

Svojstva, modifikacije i primjena saharoza fosforilaze

Vrtodušić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:076394>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lucija Vrtođušić

7237/BT

SVOJSTVA, MODIFIKACIJE I PRIMJENA SAHAROZA FOSFORILAZE

Završni rad

Predmet: Biotehnologija 1

Mentor: prof. dr. sc. Anita Slavica

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju
piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Svojstva, modifikacije i primjena saharoza fosforilaze

Lucija Vrtodušić, 7237/BT

Sažetak: Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7) je bakterijska citosolna glikoziltransferaza. U reakciji sa supstratom ovaj enzim formira kompleks β -glukozil-enzim, koji može sudjelovati u četiri različite reakcije: fosforolizi, sintezi, hidrolizi i transglukozilaciji. U reakciji fosforolize u reakciji s ortofosfatom nastaje α -D-glukoza-1-fosfat, a u suprotnom smjeru se odvija reakcija sinteze supstrata - donora glukozila. Do hidrolize kompleksa β -glukozil-enzim dolazi u reakciji s vodom i nastaje glukoza. Transglukozilacijom se glukozil od donora prenosi na različite molekule akceptora, pri čemu nastaju visoko vrijedni α -konfigurirani glukozilirani spojevi. Saharoza fosforilaza katalizira opisane reakcije ping-pong mehanizmom tipa Bi-Bi. Primjenom točkastih mutacija okarakterizirana su tri ključna bočna lanca aminokiselina u aktivnom mjestu saharoza fosforilaze: Asp-192 (katalitički nukleofil), Glu-232 (katalitička kiselina/baza) i Asp-290 (stabilizator prijelaznog stanja). Preostaje da se naprave mutanti ovog enzima koji imaju zadovoljavajuću stabilnost u uvjetima industrijske proizvodnje i na taj način proizvode visokovrijedni glukozilirani proizvodi s širokom primjenom u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Ključne riječi: fosforoliza, hidroliza, saharoza fosforilaza, transglukozilacija, visokovrijedni spojevi

Rad sadrži: 32 stranice, 9 slika, 1 tablicu, 52 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Anita Slavica

Datum obrane: lipanj 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Properties, modifications and employment of sucrose phosphorylase

Lucija Vrtođušić, 7237/BT

Abstract: Sucrose phosphorylase (EC 2.4.1.7) is a bacterial cytosolic glycosyltransferase. β -glucosyl-enzyme complex formed in a reaction of this enzyme with a substrate can be used in four different reactions: phosphorolysis, synthesis, hydrolysis and transglucosylation. α -D-glucose-1-phosphate is produced in a reaction of the complex and an orthophosphate (phosphorolysis). Substrate (glucosyl donor) can be synthesized in opposite direction of phosphorolysis. During transglucosylation glucosyl moiety is transferred from a donor to an acceptor molecule and different high-added value glucosylated compounds can be yielded in this reaction. Ping-pong Bi-Bi mechanism is characteristic for reactions catalysed by the sucrose phosphorylase. Site directed mutagenesis was used to determine three key amino acid side chains in active site of the enzyme: Asp-192 (catalytic nucleophile), Glu-232 (catalytic acid/base) and Asp-290 (stabilizer of the complex). It remains to be seen if mutants with satisfactory stability under industrial conditions will be produced and used in manufacturing of high-added value glycosylated products with versatile applications in industry.

Keywords: high-added value products, hydrolysis, phosphorolysis, sucrose phosphorylase, transglucosylation

Thesis contains: 32 pages, 9 figures, 1 table, 52 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Anita Slavica, Full Professor

Defence date: June 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Saharoza fosforilaza	2
2.1.1. Klasifikacija i karakteristike enzima	3
2.1.2. Struktura enzima.....	6
2.2. Biološko podrijetlo saharoza fosforilaze	6
2.2.1. Metode pročišćavanja	9
2.2.2. Metode određivanja pročišćenosti enzima	10
2.3. Reakcije koje katalizira saharoza fosforilaza	11
2.3.1. Reakcijski mehanizam.....	12
2.3.2. Raznolikost supstrata i reakcija koje katalizira ovaj enzim	14
2.3.3. Transglukozilacija.....	15
2.4. Modifikacije saharoza fosforilaze	17
2.4.1. Istraživanje katalitičke aktivnosti	17
2.4.2. Modifikacije u cilju šire primjene	18
2.5. Primjena saharoza fosforilaze	20
2.5.1. Oblici biokatalizatora u uporabi.....	20
2.5.2. Potencijalna primjena u prehrambenoj industriji.....	22
2.5.3. Primjena u farmaceutskoj industriji	23
3. ZAKLJUČCI	26
4. LITERATURA	28

1. UVOD

Glikoziltransferaze (EC 2.4) su zasebna skupina enzima, koji kataliziraju prijenos glikozilne podjedinice sa aktiviranog (fosforiliranog) donora glikozila na nukleofilni akceptor glikozila. Ove su reakcije karakterizirane visokom selektivnosti prema donorima i akceptorima glikozila, kao i visokim prinosima određenih produkata ovako kataliziranih reakcija u točno definiranim uvjetima. Treba razlikovati dva tipa reakcija koje kataliziraju glikoziltransferaze - (i) reakcije u kojima stereokemija produkta ostaje nepromijenjena (s obzirom na stereokemiju supstrata) nakon formiranja glikozidne veze i (ii) reakcije u kojima enzim invertira anomernu konfiguraciju produkta u odnosu na anomernu konfiguraciju supstrata - donora glikozila (Mestrom i sur., 2019).

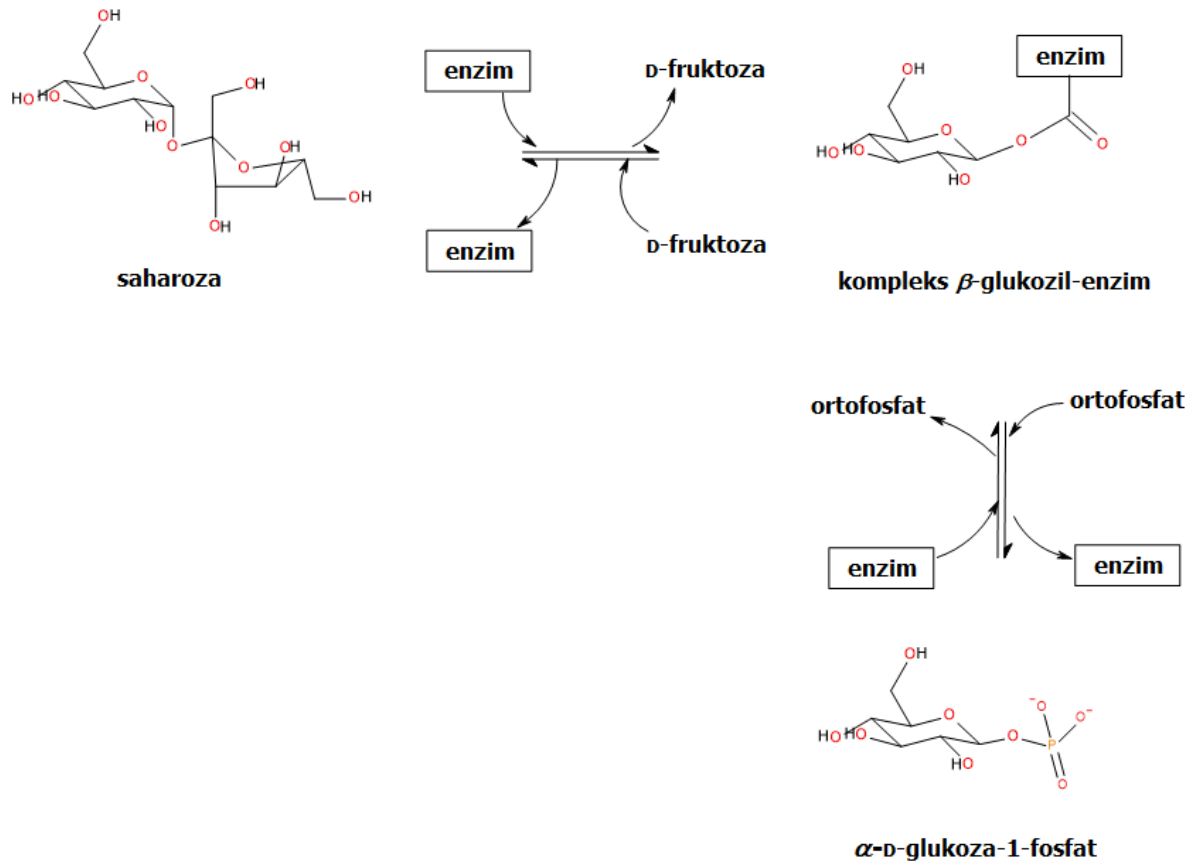
Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7) je bakterijski citoplazmatski enzim svrstan u obitelj α -amilaza (GH-13). Ovaj enzim može katalizirati nekoliko reakcija. Fosforolizom donora glukozila (npr. saharoze) nastaje α -D-glukoza-1-fosfat (i D-fruktoza; Vandamme i sur., 1987). Ova je reakcija reverzibilna, a u suprotnom smjeru se može odvijati sinteza donora glukozila (npr. saharoze). Osim nasuprotnih reakcija - fosforolize i sinteze, saharoza fosforilaza katalizira i reakcije hidrolize i transglukozilacije. U reakciji hidrolize supstrata (npr. saharoze) uz D-fuktozu nastaje i D-glukoza. Osim pobrojanih reakcija (fosforoliza, sinteza i hidroliza), čiji su krajnji proizvodi svi redom izuzetno važni u razgradnji polimernih supstrata i proizvodnji prvenstveno (fosforiliranih) mono- i disaharida, reakcija transglukozilacije čini ovaj enzim izuzetno atraktivnim biokatalizatorom u modernoj biotehnološkoj proizvodnji visokovrijednih novih i rijetkih glukoziliranih spojeva i to zbog svoje raznovrsnosti glede akceptorskih molekula.

Cilj ovog rada bio je da se na temelju dostupne literature sažmu najbitnije karakteristike saharoza fosforilaze. Potrebno je usporediti ključne karakteristike ovog enzima, koji je izoliran i pročišćen iz relativno malog broja bakterijskih vrsta: *Bifidobacterium adolescentis* (Sprogøe i sur., 2004), *Leuconostoc mesenteroides* (Koga i sur., 1991), *Pseudomonas saccharophila* (Silverstein i sur., 1967) i *Streptococcus mutans* (Russell i sur., 1988). Obratit će se pozornost na kvaternu strukturu ovog enzima, zatim tipove reakcija koje katalizira i njihove ravnoteže kao i mehanizme ovih reakcija. Iz najnovijih istraživanja, koja su provedena uz primjenu metoda genetičkog inženjerstva, zaključit će se koje su aminokiseline ključne za aktivnost ovog biokatalizatora kao i za spektar potencijalnih donora i akceptora glukozila i to u cilju proizvodnje visokovrijednih biokemikalija. Široka industrijska primjena ovog enzima fokusira napredna istraživanja na postizanje stabilnosti saharoza fosforilaze i različitih pripravaka ovog enzima u industrijskim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

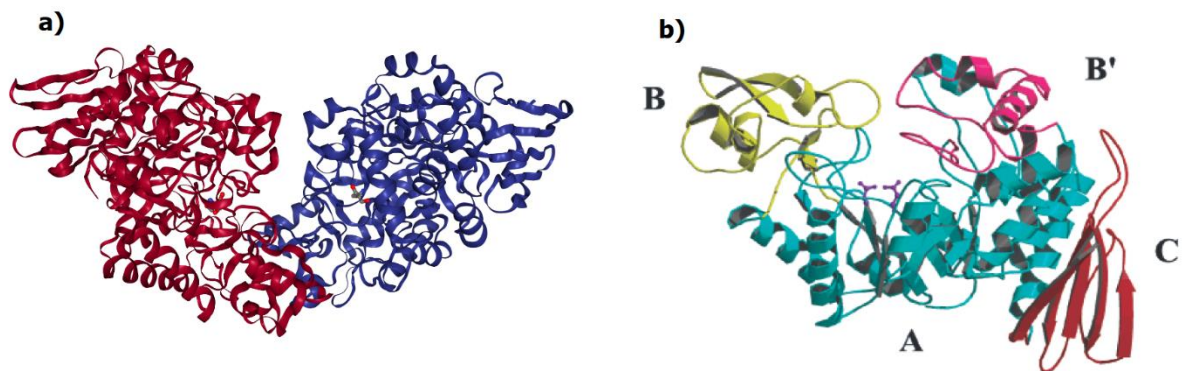
2.1. Saharoza fosforilaza

Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7) je glikoziltransferaza koja u bakterijskim stanicama mehanizmom dvostruke zamjene katalizira reverzibilnu konverziju saharoze i ortofosfata u α -D-glukoza-1-fosfat i D-fruktozu (Slika 1.) (Anonimus 1, 2020).



