiPrep16/10 Q FF, AKTA sistem) pri 4 °C, a odvajanje je provođeno s 0-100% NaCl (1M) i 1-metilpiperazin puferom (20 mM, pH 5.0) pri istoj temperaturi. Sakupljeno je po 5 mL devet najaktivnijih frakcija.

U drugom protokolu pročišćavanja korišten je 1-metilpiperazin pufer (100 mM, pH 5.0) u puferu za liziranje. Smrznute stanice su odmrznute i resuspendirane u 10 mL 1-metilpiperazin pufera (100 mM, pH 5,0) u koji je dodano 1 mM EDTA, 5 mM DTT i 5 mM spermina. Stanična suspenzija je stavljena u ultrazvučnu kupelj 6 x 2 minute, a lizat centrifugiran 45 minuta pri 18 000 okr/min pri 4 °C, te potom dijaliziran s 1L 1-metilpiperazin pufera (20 mM, pH 5.0 i 35 °C) u koji je dodano 5 mM DTT. Uzorak je dijaliziran s 1L pufera, dva sata pri 35 °C s 0-100% NaCl (1M) i 1-metilpiperazin puferom (20 mM, pH 5.0) uz miješanje pri 200 okr/min i održavanje temperature pri 35 °C. Izmjena pufera provođena je 1 sat, a zatim je uzorak prenesen i centrifugiran 15 minuta pri 18 000 okr/min. Supernatant je nanesen na Mono-Q kolonu (Amersham Pharmacia, AKTA sistem), a razdvajanje je provođeno s 0-100% NaCl (1M) i 1-metilpiperazin puferom (20 mM, pH 5.0) pri 4 °C. Sakupljeno je deset frakcija od 1 ml, a najaktivnija frakcija je dijalizirana s 45%-tnim amonijevim-sulfatom s 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 6.8) uz dodatak 1 mM EDTA i 5 mM DTT. Nakon 4 h uzorak je prenesen u pripremljenu otopinu 45%-nog amonij-sulfata te potom centrifugiran 15 minuta pri 18 000 okr/min pri 4 °C [6]. Rezultati pročišćavanja NADH oksidaze iz *L. sanfranciscensis* prikazani su u tablici 5.

### 3.9.1 Određivanje aktivnosti NADH oksidaze

Aktivnost enzima NADH oksidaze prikazana u tablici 5 određivana je spektrofotometrijski pri 340 nm i 30 °C u ukupnom volumenu od 1 ml u kojem se nalazi 0.1 M TEA pH 7.5. Reakcijskoj smjesi koja sadrži 5 mM DTT i 0.2 mM NADH dodano je 10 µl enzima, a reakcija je praćena 1 minutu (uz poznati ekstincijski koeficijent NADH koji iznosi 6.22 l/(mol cm)). Reakcija prema kojoj se određuje aktivnost NADH oksidaze prikazana je jednadžbom 2. Dobivena volumna aktivnost je izražena međunarodnom jedinicom enzimske aktivnosti U po jedinici volumena pri čemu je 1 U jednak količini NADH u mikromolima koja izreagira u jednoj minuti. NADH apsorbira svjetlost te se iz promjene apsorbancije u vremenu računa volumna aktivnost enzima prema jednadžbi 3. Podijelimo li volumnu aktivnost enzima sa koncentracijom proteina dobit ćemo specifičnu aktivnost (jednadžba 4).



$$V \cdot A = \frac{Vr}{\epsilon_{340} \cdot d \cdot V_{NOX}} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (3)$$

$$S. A = \frac{V \cdot A}{c(\text{enzim})} \quad (4)$$

$\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$  - promjena apsorbancije u vremenu [ $\text{min}^{-1}$ ];

$Vr$  - ukupni volumen reaktanta u kivetu [mL];

$V_{NOX}$  - volumen dodanog enzima [mL];

$\epsilon_{340}$  - ekstincijski koeficijent za NADH [ $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ];

$d$  - promjer kivete [cm]