Slika 1. Shematski prikaz konverzije saharoze i ortofosfata do α -D-glukoza-1-fosfata i D-fruktoze, koju katalizira saharoza fosforilaza.

Ovaj enzim čini oko 500 aminokiselina, koje su organizirane u četiri domene (Slika 2.). Aktivni enzim može biti funkcionalni monomer ili dimer, odnosno može i ne mora formirati kvaternu strukturu (Sprogøe i sur., 2004).



Slika 2. a) Homodimer saharoza fosforilaze izolirane iz bakterije *Bifidobacterium adolescentis* (PDB 1R7A); b) vrpčasti prikaz četiriju domena monomera u plavoj (A), žutoj (B), ružičastoj (B') i crvenoj (C) boji (preuzeto iz Sprogøe i sur., 2004).

Molekulska masa monomernog oblika enzima, koji se češće pojavljuje od dimernog oblika, iznosi oko 60 000 Da, dok je optimalna pH vrijednost za aktivnost ovog enzima između 6,0 i 7,0 jedinica, što ovisi o temperaturi uzgoja bakterijskih stanica koje sintetiziraju saharoza fosforilazu. Pri uzgoju bakterije mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides* zabilježeno je da se pri polovici eksponencijalne faze rasta ove bakterijske vrste postiže maksimalna koncentracija saharoza fosforilaze (Vandamme i sur., 1987).

2.1.1. Klasifikacija i karakteristike enzima

Prema podacima dostupnim u bazi podataka BRENDA (Anonimous 1, 2020) saharoza fosforilaza pripada skupini glikoziltransferaza, enzima koji kataliziraju formiranje glikozidne veze između hemiacetalne grupe ugljikohidrata i hidroksilne grupe drugog spoja, ne nužno ugljikohidrata, i to prijenosom monosaharidne skupine (npr. glukoze) iz fosfatom aktiviranog ugljikohidrata (npr. fosfatom aktivirane saharoze) na ortofosfat (Slika 1.).

Analizom primarne strukture proteina utvrđeno je da saharoza fosforilaza pripada skupini glikozid hidrolaza (EC 3.2) i svrstana je u GH13 skupinu (Cantarel i sur., 2009). Enzimi iz skupine GH13 kataliziraju hidrolizu glikozidnih veza i/ili transglikozilaciju monosaharida (glukoze), koji su međusobno povezani $\alpha(1-1)$, $\alpha(1-4)$ ili $\alpha(1-6)$ glikozidnim vezama. Ova je skupina enzima (GH13) poznata i pod nazivom skupina α -amilaza, a podijeljena je na nekoliko podskupina. Do nedavno se smatralo da podskupinu 18 skupine GH13 (GH13-18) čine isključivo saharoza fosforilaze, no okarakterizirani su i drugi članovi GH13-18 podskupine, koji pokazuju drugačiju enzimsku aktivnost, poput saharoza-6-fosfat fosforilaze (EC 2.4.1.329; Verhaeghe i sur., 2014), glukozilglicerat fosforilaze (EC 2.4.1.352; Franceus i sur., 2017) i

glukozilglicerol fosforilaze (EC 2.4.1.359; Franceus i sur., 2018). S obzirom na biološko podrijetlo saharoza fosforilaze, sasvim su razumljive određene varijacije u molekulskoj masi proteina (engl. molecular weight, MW), pH vrijednosti optimalnoj za aktivnost ovih enzima i kvaternoj strukturi aktivnog enzima, kao što je to prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Neke osnovne karakteristike saharoza fosforilaze, koja je izolirana iz različitih mikroorganizama.

mikroorganizam	molekulska masa [Da]¹	optimalni pH²	kvaterna struktura	izvor
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	58 000	6,0-6,5 (48°C)	dimer	Van den Broek i sur. (2004)
<i>Bifidobacterium longum</i>	56 000	6,8 (42°C)	/ ³	Kim i sur. (2003)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	60 000	6,5-7,0 (30°C)	monomer	Goedl i sur. (2007)
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	52 000	6,0 (45°C)	monomer	Kasperowicz i sur. (2009)
<i>Streptococcus mutans</i>	55 000	6,5 (37°C)	monomer	Robeson i sur. (1983)

¹ molekulska masa je procijenjena natrij-dodecil-sulfat poliakrilamidnom gel elektroforezom (engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

² optimalni pH pri temperaturi navedenoj u zagradama

³ kvaternarna struktura enzima nije određena

2.1.2. Struktura enzima

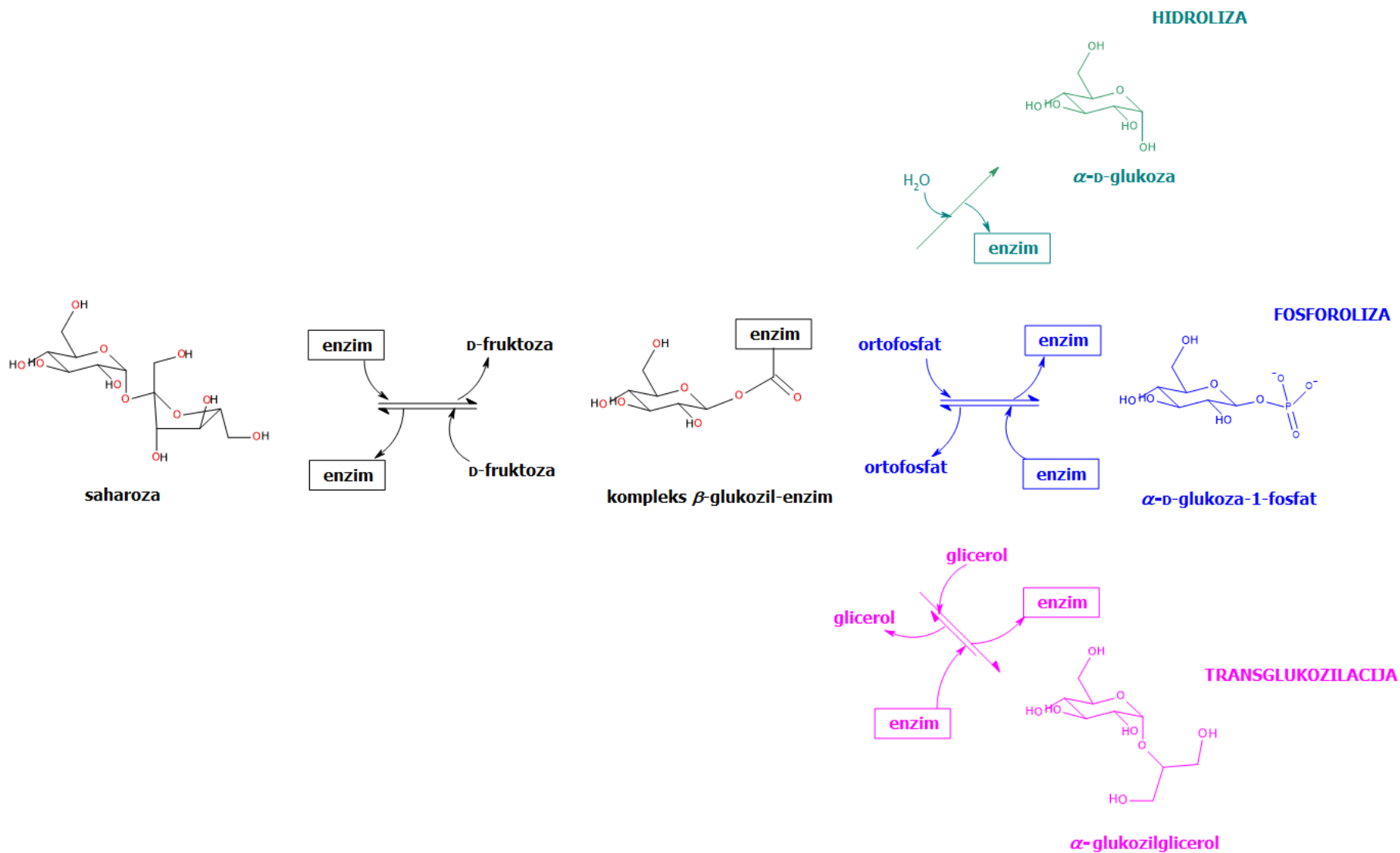
Sprogøe i sur. (2004) su na temelju kristalne strukture saharoza fosforilaze, koja je izolirana iz *Bifidobacterium adolescentis*, formirali prvi trodimenzionalni model ovog enzima (Slika 2.a). Polipeptidni lanac enzima tvori kvaternu strukturu koja sadrži četiri domene: A, B, B' i C (Slika 2.b).

Domena A ima oblik $(\beta/\alpha)_8$ -bačve (engl. barrel), strukture koja je karakteristična za katalitičku domenu enzima iz skupine GH13. U aktivnom mjestu saharoza fosforilaze ključna su tri bočna lanca - dva bočna lanca asparaginskih kiselina i jedan bočni lanac glutaminske kiseline. Domena B sastavljena je od dvije kratke antiparalelne β -nabrane ploče i dvije kratke α -uzvojnice, dok je domena B' zavijena regija s jednom dugom α -uzvojnicom. Ova α -uzvojnica B' domene ograničava mjesto za pristup potencijalnog supstrata i time zapravo povećava specifičnost saharoza fosforilaze prema supstratima u odnosu na druge enzime iz skupine GH13. Oblik domene C nije okarakteriziran u enzimima koji su strukturno bliski saharoza fosforilazi, a radi se o pet antiparalelnih β -nabranih ploča.

2.2. Biološko podrijetlo saharoza fosforilaze

Aktivnost saharoza fosforilaze po prvi put su zabilježili Kagan i sur. (1942). Ovi su autori istraživali aktivnost saharaze i to u stanicama bakterije mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides*. Tijekom eksperimenata su primijetili da se saharoza u prisutnosti fosfata fosforolizira do glukoza-1-fosfata i fruktoze.

Neovisno o ovom prvom istraživanju godinu dana kasnije Doudoroff i sur. (1943) su uspješno demonstrirali da suhi preparat bakterije (engl. dried cell preparation) *Pseudomonas saccharophila* može katalizirati reakciju fosforolize saharoze, ali i reverzibilnu reakciju sinteze saharoze pri čemu se odvija i kompetitivna reakcija hidrolize (Slika 3.). U kompetitivnoj reakciji hidrolize saharoze nastaju glukoza i fruktoza.



Slika 3. Reakcije konverzije saharoze, koje može katalizirati saharoza fosforilaza, a koje se odvijaju nakon formiranja kompleksa β -glukozil-enzim: transglukozilacija (reakcije u ružičastoj boji), fosforoliza (reakcije u plavoj boji) i hidroliza (reakcije u zelenoj boji).

Saharoza fosforilaza je dosad izolirana i pročišćena iz bakterija *Pseudomonas saccharophila* (Silverstein i sur., 1967), *Leuconostoc mesenteroides* (Koga i sur., 1991; Kawasaki i sur., 1996) i *Streptococcus mutans* (Russell i sur., 1988).

Gen koji kodira za ovaj enzim je uspješno izoliran iz genoma bakterija *Leuconostoc mesenteroides* (Kitao i Sekine, 1992), *Streptococcus mutans* (Russell i sur., 1988), *Bifidobacterium adolescentis* (Van den Broek i sur., 2004) i *Agrobacterium vitis* (Fournier i sur., 1994). Ovaj je gen uspješno eksprimiran u drugim mikroorganizmima, npr. u bakteriji *Escherichia coli* DH10B (Goedl i sur., 2007), odakle je kodirani protein izoliran i pročišćen i iskazuje enzimsku aktivnost.

Pseudomonas saccharophila je Gram-negativna aerobna bakterija, koja je nakon sekvencioniranja genoma preimenovana i reklasificirana u *Pelomonas saccharophila* (Xie i Yokota, 2005). Saharoza fosforilaza iz ove bakterije izolirana je kroz osam koraka, koji uključuju različite postupke, kako slijedi: taloženje proteina amonijevim sulfatom, odjeljivanje proteina preparativnom tekućinskom kromatografijom na anionskom izmjenjivaču - dietilaminoetil (engl. diethylaminoethyl, DEAE) celulozi, dijalizu i gel filtraciju (Silverstein i sur., 1967). Homogenost izoliranog i pročišćenog proteina potvrđena je analitičkim ultracentrifugiranjem (engl. analytical ultracentrifugation) i gel elektroforezom (engl. gel electrophoresis).

Leuconostoc mesenteroides je Gram-pozitivna fakultativno anaerobna heterofermentativna bakterija mliječne kiseline. Kawasaki i sur. (1996) izolirali su, pročistili i usporedili saharoza fosforilazu izoliranu iz *Leuconostoc mesenteroides* podvrsta *mesenteroides* i *dextranicum*. I u ovim slučajevima izolacija i pročišćavanje su bili višestupanjski postupci, koji obuhvaćaju taloženje proteina amonijevim sulfatom i nekoliko vrsta preparativne tekućinske kromatografije (hidrofobnu kromatografiju, anionsku izmjenjivačku kromatografiju, gel-filtraciju i ion-izmjenjivačku kromatografiju). Uspješnost izolacije i pročišćavanja saharoza fosforilaze potvrđeno je natrij-dodecil-sulfat poliakrilamidnom gel elektroforezom te je procijenjena molekulska masa ovog proteina izoliranog iz *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* od oko 58 000 Da, dok je molekulska masa proteina izoliranog iz *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* procijenjena na oko 54 000 Da. Ovi se rezultati za molekulsku masu proteina izoliranog iz *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* i *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* malo razlikuju od rezultata za *L. mesenteroides* iz istraživanja Goedl i sur. (2007) (Tablica 1.).

Streptococcus mutans je Gram-pozitivna fakultativno anaerobna bakterija, koja je dio oralne mikrobiote čovjeka. Russell i sur. (1988) su izolirali i pročistili saharoza fosforilazu iz ove bakterije uz primjenu afinitetne kromatografije. Osim toga, ovi su autori gen *gtfA*, koji kodira

ovaj protein i izoliran je iz *S. mutans*, eksprimirali u bakteriji *Escherichia coli* i primijenili prethodno opisan postupak za izolaciju proteina. Protein koji je sintetiziran nakon transformacije *E. coli* imao je identična svojstva kao protein iz *S. mutans*.

Bifidobacterium adolescentis je Gram-pozitivna anaerobna saharolitička bakterija, koja obitava u probavnom traktu sisavaca. Gen *sucP*, koji kodira za saharoza fosforilazu, identificiran je i izoliran iz *B. adolescentis* i eksprimiran je u *E. coli*, pročišćen i okarakteriziran (Van den Broek i sur., 2004). Pri izolaciji ovog proteina korištene su anion-izmjenjivačka kromatografija i gel filtracija, a pročišćenost proteina procijenjena je na temelju rezultata natrij-dodecil-sulfat poliakrilamidne gel elektroforeze.

Osim ovih, drugi primjeri izolacije i nekih osnovnih karakteristika pročišćene saharoze fosforilaze dani su u Tablici 1. u prethodnom poglavlju.

2.2.1. Metode pročišćavanja

Izolirani enzimi navedeni u Tablici 1. nakon izolacije su se pročišćavali korištenjem jedne ili više metoda pročišćavanja poput taloženja solima, dijalizom i kromatografijom.

Taloženje solima, posebice amonijevim sulfatom, jedna je od metoda koje se najčešće koriste pri pročišćavanju proteina. Amonijev sulfat se koristi za taloženje proteina jer: ima visoku topljivost i malu toplinu otapanja, stabilizira strukturu proteina, a viskoznost takvih otopina je niska čak i pri visokim koncentracijama dodane soli (Duong-Ly i Gabelli, 2014). Dodatkom soli u vodenu otopinu proteina utječe se na međusobne interakcije proteina i otapala - vode, pri čemu razlikujemo dvije pojave - usoljavanje i isoljavanje. Usoljavanje se odnosi na povećanu topljivost proteina pri nižim koncentracijama soli, dok povećavanjem koncentracije soli dolazi do taloženja proteina iz otopine, što nazivamo isoljavanjem (Green i Hughes, 1955).

Dijalizom se mogu razdvojiti različite molekule i to na temelju njihove veličine. Naime, molekule različite veličine iz otopine mogu selektivno difundirati kroz membranu, koja ima pore određene veličine. Molekule difundiraju kroz membranu iz područja više koncentracije u područje niže koncentracije i difuzija molekula s jedne na drugu stranu membrane kroz njezine pore odvija se dok se koncentracije molekula ne izjednače s obje strane polupropusne membrane. Veličina pora na odabranoj membrani određuje koje molekule mogu difundirati kroz ovu membranu.

Preparativna ionsko-izmjenjivačka tekućinska kromatografija je metoda za odjeljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju različitih bioloških makromolekula. Kromatografska kolona za ovaj tip kromatografije sadrži stacionarnu fazu, koju čini matrica slična gelu. Matrica je aktivirana određenim specifičnim funkcionalnim grupama. S obzirom na tip ovih funkcionalnih grupa,

možemo razlikovati kationske i anionske izmjenjivače. Kroz kolonu se propušta mobilna faza, pufer a nakon uvođenja otopine proteina, koja sadrži i saharoza fosforilazu, proteini se vezuju na funkcionalne grupe. Odvajanje bioloških makromolekula zasniva se na vezanju analita na pozitivno ili negativno nabijene skupine koje su fiksirane na stacionarnoj fazi i koje su u ravnoteži sa slobodnim suprotnim istonabijenim ionima u mobilnoj fazi (Mayhew i Howell, 1971). Tako se npr. pri pročišćavanju saharoza fosforilaze koristi slabi anionski izmjenjivač dietilaminoetil (DEAE) celuloza, koji veže molekule s negativnim nabojem. Elucija negativno nabijenih molekula (poput saharoza fosforilaze) vezanih na pozitivno nabijenu DEAE celulozu se primjerice postiže dodatkom negativno nabijenih iona, pri čemu će afinitet interakcije stacionarne faze i dodanih aniona nadvisiti jakost interakcije analita i funkcionalne grupe, odnosno povećanjem ionske jakosti eluensa.

U modernoj biotehnološkoj proizvodnji afinitetna kromatografija pripada u grupu vrlo primjenjivih metoda za pročišćavanje proteina, posebice enzima. Ova se metoda zasniva na reverzibilnim biospecifičnim interakcijama pojedinih proteina/enzima s drugim molekulama (ligandima), koji su dostupni u ovako priređenim kromatografskim kolonama. Ove interakcije mogu biti specifične za pojedine grupe proteina (npr. interakcije proteini - ugljikohidrati, enzim - koenzim ili njegov homolog) ili samo za pojedine proteine (npr. enzim - supstrat, antigen - antitijelo). Na ligand, koji je vezan na čvrsti nosač – matricu, tako će se vezati samo proteini koji imaju afinitet prema ligandu, dok će ostale molekulske vrste proći kroz kolonu zajedno s mobilnom fazom bez vezanja na ligand (Mayers i van Oss, 1998).

Gel filtracija je kromatografska metoda kojom se molekule odjeljuju na temelju razlike u njihovoj veličini. Tako veće molekule, koje zbog svoje veličine ne mogu proći kroz pore u gelu (matrici), zaobilaze čestice gela i prolaze kroz kolonu oko ovih čestica. Na taj način veće molekule prevaljuju kraći put kroz kolonu. Manje molekule mogu proći kroz pore u gelu i tako, uz mobilnu fazu, prolaze dulji put od većih molekula. Dakle, manje molekule prolaze kroz pore u gelu, ali i između čestica gela (Smeck i Arnold, 1983). Stoga se veće molekule prije eluiraju iz kolone, dok se manje molekule kasnije eluiraju iz ovog tipa kolone.

2.2.2 Metode određivanja stupnja pročišćenosti

Analitičko ultracentrifugiranje (engl. analytical ultracentrifugation) je metoda za izdvajanje molekula i karakterizaciju njihovih fizikalnih svojstava, kao što su sedimentacijski koeficijent, molekulska masa i parcijalni volumen molekule. Ovom metodom može se utvrditi stupanj pročišćenosti molekule, zatim mogućnosti disocijacije i asocijacije molekula, kao i potencijalne interakcije između liganda i proteina (Cole i sur., 2008). Analitičko centrifugiranje

se provodi u ultracentrifugama s optičkim sustavom koji prati pokretanje molekula tijekom centrifugiranja u zadanim uvjetima. Na ovaj je način određena konstanta sedimentacije za saharoza fosforilazu, koja je izolirana i pročišćena iz *Pseudomonas saccharophila*, i ona iznosi 5,2 Svedberg (Silverstein i sur., 1967). Svedberg (Sv) je jedinica sedimentacijskog koeficijenta, i jedan Sv iznosi 10^{-13} sekundi. Koeficijent sedimentacije karakteristika je saharoza fosforilaze, koja ovisi o veličini molekule ovog enzima, a kojom se opisuje brzina taloženja ove molekule iz otopine ili suspenzije pod djelovanjem centrifugalne sile.