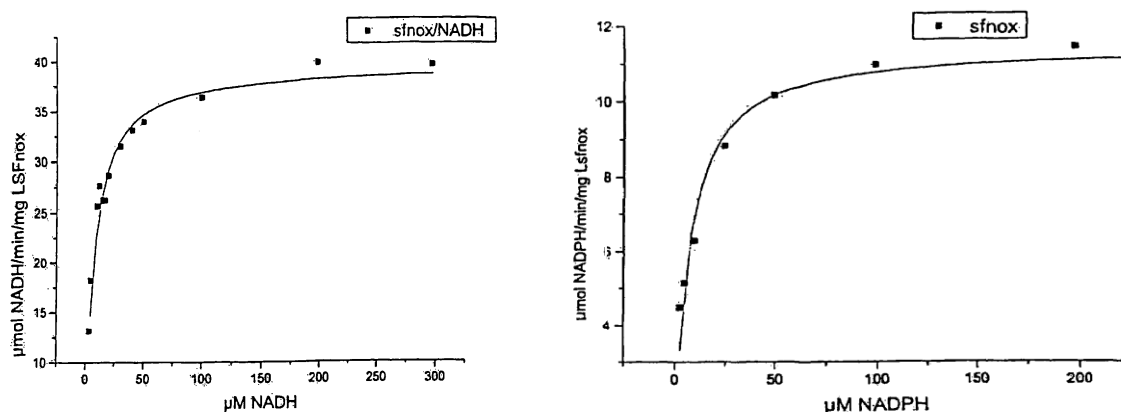
Omjer specifične aktivnosti NADH oksidaze nakon pročišćavanja i specifične aktivnosti u sirovom ekstraktu predstavlja stupanj pročišćavanja enzima. U tablici 5 vidimo da njegov iznos raste proporcionalno specifičnoj aktivnosti nakon pročišćavanja. Iskorištenje je izračunato u odnosu na aktivnost enzima pri čemu je inicijalna aktivnost ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) prikazana kao 100 %, a ostale računane u odnosu na nju. Tijekom procesa pročišćavanja dolazi do velikih gubitaka čime raste cijena enzima .

TABLICA 5: Pročišćavanje NADH oksidaze – separacijske metode i dobivene aktivnosti

	Volumen [mL]	Aktivnost [U/mL]	Protein [mg/mL]	Specifična aktivnost [U/mg]	Iskorištenje %	Stupanj pročišćavanja	ΣU
Lizat (pH 5.0)	10,2	424,4	14,3	29,7	100	1	4329.3
Dijaliza/precipitacija kiselinom	10,5	277,4	5,4	51,8	67,3	1,7	2912.7
Mono-Q	1	476,7	5,1	93,1	57,8	3,1	476.7
45% Amonijev sulfat (dijaliza)	0,35	1114,1	8,4	132,6	47,3	4,5	390.0

### 3.10 Kinetika reakcije s NADH oksidazom

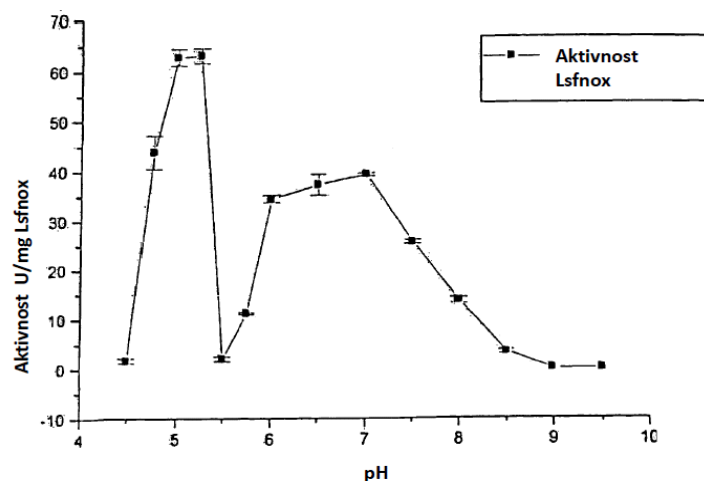
Pročišćeni enzim (u 45%-tnoj otopini amonijevog sulfata u otopini zasićenoj zrakom pri 30 °C i pH 7.0 u 0.1 HEPES puferu) je kinetički karakteriziran ispitivanjem utjecaja koncentracije NADH na aktivnost enzima. Slika 16 pokazuje da NADH oksidaza iz *L. sanfranciscensis* prihvaća NADPH (Slika 16B) kao supstrat s dobrom reaktivnošću ( $V_{max} = 11$  U/mg), što je 30% aktivnosti u pogledu na NADH (Slika 16A) ( $V_{max} = 39.3$  U/mg). Slične  $K_m$  vrijednosti od 6.7 i 6.1  $\mu\text{M}$  ukazuju na sličan afinitet vezivanja oba supstrata [6].