Gel elektroforeza je metoda kojom se mogu razdvojiti molekule s nabojem u gelu potopljenom u puferu, i to djelovanjem električnog polja. Ovom metodom se u biotehnologiji obično razdvajaju proteini i nukleinske kiseline. Nabijene molekule putuju kroz gel različitim brzinama i to prema elektrodi suprotnog naboja i zbog toga se razdvajaju u ovom gelu. Molekule s većim omjerom naboja i molekulske mase (tzv. veće gustoće naboja) se brže gibaju u puferu kroz gel prema elektrodi suprotnog naboja, dok se molekule manje gustoće naboja sporije gibaju. Škrob je polimer koji se može koristiti za pripremu gela za horizontalnu gel elektroforezu i čijom se uporabom dobiva efekt molekularnog prosijavanja molekula s nabojem, koje treba razdvojiti. U ovom slučaju razdvajanje proteina se ne bazira na razlici u gustoći naboja, već na razlici u njihovoj veličini i obliku (Divall, 1988). Poliakrilamidni gel formira se polimerizacijom monomera akrilamida u poliakrilamid u prisustvu bifunkcionalnih monomera (eng. crosslinker), koji omogućavaju unakrsno povezivanje lanaca poliakrilamida. Gel elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) može se provesti u različitim izvedbama (u cjevčicama, vertikalno, horizontalno) i to pri različitim uvjetima (razdvajanje nativnih ili denaturiranih molekula), a može se provesti kontinuirano i diskontinuirano. Diskontinuirana elektroforeza koristi dva gela: gel za koncentriranje (eng. stacking gel) i gel za razdvajanje (eng. running gel), pri čemu uzorak prvo prolazi kroz gel za koncentriranje gdje se komponente odvajaju i koncentriraju prema njihovoj ionskoj pokretljivosti, dok se ulaskom u gel za razdvajanje počinju razdvajati i na temelju oblika i veličine, jer je taj gel sazdan od manjih pora u odnosu na pore gela za koncentriranje. Diskontinuiranost provođenja elektroforeze postiže se uporabom poliakrilamidnih gelova različite poroznosti, puferskih sistema i jačine električnog polja, a koristi se zbog učinkovitijeg i bržeg razdvajanja uzorka) (Cooksey, 1971). Natrij-dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) vrlo je raširena elektroforetska metoda, jer se ovom denaturirajućom metodom relativno lako postiže razdvajanje proteina, koje ovisi isključivo o relativnoj molekularnoj masi proteina iz uzorka (djelovanje gela kao molekularnog sita). Ovakvo razdvajanje moguće je jer se oko 1,4 g natrij dodecil sulfata (SDS-a) veže po jednom gramu proteina, pri čemu se uništavaju gotovo sve nekovalentne interakcije u proteinu, čime oblik

molekule prestaje biti čimbenikom razdvajanja. Nadalje, negativni naboj koji je posljedica vezanja SDS-a na protein znatno je veći od nativnog naboja, koji time u potpunosti gubi na važnosti u razdvajanju proteina. (Dunbar, 1987).

2.3 Reakcije koje katalizira saharoza fosforilaza

Samo izolirani i pročišćeni enzimi se mogu uspješno karakterizirati. Zbog njihove primjene u modernoj biotehnološkoj proizvodnji, aktivnost pročišćenih enzima u definiranim uvjetima, a poželjno je da to budu proizvodni (industrijski) uvjeti, jedna je od najvažnijih karakteristika enzima.

Saharoza fosforilaza je bakterijski citosolni enzim, koji može katalizirati različite reakcije: fosforolizu i sintezu, hidrolizu i transglukozilaciju (Slika 3.). U reakciji fosforolize intermedijer u kojem je glukozil vezan na enzim kovalentnom vezom reagira s ortofosfatom koji se naknadno vezao u aktivno mjesto i nastaje α -D-glukoza-1-fosfat. Sinteza molekule donora glikozila (supstrata) je reakcija koja se odvija u suprotnom smjeru od smjera reakcije fosforolize. Do hidrolize dolazi ukoliko u aktivno mjesto umjesto anorganskog fosfata ili drugog akceptora glukozila dospije voda, pri čemu se kovalentna veza kompleksa β -glukozil-enzim ireverzibilno cijepa te kao produkt ove reakcije nastaje glukoza. Transglukozilacija je reakcija u kojoj se glukoza od donora (npr. saharoza) prenosi na različite molekule akceptora (npr. glicerol).

2.3.1. Reakcijski mehanizam

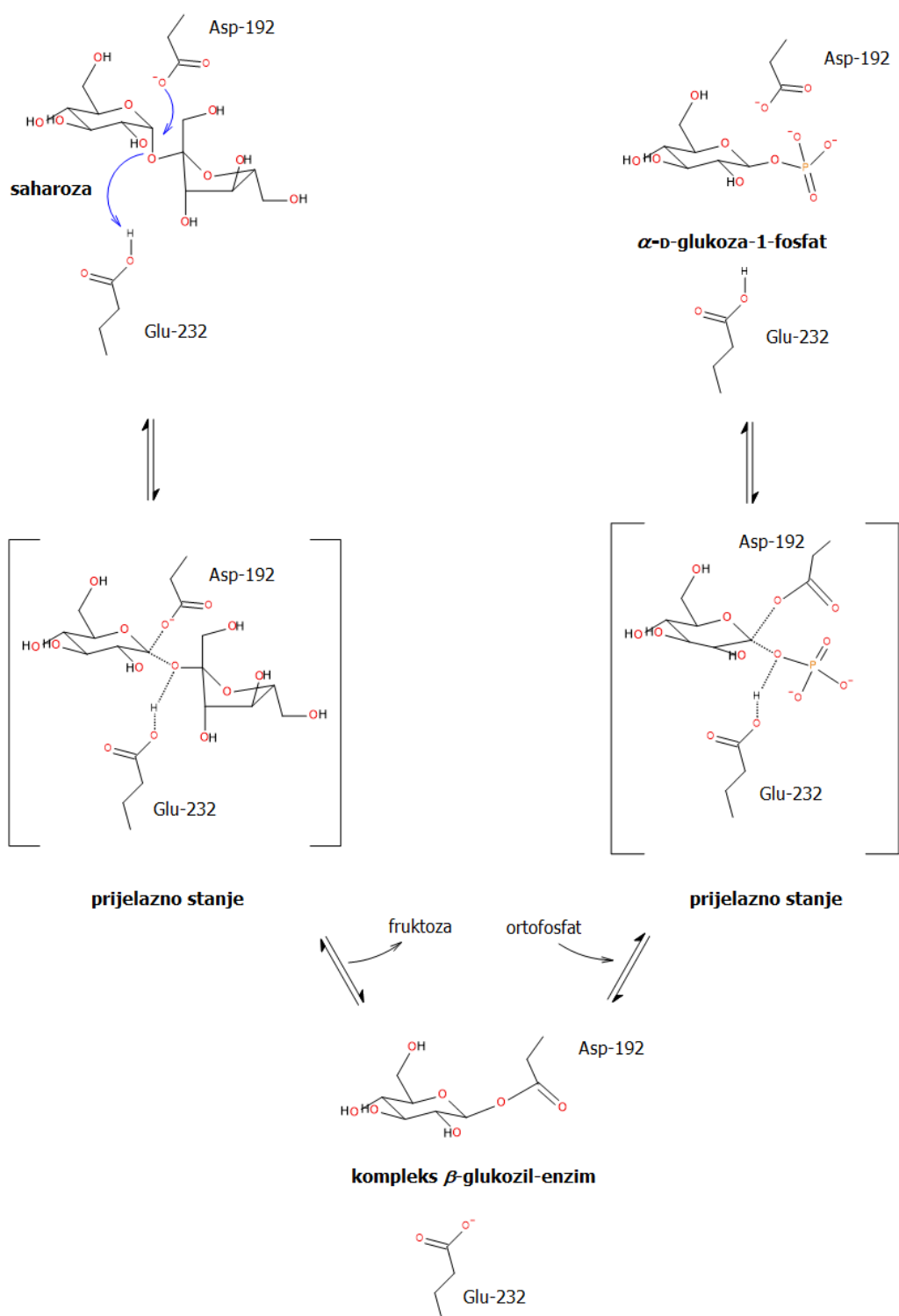
Saharoza fosforilaza katalizira prije opisane reakcije (Slika 3.) mehanizmom dvostruke zamjene tzv. ping-pong mehanizmom i to tipa Bi-Bi. Naziv mehanizma ping-pong ili dvostruka zamjena odnosi se na činjenicu da se prvi produkt otpušta s enzima (iz kompleksa) prije vezanja drugog supstrata (Guibert i Monsan, 1988). Bi-Bi reakcija podrazumijeva reakciju u kojoj sudjeluju dva supstrata (npr. saharoza i fosfat) i kojom nastaju dva produkta (npr. α -D-glukoza-1-fosfat i D-fruktoza).

Tijekom konverzije supstrata (npr. saharoze; Slika 3.) u reakcijama koje katalizira saharoza fosforilaza, nastaje intermedijer (međuspoj) tj. kompleks β -glukozil-enzim (Slika 3.). Ukoliko se razmatra anomerna konfiguracija supstrata i produkata ove enzimski katalizirane reakcije, ovdje ne dolazi do promjene anomerne konfiguracije. Naime, u reakciji koju katalizira saharoza fosforilaza odvijaju se dva konfiguracijsko invertirajuća pomaka - (1) cijepanje C-O veze u donoru glukozilne skupine, pri čemu nastaje kompleks β -glukozil-enzim, i (2) reakcije nastalog kompleksa s akceptorom glukozila.

Ovaj enzim pokazuje visoku regiospecifičnost i eksperimentalno je utvrđeno da njegova aktivnost ne ovisi o kofaktorima ili kosupstratima (Goedl i sur., 2007).

Denaturirani oblik intermedijera tj. kompleksa β -glukozil-enzim je uspješno izoliran i potvrđeno je da ovaj kompleks sadrži jedan mol glukoze po molu enzima (Silverstein i sur., 1967). Voet i Abeles (1970) dokazali su formiranje β -konfigurirane *O*-glikozidne veze između karboksilne skupine bočnog lanca asparaginske kiseline u aktivnom mjestu enzima i glukozila. Mirza i sur. (2006) su okarakterizirali promjene strukture aktivnog mjesta saharoze fosforilaze tijekom konverzije saharoze.

Funkcija bočnih lanaca aminokiselina u aktivnom mjestu saharoza fosforilaze potvrđena je kinetičkom karakterizacijom relevantnih mutanata te je iz ovih istraživanja zaključeno da Asp-192 (numeracija aminokiselinskih ostataka prema saharoza fosforilazi iz *Bifidobacterium adolescentis*) ima ulogu katalitičkog nukleofila, Glu-232 djeluje kao katalitička kiselina/baza, dok je anionski bočni lanac Asp-290 selektivni stabilizator prijelaznog stanja (Schwarz i sur., 2007; Schwarz i Nidetzky, 2006). Opisani mehanizam reakcije prikazan je na Slici 4. i to na primjeru reakcija fosforolize i sinteze supstrata: konverzije saharoze i ortofosfata u α -D-glukoza-1-fosfat i D-fruktozu i povratna reakcija.



Slika 4. Shematski prikaz mehanizma reakcija fosforolize i sinteze saharoze u aktivnom mjestu saharoza fosforilaze do formiranja kompleksa β -glukozil-enzim (prilagođeno iz Sprogøe i sur., 2004).

Prilikom ulaska supstrata u aktivno mjesto enzima, reakcija se pokreće protoniranjem glikozidne veze saharoze, i to od proton-donora Glu-232, i nukleofilnim napadom Asp-192 na

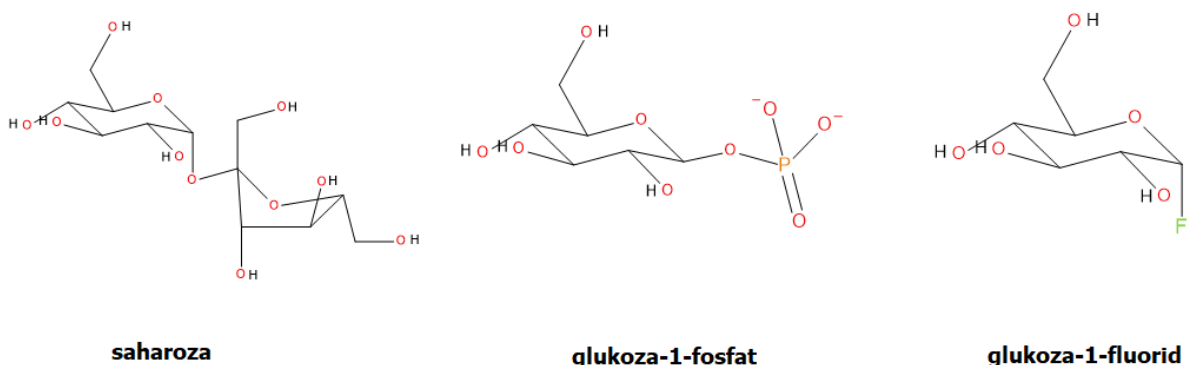
anomerni ugljik glukozila. Na ovaj se način formira kovalentna glikozidna veza između glukozila i enzima i dolazi do otpuštanja D-fruktoze. Nakon što je s enzima disocirao prvi produkt reakcije (D-fruktoza), na enzim se veže drugi nukleofilni supstrat (ortofosfat), koji reagira s kompleksom β -glukozil-enzim i iz ovog kompleksa se oslobađa α -D-glukoza-1-fosfat (drugi produkt), dok aktivno mjesto enzima poprima svoj prvotan oblik.