SLIKA 16. Kinetika sfnox NADH oksidaze s NAD(P)H kofaktorom u otopini zasićenoj kisikom pri 30 °C i pH 7

### 3.11 Aktivnost enzima NADH oksidaze u ovisnosti o pH vrijednosti

Mjerenje ovisnosti aktivnosti o pH provedeno je s pročišćenim enzimom u 45%-tnoj otopini amonijevog sulfata u otopini zasićenoj zrakom pri 30 °C i pH 7.0 u 0.1 HEPES puferu, a rezultati su prikazani na slici 17. Optimalna aktivnost zabilježena je pri pH vrijednosti 5.2. Ispod pH vrijednosti 5 aktivnost značajno pada te postiže nulu pri 4.5. Vrijednosti od pH 4.5 do 5.2 su neto vrijednosti čijim smanjenjem dolazi do kemijske dekompozicije. Iznad 5.2 aktivnost naglo pada prije značajnog oporavka pri pH 6.0 te maksimuma pri pH 7.0 te ponovnog sporog pada do pH 8.5. Nagli pad aktivnosti između pH 5.2 i 6.0 podudara se s izmjerenom pI vrijednosti 5.4. Pri pH 5.5 uzorci trenutno gube aktivnost. Uzrok ovog pada još se istražuje [6].



SLIKA 17. Profil aktivnosti NADH oksidaze iz *L. sanfranciscensis* u ovisnosti o pH vrijednosti

## 4. ZAKLJUČAK

Postupak izolacije NOX iz *Lactobacillus sanfranciscensis* započinje odmrzivanjem smrznutih stanica te resuspendiranjem nakon čega slijede dijalize uz pogodni pufer te centrifugiranje. Nakon izmjene pufera te centrifugiranja uzorak se pročišćava na kromatografskoj koloni. Prilikom pročišćavanja enzima konačno iskorištenje je iznosilo 47.3%, a stupanj pročišćavanja 4.5. Karakterizacijom pročišćenog enzima utvrđeno je da maksimalna aktivnost pri pH 7.5 i 30 °C iznosi 132.6 U/mg. Mjerenje ovisnosti aktivnosti o pH provedeno je s pročišćenim enzimom u 45%-tnoj otopini amonijevog sulfata u otopini zasićenoj zrakom pri 30 °C i pH 7.0 u 0.1 M HEPES puferu te je zabilježena optimalna aktivnost pri pH vrijednosti 5.2. Prilikom reakcije (30 °C, pH 7.5, 0.2 mM NADH), NADH oksidaza nije deaktivirana pod utjecajem temperature, ali je ograničena brojem konverzija što se očituje smanjenjem apsorbancije NADH pri 340 nm dodatkom različitih koncentracija NADH oksidaze. Kinetičkom karakterizacijom NADH oksidaza iz *L. sanfranciscensis* ustanovljeno je da su NADPH s  $V_{max} = 11$  U/mg i NADH s  $V_{max} = 39.3$  U/mg dobri supstrati sa sličnim afinitetom vezanja, što je vidljivo iz sličnih vrijednosti Mihaelisovih konstanta koje iznose 6.7  $\mu$ M za NADPH i 6.1  $\mu$ M za NADH.

## 5. LITERATURA

1. Altenbuchner J, Mattes R, Syldatk C, Wiese A, Wilms B: (2001) Industrial enzymes: structure, function and application, *J Biotechnol* 86:19–30
2. Behr J, Freiding S, Jänsch A, Vogel RF: (2011) Contribution of the NADH-oxidase (Nox) to the aerobic life of *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Food Microbiology* 28 29e37
3. Beliczey J, Giffels G, Kragl U, Rissom A, Wandrey C: (1999) Tetrahedron asymmetry 10, 923
4. Bommarius AS, Drauz K, Schwarm M, Koeller KM, Wong CH: (1998) *J Mol Catal B-Enzym* 5:11
5. Bommarius AS, Drauz K, Schwarm M, Liese A, Seelbach K, Wandrey C: (1998) *J Mol Catal B-Enzym* 5:12
6. Bommarius AS, Gibbs PR, Riebel BR, Wellborn WB: (2002) Cofactor Regeneration of NAD<sup>+</sup> from NADH: Novel water-forming NADH Oxidases, *Adv. synth. catal.* 1615-4150/02
7. Bommarius AS, Jiang R, Lountos GT, Orville AM, Thaler TL, Wellborn WL: (2006) The Crystal Structure of NAD(P)H Oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*; Insights into the conversion of O<sub>2</sub> into two water molecules by the flavoenzyme *Biochemistry* 45 9648-9659
8. Bommarius AS, Ödman P, Wellborn WB: (2004) An enzymatic process to α-ketoglutarate from L-glutamate: the coupled system L-glutamate dehydrogenase/ NADH oxidase, *Asymmetry* 15 2933–2937
9. Bonacina G, Foschino P, Picozzi C, Vigentini I: Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyses: (2010) *Microbiology* 156 2035–2045
10. Boonstra B, Bruce NC, French CE, Rathbone DA, Walker EH: (2000) *Appl Env Microbiol* 66:5161
11. Buckmann F, Carrea G, Kulbe, Lemaitre G, Lenay J, Masson C: (1990) *Biotechnol Lett* 12:35311
12. Buendia J, Crocq V, Lemaitre G, Lenay J, Prat D, Richard C, Vivat M : (1997) *Organic proces rev. dev.* 1:2
13. Chenault HK, Whitesides GM: (1987) *Appl Biochem Biotechnol* 14:147–197
14. Ciriacy M, Drewke C: (1988) *Biochim Biophys Acta* 950:54–60

15. Corsetti A, Gobbetti M: (1997) *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium:a review, Food Microbiology 14 175–187
16. de Vos WM, Kengen SWM, van der Oost J: (2003) Eur J Biochem 270:2885–2894
17. Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Schmid A, Witholt B, Wubolts M: (2001) Nature 409:258
18. Edegger K ,Faber K , Harald M ,Wolfgang K: (2004) Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols, Current Opinion in Chemical Biology 8:120–126
19. Egorov AM, Hummel W, Kragl U, Kula MR, Riebel B, Seelbach K, Tishkov VI, Wandrey C: (1996) A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase, Tetrahedron Lett. 37 1377–1380
20. Ehmann M, Gänzle MG, Hammes VP: (1998) Fermentation response to process parameters of sourdough *sanfranciscensis* and *Candida milleri* in modeling of growth of *Lactobacillus*, Appl. Environ. Microbiol. 64(7):2616.
21. Findrik Z, Vasić-Rački Đ, Vrsalović-Presečki A: (2007) Mathematical modelling of NADH oxidation catalyzed by new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* incontinuously operated enzyme membrane reactor, J.Biosci.Bioeng. 104 275–280.
22. Geueke B, Hummel W, Kuzu M: (2003) An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure D-tert-leucine, Org. Lett. 5 3649–3650
23. Geueke B, Hummel W, Riebel B: (2003) NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD, Enzyme Microb. Technol. 32 205–211.
24. Gröger H, Hummel W, Weckbecker A: (2009 ) Regeneration of Nicotinamide Coenzymes: Principles and applications for the synthesis of chiral compounds; Adv Biochem Engin/Biotechnol DOI: 10 1007/10 2009 55
25. Held M, Schmid A, Verkeyken L, Witholt B: (2001) Biocatal Biotransform 19:191
26. Higuchi M, Kamio Y, Li, Poole LB, Shimada M: (2000) Free Radic Biol Med 28:108–120
27. Higuchi M, Kamio Y, Matsumoto J, Shimada M, Yamamoto Y: (1996) Biosci Biotechnol Biochem 60:39–4337
28. Higuchi M, Kamio Y, Poole LB, Sato Y, Shimada M, Takahashi N, Yamamoto Y: (1999) J Bacteriol 181:5940–5947
29. Hirano IJ, Miyamoto K, Ohta H, Yoshida S: (2012) Cofactor recycling using a thermostable NADH Oxidase, Chemical Biology,ISBN 978-953-51-0049-2