2.3.2 Raznolikost supstrata i reakcija koje katalizira ovaj enzim

Saharoza fosforilaza *in vivo* uglavnom sudjeluje u kataboličkom metabolizmu ugljikohidrata, gdje provodi reverzibilnu reakciju razgradnje (fosforolize) saharoze na fruktozu i glukozu-1-fosfat, kako je to prikazano na Slici 1. (Anonimus 1, 2020). Naime, u stanicama se anorganski fosfat nalazi u znatno većoj koncentraciji nego je to koncentracija produkata reakcija koje katalizira saharoza fosforilaza, pa je ravnoteža pomaknuta na stranu fosforolize (Goedl i sur., 2007).

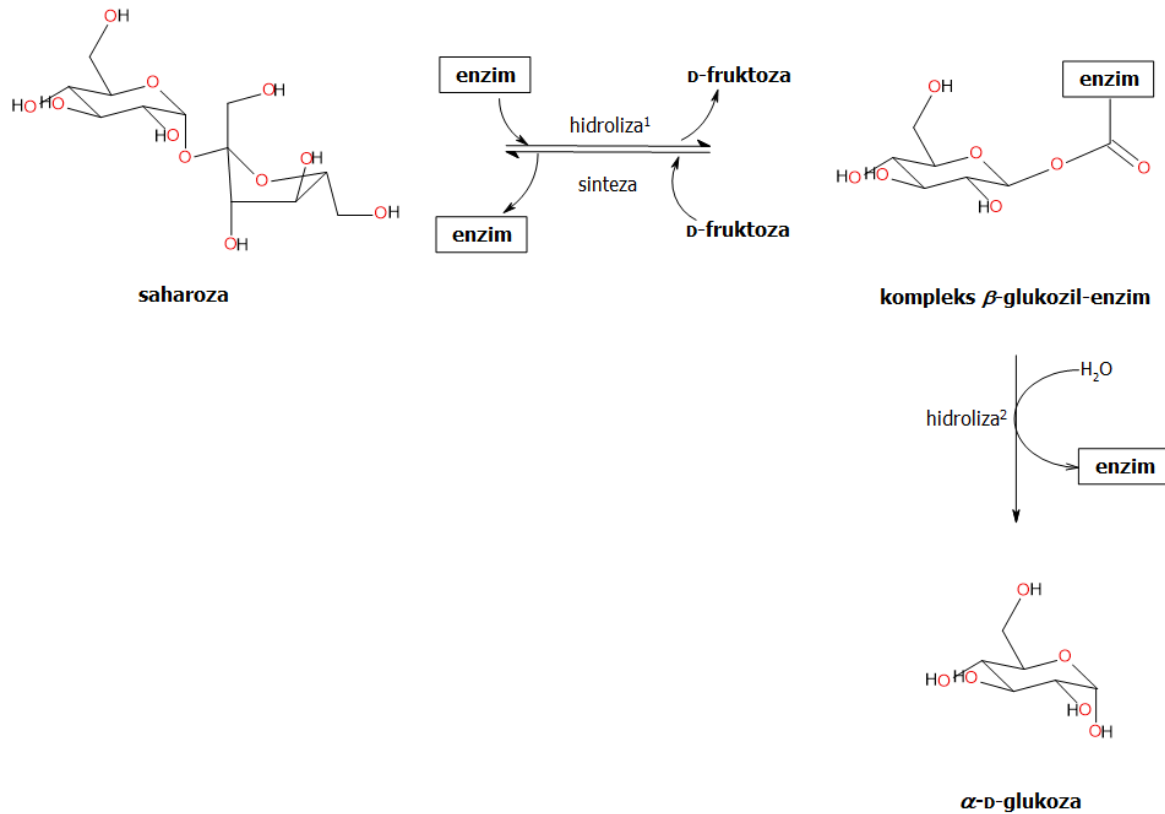
Arsenat može zamijeniti fosfat u ovoj reakciji, pri čemu nastaju fruktoza i α -glukopiranozil arsenat. Ovaj se spoj spontano hidrolitički raspada, što ovu reakciju čini ireverzibilnom.

Istraživanja su pokazala da je saharoza fosforilaza vrlo specifična po pitanju glukozilne podjedinice te ne tolerira velike promjene u strukturi ove skupine (glukopiranozilnog prstena) podložne transferu. Dakle, malo je reaktivnih donora glukozila koji mogu sudjelovati u reakciji transglikozilacije koje katalizira ovaj enzim. Osim saharoze, donori glukozila mogu biti: α -glukoza-1-fosfat i α -glukoza-1-fluorid, koji su prikazani na Slici 5. (prilagođeno iz Mieyal i Abeles, 1972).



Slika 5. Potencijalni donori glukozilne jedinice u reakcijama koje katalizira saharoza fosforilaza.

Reakcija hidrolize supstrata (saharoze) je prikazana na Slici 6. Ova se nepovratna reakcija odvija pedeset puta sporije od reakcije transglukozilacije tj. transfera glukozila na fosfat (Goedl i sur., 2010).

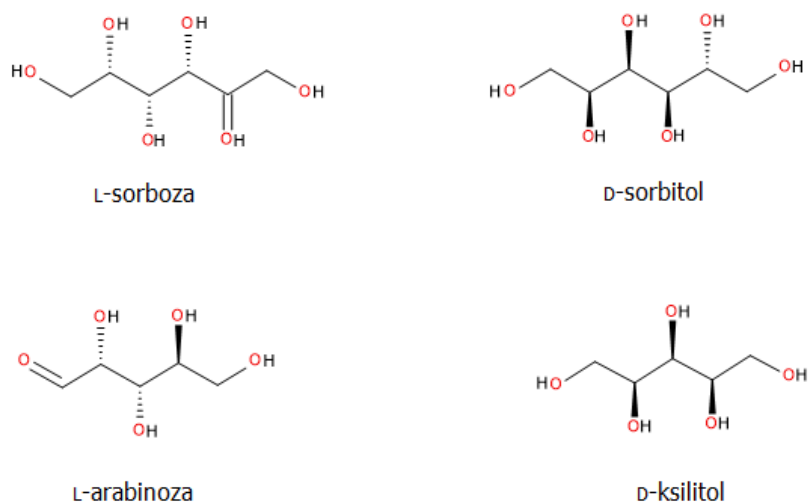


Slika 6. Ireverzibilna hidroliza supstrata (saharoze) do fruktoze i glukoze, koju katalizira saharoza fosforilaza. Hidroliza¹ odnosi se na hidrolizu donora glukozila (saharoze), dok se hidroliza² odnosi na hidrolizu kompleksa β -glukozil-enzim i ove se dvije reakcije odvijaju različitim brzinama.

2.3.3 Transglukozilacija

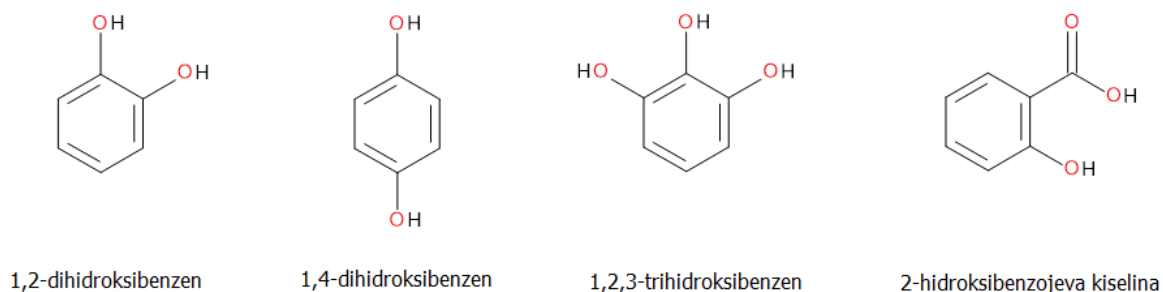
Transfer glukozilne jedinice sa jednog od potencijalnih donora (Slika 5.) na molekulu akceptora pripada u reakcije katalizirane saharoza fosforilazom, pri čemu se zadržava α -konfiguracija donora u krajnjem glukoziliranom produktu. Prijenos glukozila na akceptor odvija se uz snažnu kompeticiju s vodom, što smanjuje konačni prinos produkta. Cijeli niz molekulskih skupina imaju zadovoljavajući glukozilacijski potencijal i smatraju se dobrim akceptorima glukozila.

Van den Broek i sur. (2004) koristili su saharoza fosforilazu kao biokatalizator za glukozilaciju različitih ugljikohidrata i poliola, pri čemu je donor glukozilne skupine bila glukoza-1-fosfat. Istraživan je glukozilacijski potencijal polihidroksilnih akceptora, te su se kao dobri akceptori pokazali L-arabinoza, D-sorbitol, L-sorboza, i D-ksilitol (Slika 7.).



Slika 7. Polihidroksilni akceptori glukozila, koji pokazuju dobar glukozilacijski potencijal.

Nisku specifičnost saharoza fosforilaze iz *Leuconostoc mesenteroides* prema akceptorima demonstrirali su Kitao i Sekine (1994): uspješno su glukozilirani 1,2-dihidroksibenzen, 1,4-dihidroksibenzen, 2-hidroksibenzojeva kiselina i 1,2,3-trihidroksibenzen (Slika 8.), dok su s manjom učinkovitošću glukozilirani i drugi spojevi koji sadrže fenilne i benzilne grupe. Također, zamijećen je efikasniji prijenos glukozilne skupine na hidroksilne grupe u *orto*- i *para*- položaju u odnosu na reaktivnost fenola, pri čemu je OH skupina fenola bolji akceptor od hidroksimetilne, dok karboksilni supstituent ne pokazuje nikakvu reaktivnost.



Slika 8. Akceptori s visokom stupnjem glukozilacije koji sadrže fenil- i benzil-skupine.

Iako Kitao i Sekine (1994) nisu istražili glukozilaciju karboksilne skupine, tu reakciju su zabilježili Sugimoto i sur. (2007). U ovoj reakciji glikozilacije sintetiziran je benzoil-glukozid i to

prijenosom glukoze iz saharoze, a reakciju katalizira saharoza fosforilaza pri kiselim uvjetima. Aktivnost ovog enzima, koji je izoliran iz bakterije *Streptococcus mutans* pri niskim pH vrijednostima, znatno je veća od aktivnosti saharoza fosforilaze izolirane iz *Leuconostoc mesenteroides*.

2.4. Modifikacije saharoza fosforilaze

Proteinsko inženjerstvo je skup metoda namijenjenih ciljanoj promjeni proteinske sekvence postojećih nativnih proteina u svrhu istraživanja njihovih svojstava ili postizanja određenih rezultata, poput povećane stabilnosti pri ciljanim uvjetima (npr. pri različitim temperaturama i pH vrijednostima) ili promjene enzimske specifičnosti. Primjena proteinskog inženjerstva i postizanje ciljanih modifikacija proteina/enzima omogućava istraživanje i uvid u povezanosti biološke funkcije enzima i njihove trodimenzionalne strukture.

2.4.1 Istraživanje katalitičke aktivnosti

U svrhu karakterizacije katalitičkog nukleofila u aktivnom mjestu saharoza fosforilaze iz bakterije *Leuconostoc mesenteroides* D196A, Asp-196 zamijenjen je ne-nukleofilnom aminokiselinom – alaninom (Ala), što je rezultiralo nemogućnošću glukozilacije enzima, odnosno njegovom inaktivacijom (Schwarz i Nidetzky, 2006). Uklanjanje pretpostavljenog nukleofila, koji je ključan za odvijanje katalizirane reakcije u aktivnom mjestu ovog enzima ciljanom mutagenozom, u kombinaciji s kemijskom komplementacijom (engl. chemical rescue) alternativnim nukleofilima, strategija je kojom se nedvojbeno može potvrditi uloga Asp-196 u aktivnom mjestu.

Ostvareni katalitički defekt (nemogućnost stvaranja kompleksa β -glukozil-enzim) djelomično je komplementiran uporabom azida kao vanjskog nukleofila, dok acetat, formijat i halidi nisu povratili aktivnost enzima. Mutant Asp-196-Ala katalizirao je pretvorbu α -glukoza-1-fosfata i azida u β -glukozil-azid i to formiranjem ternarnog kompleksa. Za razliku od mehanizma dvostruke zamjene kod nativnog enzima (divljeg tipa), koji omogućava retenciju konformacije glukoze, ova promjena (Asp-196-Ala) rezultirala je stereokemijskom inverzijom glukozilne skupine iz α - u β -konformaciju.

Hipotetska uloga katalitičke kiseline/baze Glu-237 u aktivnom mjestu saharoza fosforilaze iz bakterije *Leuconostoc mesenteroides* istražena je ciljanom mutacijom Glu-237 u glutamin te je provedena detaljna usporedba aktivnosti divljeg tipa i mutantnog enzima – Glu-237-Gln (Schwarz i sur., 2007). Enzimske reakcije, primjerice fosforilaza saharoze, koje

katalizira mutirani oblik enzima, u slučajevima kada supstrati sadrže nukleofil ili tzv. loše odlazeće grupe (npr. fruktozu), bile su usporene za pet redova veličine u usporedbi s brzinom reakcije koju katalizira nativni enzim. Zanimljivo je da brzine reakcije na koje kiselinško-bazna kataliza nema velikog utjecaja nisu bile značajno promijenjene, što ide u prilog pretpostavci da će gubitak utjecaja katalitičke kiseline/baze Glu-237 na loše odlazeće grupe otežati nastajanje kompleksa β -glukozil-enzim.

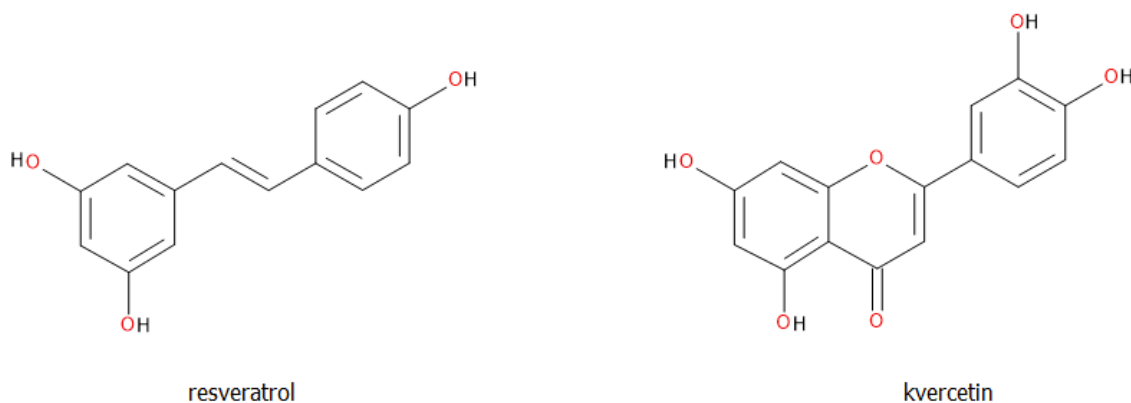
Kemijska komplementacijom azidom, acetatom i formijatom djelomično je povratila katalitičku aktivnost mutiranog oblika enzima (Glu-237-Gln), dok halidi nisu imali utjecaja na aktivnost modificiranog enzima. Prisutnost vanjskih nukleofila poput azida u uvjetima u kojima stupanj deglukozilacije određuje brzinu reakcije i pospješuje proizvodnju odgovarajućih α -glukozila, pospješila je katalitičku aktivnost mutiranog oblika enzima do 330 puta. Kemijskom komplementacijom katalitičke aktivnosti mutanta acetatom i formijatom nastaju odgovarajući α -glukoza-1-esteri, no kod ovih se nestabilnih spojeva relativno brzo odvija spontana migracija acetatne, odnosno formijatne skupine i raspadaju se u reakciji hidrolize.

Istražen je i utjecaj pH vrijednosti na kinetički izdvojene reakcije glukozilacije i deglukozilacije za nativni i mutirani oblik enzima. Rezultati upućuju na mehanizam u kojem vrijednost konstante disocijacije kiseline (pK_a) Glu-237 varira između 7,2 za slobodni enzim i 5,8 za kovalentni intermedijer (kompleks β -glukozil-enzim), čime je osigurano sudjelovanje glutaminske kiseline u katalizi.

2.4.2 Modifikacije u cilju šire primjene

Različiti visokovrijedni produkti mogu nastati reakcijom transglukozilacije, koju katalizira saharoza fosforilaza. Stoga je povećanje broja akceptora u reakciji transglukozilacije jedno od glavnih područja istraživanja primjene ovog enzima i njegovih mutanata. Primjerice Kraus i sur. (2017) su točkastom mutacijom uzrokovali pomak jedne domene enzima (engl. domain shift), čime je omogućeno vezanje i glukozilacija velikih polifenolnih molekula umjesto fosfata.

Polifenoli, koje su koristili u ovom istraživanju, resveratrol i kvercetin (Slika 9.), predmet su intenzivnog istraživanja i to zbog njihovih antitumorskih svojstava i uloge u produljenju životnog vijeka čovjeka (Jang i sur., 1997; Srivastava i sur., 2016). Glukozilacijom ovih spojeva povećava se njihova bioraspodivnost, poboljšava se njihov transport do određenih tipova stanica te bioaktivnost i druga poželjna farmaceutska svojstva (Gantt i sur., 2011).



Slika 9. Struktura polifenola resveratrola i kvercetina - akceptora u reakciji transglukozilacije, koju katalizira saharoza fosforilaza.

Kako bi se omogućilo vezanje aromatskih spojeva u aktivno mjesto saharoza fosforilaze iz bakterije *Bifidobacterium adolescentis*, aminokiselina Gln-345, koja se nalazi u mjestu vezanja akceptora glukozilne skupine, ciljanom modifikacijom je zamijenjena nepolarnom aromatskom aminokiselinom fenilalaninom (Gln-345-Phe). Uvođenje aminokiseline s većim bočnim lancem prostorno je povećalo aktivno mjesto enzima i uzrokovalo odmak domene B od domene B', odnosno došlo je do nastajanja novog oblika aktivnog mjesta. Aromatska priroda mutanta (Gln-345-Phe) omogućava π - π - vezanje i hidrofobne interakcije, koje povećavaju afinitet enzima prema određenim aromatskim supstratima. Uklanjanje glutamina (Gln-345) mutacijom otežalo je vezanje ortofosfata u aktivno mjesto enzima. U reakcijama transglukozilacije mutant preferira 1,2- i 1,3-aromatske diole, odnosno reakcija se odvija na 3-OH skupini resveratrola i 3'-OH skupini kvercetina. Nešto kasnije je kristalografskom analizom trodimenzionalne strukture ovog mutanta utvrđeno da pomak domene, koji je omogućio vezanje aromatskih spojeva u aktivno mjesto enzima, nije ireverzibilna promjena. Točkasta mutacija (Gln-345-Phe) je dovela do dinamičkog reverzibilnog procesa u kojem enzim zauzima dvije različite konformacije - jednu za vezanje donora glukozila i drugu, otvorenu konformaciju za vezanje aromatskog akceptora glukozila (Kraus i sur., 2018).

Saharoza fosforilaza ima veliki potencijal za industrijsku primjenu. Da bi primjena ovog biokatalizatora u industrijskim procesnim uvjetima bila izvediva, poželjno je prilagoditi njene karakteristike industrijskim parametrima. Konverzije ugljikohidrata, koje saharoza fosforilaza

može katalizirati, se u industrijskim uvjetima provode pri temperaturi od 60°C ili višoj i to kako bi se spriječila mikrobna kontaminacija. Za sada nje okarakteriziran termofilni biološki izvor ovog enzima. Cerdobbel i sur. (2011) mutagenezom su značajno poboljšali stabilnost saharoza fosforilaze iz bakterije *Bifidobacterium adolescentis* pri 60°C i time proširili mogućnosti njene komercijalne uporabe. Kako bi postigli veću termostabilnost ovog enzima, koristili su kombinaciju pametne i racionalne mutacije (engl. smart and rational mutagenesis). Pametnom mutacijom se smatra zamjena aminokiselina koje se pojavljuju na najfleksibilnijim mjestima (mjesto koja prolaze kroz najveći broj konformacijskih promjena) u peptidnom lancu s onima koje se češće pojavljuju u srodnim sekvencama, jer se smatra da aminokiseline, koje se propagiraju prirodnom selekcijom, unaprjeđuju stabilnost i/ili aktivnost enzima. Pojam racionalne mutacije se odnosi na proučavanje kristalne trodimenzionalne strukture enzima kako bi se potaknule elektrostatske interakcije na površini enzima te kako bi se stabilizirao dipolni moment α -uzvojnice enzima. Ne postoje opća pravila za povećanje termostabilnosti enzima, ali autori su se služili metodama koje su često u uporabi, poput B-faktor iterativnog testa (engl. B-Factor Iterative Test, B-FIT) kojim su identificirane aminokiseline na mjestima najpodložnijima konformacijskim promjenama u kristalnoj strukturi saharoza fosforilaze (aminokiseline 445-446), i tehnikama koje su se iskustveno pokazale učinkovitima poput uklanjanjem glicina, asparagina i glutamina, te dodavanjem prolina. Cerdobbel i sur. (2011) su kreirali četrnaest različitih mutanata enzima uz korištenje opisane strategije. Od četrnaest ukupno, samo je pet mutanata pokazalo značajno povećanje termostabilnosti. Kombiniranjem svih djelotvornih mutacija u jednu proteinsku sekvencu rezultiralo je mutantom koji je pri temperaturi od 60° imao vrijeme poluživota od 62 h, što je više nego dvostruko povećanje vremena poluživota enzima u usporedbi s nativnim oblikom ovog enzima.

2.5 Primjena saharoza fosforilaze

Proizvodnja visokovrijednih spojeva i spojeva s dodanom vrijednosti se u novije vrijeme zasniva na biokatalitičkim procesima, koji su skoro sasvim zamijenili postupke kemijske sinteze. Kao biokatalizatori u procesima biotransformacija koriste se izolirani i pročišćeni enzimi ili enzimski pripravci, kulture mikroorganizama, kulture biljnih i životinjskih stanica i tkiva te kulture algi. Biokatalitički procesi imaju značajne prednosti nad kemijskom sintezom zbog regiospecifičnosti, stereospecifičnosti, veće reakcijske specifičnosti, redukcije nastanka nusproizvoda, blagih uvjeta u kojima se odvija biokatalitička reakcija, a ove su reakcije u skladu s načelima zelene kemije. Zbog razvoja novih metoda i napretka tehnologija, koje omogućuju poboljšavanje poželjnih karakteristika i stabilnosti enzima, u novije se vrijeme učestalo koriste

biokatalizatori kao glavna alternativa kemijskoj sintezi. Zbog raznolikosti reakcija koje može katalizirati, kao i supstrata koje može koristiti, potencijal saharoze fosforilaze za primjenu u obliku pročišćenog enzima ili cjelovitih mikrobnih stanica je vrlo velik.