30. Hopner T, Müller U, Ruschig U, Willnow P: (1978) Eur J Biochem 83:485–498
31. Hummel W, Jonas M, Kula MR, Vasić-Rački Đ, Wandrey C: (1989) Appl Microbiol Biot 31:215
32. Hummel W, Kragl U, Kruse W: (1996) Reel trav chim pays-B 115 239
33. Hummel W, Kragl U, Kruse W, Wandrey C: (1996) Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example., Biotechnol. Bioeng. 52 309–319
34. Hummel W, Kuzu M, Niefind K, Schomburg D: (2005) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a flavoprotein NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*. Acta Crystallogr Sect F. Struct. Biol Cryst. Commun. 61 (Pt 5):528-30
35. Hummel W, Riebel B: (2003) Biotechnol Lett 25:51–54
36. Kamphuis J, Karutz M, Kragl U, Liese A, Wandrey C: (1996) Biotechnol Bioeng 51: 544
37. Karutz M, Kierkels H, Kragl U, Kula MR, Liese A, Wandrey C, Zelinski T: (1998) J Mol Catal B-enzym 4:91
38. Kline L, Sugihara TF: (1971) Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process, Appl.Microbiol 21 459–465
39. Koellere KM, Wong CH(2001) Nature 409:232
40. Kragl U, Vasić-Rački Đ, Wandrey C: (1993) Ind J Chem 32:103
41. Liese A, Seelbach K, Wandrey C, Wiley VCH, Weinheim: (2000) Industrial biotransformations (p.) 46
42. Molinari F: (2006) Oxidations with isolated and cell-bound dehydrogenases and oxidases, Current Organic Chemistry 10:1247-1263
43. Purić J: (2011) Imobilizacija pekarskog kvasca u mikrokanalu, završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
44. Roberts SM, van der Donk WA, Zhao H: (2003) Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. Curr. Opin. Biotechnol. 14 583–589
45. van der Donk W, Zhao H: (2003) Recent developments in pyridine nucleotide regeneration, Curr. Opin. Biotechnol. 14 421–426.
46. Vasić-Rački Đ, Wichmann R: (2005) Cofactor regeneration at the lab scale technology transfer in biotechnology, Germany p.225-260,vol.92
47. Weiss N, Schillinger U: (1984) *Lactobacillus sanfrancisco* sp. nov. nom. rev. system, Appl Microbiol. 5 230–232



## 6. ŽIVOTOPIS

Elena Josić je rođena 12. studenog 1990. godine u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu “Velika Mlaka“ u Velikoj Mlaci nakon čega je upisala Zdravstveno veleučilište u Zagrebu i stekla srednje stručno obrazovanje farmaceutskog tehničara. Maturirala je 2009. godine i iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Ekoinženjerstvo.