2.5.1 Oblici biokatalizatora u uporabi

Slobodni enzimi općenito su namijenjeni jednokratnoj uporabi, pa cijena takvih enzimskih pripravaka treba biti relativno niska kao bi bioproces bio ekonomski održiv. Imobilizacija izoliranog i pročišćenog enzima je metoda koja se često koristi za poboljšanje ekonomičnosti i produktivnosti proizvodnog bioprocasa. Imobilizacija enzima na inertni anorganski ili organski nosač ima razne prednosti, poput veće stabilnosti enzima, jer su imobilizirani enzimi manje osjetljivi na promjene u okolišu, zatim lakše izdvajanje enzima iz reakcijske smjese, mogućnost višekratne uporabe imobiliziranog enzima, jednostavno i naglo prekidanje reakcije te mogućnost vođenja kontinuiranog bioprocasa. Nedostatak imobilizacije enzima je njihova manja aktivnost zbog teže dostupnosti supstrata, odnosno zbog prisutnosti nosača difuzija supstrata u aktivno mjesto enzima i proizvoda iz enzimskog preparata je otežana. Metode imobilizacije mogu se podijeliti na kemijske i fizikalne. Kemijske metode podrazumijevaju kovalentno vezanje ili unakrsno vezanje enzima na ili u nosač, dok fizikalne metode obuhvaćaju adsorpciju na nosač (molekulskim i elektrostatskim silama), vezanje u nosač (formiranje mikro-kapsula, hvatanje enzima u matricu), korištenje dvofaznih sustava i uporabu ultrafiltracijskih membrana (Datta i sur., 2013).

Korištenje cjelovitih mikrobnih stanica umjesto pročišćenog enzima ili enzimskih pripravaka ima niz prednosti. Uporaba pročišćenih enzima u industriji podrazumijeva ekonomski zahtjevnije postupke izolacije i pročišćavanja enzima, dok je uporaba cjelovitih mikrobnih stanica znatno jeftinija, jer se glavni trošak ovog potonjeg odnosi na trošak uzgoja stanica. Također, kako se enzimi u cjelovitim stanicama nalaze u prirodnom okruženju, vrlo su stabilni te su prisutni svi potrebni kofaktori koji se regeneriraju u staničnom metabolizmu. Značajan problem kod primjene cjelovitih stanica kao biokatalizatora je selektivni transport supstrata u stanicu i transport nastalih produkata iz stanice. Moguća rješenja su korištenje postojećih sustava za transmembranski transport iz stanicama ili, češće, permeabilizacija stanica kemijskim i fizikalnim metodama. Permeabilizacija stanica postupak je kojim se narušava struktura stanične stjenke i membrane tako da se omogući lakši transport određenih otopljenih tvari u i iz stanice i to bez bitnijeg narušavanja metaboličke aktivnosti (Chen, 2007).

2.5.2 Potencijalne primjene u prehrambenoj industriji

Proizvodnja šećera, prvenstveno saharoze, na globalnoj razini je u porastu i ova proizvodnja prati trend povećanja potrošnje šećera: između 2001. i 2018. u svijetu se konzumacija šećera povećala sa 123 454 na 172 441 milijuna tona, što je ekvivalentno prosječnom godišnjem porastu od 2,01% (Anonimous 2, 2020).

Saharoza je nereducirajući disaharid koji se u prirodi pojavljuje u slatkim sokovima biljaka. Komercijalni šećer dobiva se iz šećerne trske i šećerne repe ekstrakcijom i pročišćavanjem te je dostupan u obliku koncentrirane otopine (tekući šećer) ili u kristalnom obliku.

Fruktoza je prirodni monosaharid, koji se može izolirati iz većine plodova voća te se često pojavljuje vezan sa glukozom u saharozu. Dio je raznih sirupa poput invertnog šećernog sirupa, izoglukoznog sirupa i visoko fruktoznog kukuruznog sirupa te se kao proizvod nalazi i u kristalnom obliku. U svojoj čistoj kristalnoj formi fruktoza je skoro dva puta slađa od saharoze te je slađa od svih prirodnih šećera (ugljikohidrata), zbog čega je primamljiva njena uporaba kao zaslađivača. Također, osobe s dijabetesom smiju konzumirati fruktozu, a k tomu ovaj monosaharid ne doprinosi propadanju zuba (BeMiller, 2019).

Prvotno je biotehnoška primjena saharoza fosforilaze bila usmjerena na iskorištavanje reakcije fosforilacije u prehrambenoj industriji, primjerice za proizvodnju saharoze, proizvodnju fruktoze, te sintetskih šećera i novih disaharida (Vandamme i sur., 1987).

Istraživali su se različiti supstrati za dobivanje saharoze poput škroba, inulina i celuloze, koji se enzimskim postupkom mogu konvertirati do glukoza-1-fosfata i fruktoze. Škrob se enzimski hidrolizira pomoću amilaza (EC 3.2.1.1) i amiloglukozidaza (EC 3.2.1.3) u glukozu, koja se onda izomerizira glukoza izomerazom (EC 5.3.1.5) u fruktozu (Anonimus 1, 2020). Iz škroba se može dobiti i drugi supstrat, glukoza-1-fosfat, primjenom amilofosforilaze (EC 2.4.1.1.1) (Anonimus 1, 2020). Enzimski dobivene supstrate za reakciju sinteze (glukoza-1-fosfat i fruktoza) saharoza fosforilaza konvertira u saharozu i ortofosfat. Kontinuirana proizvodnja saharoze postignuta je koimobilizacijom škroba i saharoza fosforilaze, a prinos ove enzimske reakcije je povećan do 25% odvođenjem saharoze iz reakcijske smjese (Vandamme i sur., 1987).

Fruktoza se može pomoću saharoza fosforilaze proizvoditi iz saharoze. Iako se radi o povratnoj reakciji (Slika 3.), ovaj način proizvodnje ima svojevrzne prednosti: produkti reakcije se međusobno lako razdvajaju; glukoza-1-fosfat, koji je u ovom slučaju nusprodukt, može se

dalje valorizirati, a troškovi pročišćavanja produkata reakcije mogu se minimalizirati uporabom čistog supstrata.

Kako saharoza fosforilaza nije jako specifična s obzirom na akceptor glukozilne jedinice, pomoću ovog enzima moguće je sintetizirati sasvim nove spojeve ili rijetke ugljikohidrate, koje ne možemo izolirati iz prirode. Primjerice, reakcijom transglukozilacije sintetiziran je glukooligosaharid glukoza-ksilitol, koji je izoliran i pročišćen iz stanica bakterije *Leuconostoc mesenteroides* (Kitao i Sekine, 1992). Ksilitol i njegovi derivati koriste se kao zaslađivači, jer se metaboliziraju neovisno o inzulinu i vrlo učinkovito preveniraju zubni karijes. Morimoto i sur. (2015) su demonstrirali aktivnost saharoza fosforilaze prema osam različitih ketoheksosa, koje su bile glukozilirane i proizvedeni su rijetki disaharidi, pri čemu je glukoza-1-fosfat služio kao donor glukozila.

2.5.3 Primjena u farmaceutskoj industriji

Saharoza fosforilaza može se koristiti za biosintezu različitih glukoziliranih visokovrijednih spojeva ili spojeva s dodanom vrijednosti, koji imaju vrlo važnu ulogu u farmaceutskoj industriji. Glukozilacija određenog spoja može izuzetno pozitivno utjecati na njegove karakteristike. Glukozilna skupina može povećati topljivost, stabilnost i farmakokinetička svojstva određenog kemijskog spoja te može biti presudna za biološku aktivnost tog spoja.

Kitao i Sekine (1994) proveli su transglukozilaciju fenolnih spojeva, od kojih je jedan bio hidrokinon. Glukozilacijom hidrokinona nastaje hidrokinon-*O*- α -D-glukopiranozid (α -arbutin). Kako bi se maksimizirala količina produkta u reakciji transglukozilacije, potrebne su veće koncentracije akceptora od donora glukozila. Oko 2,3 grama pročišćenog α -arbutina dobiveno je iz 2,0 grama hidrokinona, pri čemu je donor glukozilne jedinice bila saharoza.

Dihidroksibenzeni i njihovi derivati, poput hidrokinona i arbutina, koriste se kao antipiretici ili antiseptici u kozmetici, zatim kao antioksidansi ili kao inhibitori melanogeneze, biosinteze melanina. Tirozinaza (EC 1.14.18.1) jedan je od ključnih enzima procesa melanogeneze u melanocitima. Budući da dihidroksibenzeni, posebice hidrokinon, imaju snažan inhibitorni učinak na tirozinazu, ti spojevi su korišteni za liječenje melanoze i drugih hiperpigmentacijskih poremećaja. Uporaba hidrokinona je ograničena, jer ovaj spoj iritira kožu čovjeka i lako oksidira u vodenom okruženju, što rezultira posmeđivanjem otopine. S druge strane, arbutin (hidrokinon-*O*- β -D-glukopiranozid) je stabilan, ne izaziva opisane nuspojave, no njegov inhibitorni učinak na tirozinazu je umjeren. Zbog strukturne sličnosti α -arbutina sa arbutinom, očekuje se da će glikozilirani spoj iskazati vrlo slična fiziološka svojstva.

Prva primjena saharoza fosforilaze u velikom industrijskom mjerilu i to u proizvodnji više stotina kilograma krajnjeg proizvoda godišnje je enzimska proizvodnja glukozilglicerola, koji je na tržištu predstavljen kao komercijalni proizvod za kozmetičke primjene pod imenom Glycoin® (Luley-Goedl i sur., 2010).

Glukozilglicerol, kao i drugi njemu slični glikozilgliceroli, je snažan osmolit. Osmoliti su visoko topljive, netoksične molekule male molekulske mase, koje se nakupljaju u citoplazmi biljnih i bakterijskih stanica kao odgovor na ekstremne vanjske uvijete (pH, temperatura, osmotski tlak). Pod ekstremnim uvjetima osmoliti održavaju osmotski potencijal i fiziološku aktivnost stanice. Glukozilglicerol, koji je glavni osmolit u fotosintetskim bakterijama, istraživan je zbog obećavajuće primjene kao hidratantnog sredstva u kozmetičkim preparatima. Također, potencijalne primjene glukozilglicerola su kao niskokaloričnog zaslađivača, koji ne utječe štetno na zube, i kao stabilizatora proteina i stanica.

Luley-Goedl i sur. (2010) su optimizirali transglukozilaciju glicerola za industrijsku proizvodnju, gdje je donor glukozila saharoza. Pri temperaturi od 30°C i pH vrijednosti od 7,0 korišten je nepročišćeni stanični ekstrakt (engl. crude cell extract) bakterije *E. coli*, koji je sadržavao rekombinantnu saharoza fosforilazu. Aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi je bila 20 U/mL, te je postignut visok prinos produkta (iznad 85%). Tako visoka učinkovitost ove enzimski katalizirane reakcije je glavni pokazatelj da se reakcija hidrolize, koju također katalizira ovaj enzim, odvija zanemarivom brzinom. Opisana visoka učinkovitost enzimске reakcije transglukozilacije ostvaruje se u uvjetima pri dvostruko većoj početnoj koncentraciji glicerola (akceptor glukozila) od koncentracije saharoze (donor glukozila). Eksperimentalno je utvrđeno da nije potreban visok stupanj pročišćenosti rekombinantnog enzima. Većina transformacije saharoze u glukozilglicerol odvija se kroz prva 24 sata, nakon čega se postiže ravnoteža i koncentracije preostalih reaktanata ostaju gotovo konstantne. Ovakav vremenski profil reakcije ima veliku tehnološku prednost, jer vrijeme bioprocasa u reaktoru ne mora biti strogo regulirano, kao što je to potrebno kod proizvodnje nestabilnijih proizvoda.

3. ZAKLJUČCI

1. Saharoza fosforilaza je bakterijska citosolna glikoziltransferaza molekulske mase monomernog oblika enzima od oko 60 000 Da. Ovaj enzim se može izolirati iz relativno malog broja bakterijskih vrsta, češće u dimernom obliku. Optimalni uvjeti za aktivnost ovog enzima ovise o njegovom biološkom izvoru i kreću se u rasponu pH vrijednosti 6,0-7,0 jedinica pri temperaturama 30-48°C.
2. U reakciji sa supstratom (npr. saharozom) ovaj enzim formira kompleks β -glukozil-enzim (i oslobađa se D-fruktoza). Dalje formirani kompleks β -glukozil-enzim može sudjelovati u četiri različite reakcije: fosforolizi, sintezi, hidrolizi i transglukozilaciji. U reakciji fosforolize kompleks β -glukozil-enzim reagira s ortofosfatom, koji se naknadno vezao u aktivno mjesto ovog enzima, i nastaje α -D-glukoza-1-fosfat. Sinteza molekule donora glikozila (supstrata, npr. saharoze) je reakcija koja se odvija u suprotnom smjeru od smjera reakcije fosforolize. Do hidrolize dolazi ukoliko u aktivno mjesto enzima umjesto akceptora glukozila dospije voda. Pri tomu se kovalentna veza kompleksa β -glukozil-enzim ireverzibilno cijepa i kao produkt ove reakcije nastaje glukoza. Transglukozilacija je reakcija u kojoj se glukozil od donora (npr. saharoze) prenosi na različite molekule akceptora (npr. glicerol), pri čemu nastaju visoko vrijedni α -konfigurirani glukozilirani spojevi (npr. glukozilglicerol).
3. Saharoza fosforilaza katalizira opisane reakcije mehanizmom dvostruke zamjene tzv. ping-pong mehanizmom i to tipa Bi-Bi. Ping-pong mehanizam odnosi se na činjenicu da se prvi produkt (npr. D-fruktoza) otpušta s enzima (iz kompleksa β -glukozil-enzim) prije vezanja drugog supstrata. Bi-Bi reakcija podrazumijeva sudjelovanje dvaju supstrata (npr. saharoze i ortofosfata) i nastanak dvaju produkata enzimski katalizirane reakcije (npr. α -D-glukoza-1-fosfata i D-fruktoze).
4. Primjenom točkastih mutacija okarakterizirana su tri ključna bočna lanca aminokiselina u aktivnom mjestu saharoze fosforilaze, koja sudjeluju u opisanim reakcijama: Asp-192 (katalitički nukleofil), Glu-232 (katalitička kiselina/baza) i Asp-290 (stabilizator prijelaznog stanja). Osim toga, primjenom bioinformatičkih metoda i metoda genetičkog inženjerstva eksperimentalno je potvrđeno sudjelovanje drugih aminokiselina u formiranju aktivnog mjesta ovog enzima, te je proširen broj akceptora glukozila različite veličine (polihidroksilni spojevi, spojevi s fenil- i benzil-grupama i polifenolni spojevi).

5. Preostaje napraviti mutante ovog enzima koji imaju zadovoljavajuću stabilnost u uvjetima industrijske proizvodnje i na taj način proizvode visokovrijedni glukozilirani proizvodi s primjenom u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (npr. glukozilglicerol).

4. LITERATURA

- Anonimus 1 (2020). *BRENDA*. The Comprehensive Enzyme Information System. <<https://www.brenda-enzymes.org>>
Datum pristupanja: 30. travnja 2020.
- Anonimus 2 (2020). *International Sugar Organization*. <<https://www.isosugar.org/>>
Datum pristupanja: 11. svibnja 2020.
- BeMiller J. N. (2019). Carbohydrate and Noncarbohydrate Sweeteners. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, 3. izd., Elsevier Inc. str. 380–383.
- Cantarel B. I., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, **37**: 233–238.
- Cerdobbel A., De Winter K., Aerts D., Kuipers R., Joosten H. J., Soetaert W., Desmet T. (2011) Increasing the thermostability of sucrose phosphorylase by a combination of sequence- and structure-based mutagenesis. *Protein Engineering, Design and Selection*, **24**: 829–834.
- Chen R. R. (2007) Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**: 730–738.
- Cole J. L., Lary J. W., Moody T., Laue, T. M. (2008) Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. *Methods in Cell Biology*, **84**: 143–179.
- Cooksey K. E. (1971) Disc Electrophoresis. *Methods in Microbiology*, **5**: 573–594.
- Datta S., Christena L. R., Rajaram Y. R. S. (2013) Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3Biotech*, **3**: 1–9.
- Divall B. (1988) Starch gel electrophoresis of proteins. U: *Methods in Molecular Biology*, 1. izd., Walker J.M., ur., Metropolitan Police Forensic Science Laboratory, Humana Press, str. 97–104.
- Doudoroff M., Kaplan N., Hassid W. Z. (1943) Phosphorolysis and synthesis of sucrose with a bacterial preparation. *Journal of Biological Chemistry*, **148**: 67–75.
- Dunbar B. S. (1987) *Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*, 1. izd., Springer. str. 67–76.
- Duong-Ly K. C., Gabelli S. B. (2014) Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. U: *Methods in Enzymology*, sv. 541, Academic Press Inc. str. 85–94.

- Fournier P., de Ruffray P., Otten, L. (1994) Natural instability of *Agrobacterium vitis* Ti plasmid due to unusual duplication of a 2.3-kb DNA fragment. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **2**: 164–172.
- Franceus J., Decuyper L., D’hooghe M., Desmet T. (2018) Exploring the sequence diversity in glycoside hydrolase family 13_18 reveals a novel glucosylglycerol phosphorylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**: 3183–3191.
- Franceus J., Pinel D., Desmet T. (2017) Glucosylglycerate phosphorylase, an enzyme with novel specificity involved in compatible solute metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**:1–13.
- Gantt R. W., Peltier-Pain P., Thorson J. S. (2011) Enzymatic methods for glyco(diversification/randomization) of drugs and small molecules. *Natural Product Reports*, **11**: 1811–1853.
- Goedl C., Sawangwan T., Wildberger P., Nidetzky B. (2010) Sucrose phosphorylase: A powerful transglucosylation catalyst for synthesis of α -D-glucosides as industrial fine chemicals. *Biocatalysis and Biotransformation*, **28**: 10–21.
- Goedl C., Schwarz A., Minani A., Nidetzky B. (2007) Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: Characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of α -D-glucose-1-phosphate. *Journal of Biotechnology*, **129**: 77–86.
- Green A. A., Hughes W. L. (1955) Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. U: Methods in Enzymology, sv. 1, Academic Press Inc. str. 67–90.
- Guibert A., Monsan P. (1988) Production and Purification of Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **542**: 307–311.
- Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W., Fong H. H., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)*, **275**: 218–220.
- Kagan B. O., Latker Sh. N., Zfasman E. M. (1942) Fosforoliz sakharozy kulturami *Leuconostoc mesenteroides* (Phosphorolysis of saccharide with *Leuconostoc mesenteroides* cultures). *Biokhimiya*, **7**: 93–108.
- Kasperowicz A., Stan-Glasek K., Guczynska W., Piknova M., Pristas P., Nigutova K., Javorsky P., Michalowski T. (2009) Sucrose phosphorylase of the rumen bacterium *Pseudobutyrvibrio ruminis* strain A. *Journal of Applied Microbiology*, **107**: 812–820.

- Kawasaki H., Nakamura N., Ohmori M., Amari K., Sakai T. (1996) Screening for bacteria producing sucrose phosphorylase and characterization of the enzymes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **60**: 319–321.
- Kim M., Kwon T., Lee H. J., Kim K. H., Chung D. K., Ji G. E., Byeon E. S., Lee J. H. (2003) Cloning and expression of sucrose phosphorylase gene from *Bifidobacterium longum* in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology Letters*, **25**: 1211–1217.
- Kitao S., Sekine H. (1992) Transglucosylation Catalyzed by Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and Production of Glucosyl-xylitol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **56**: 2011–2014.
- Kitao S., Sekine H. (1994) α -D-Glucosyl Transfer to Phenolic Compounds by Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and Production of α -Arbutin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **58**: 38–42.
- Koga T., Nakamura K., Shirokane Y., Mizusawa K., Kitao S., Kikuchi M. (1991) Purification and some properties of Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**: 1805–1810.
- Kraus M., Grimm C., Seibel J. (2017) Switching enzyme specificity from phosphate to resveratrol glucosylation. *Chemical Communications*, **53**: 12181–12184.
- Kraus M., Grimm C., Seibel J. (2018) Reversibility of a Point Mutation Induced Domain Shift: Expanding the Conformational Space of a Sucrose Phosphorylase. *Scientific Reports*, **8**: 1–6.
- Luley-Goedl C., Swangwan T., Mueller M., Schwarz A., Nidetzky B. (2010) Biocatalytic Process for Production of α -Glucosylglycerol Using Sucrose Phosphorylase. *Food Technology and Biotechnology*, **48**: 276–283.
- Mayers G., van Oss C. (1998) Affinity Chromatography. U: Encyclopedia of Immunology, 2. izd., Delves, P. J., ur., University College London Medical School, Academic Press Inc. str. 47–49.
- Mayhew S. G., Howell L. G. (1971) Chromatography of proteins on diethylaminoethyl-cellulose in concentrated ammonium sulfate. *Analytical Biochemistry*, **41**: 466–470.
- Mestrom L., Przepis M., Kowalczykiewicz D., Pollender A., Kumpf A., Marsden S. R., Bento I., Jarzębski A. B., Szymańska K., Chruściel A., Tischler D., Schoevaart R., Hanefeld U., Hagedoorn P. L. (2019) Leloir glycosyltransferases in applied biocatalysis: A multidisciplinary approach. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**: 1–35.
- Mieyal J. J., Abeles R. H. (1972) Disaccharide Phosphorylases. U: The Enzymes, 7. izd., Boyer P. D., ur., Academic Press Inc. str. 515–532.

- Mirza O., Skov L. K., Sprogø D., Van Den Broek L. A. M., Beldman G., Kastrup J. S., Gajhede M. (2006) Structural rearrangements of sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* during sucrose conversion. *Journal of Biological Chemistry*, **281**: 35576–35584.
- Morimoto K., Yoshihara A., Furumoto T., Takata G. (2015) Production and application of a rare disaccharide using sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **119**: 652–656.
- Russell R. R. B., Mukasa H., Shimamura A., Ferretti J. J. (1988) *Streptococcus mutans* gtfA gene specifies sucrose phosphorylase. *Infection and Immunity*, **56**: 2763–2765.
- Schwarz A., Brecker L., Nidetzky B. (2007) Acid-base catalysis in *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase probed by site-directed mutagenesis and detailed kinetic comparison of wild-type and Glu-237 → Gln mutant enzymes. *Biochemical Journal*, **403**: 441–449.
- Schwarz A., Nidetzky B. (2006) Asp-196 → Ala mutant of *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase exhibits altered stereochemical course and kinetic mechanism of glucosyl transfer to and from phosphate. *FEBS Letters*, **580**: 3905–3910.
- Silverstein R., Voet J., Reed D., Abeles R. H. (1967) Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry*, **242**: 1338–1346.
- Smeck N. E., Arnold R. W. (1983) Chapter 1: Gel filtration chromatography. U: Methods in Molecular Biology, izd. 36, Walker J. M., ur., Human Press. str. 1–21.
- Sprogø D., Van Den Broek L. A. M., Mirza O., Kastrup J. S., Voragen A. G. J., Gajhede M., Skov L. K. (2004) Crystal Structure of Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biochemistry*, **43**: 1156–1162.
- Srivastava S., Somasagara R. R., Hegde M., Nishana M., Tadi S. K., Srivastava M., Choudhary B., Raghavan S. C. (2016) Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Scientific Reports*, **6**: 24049.
- Sugimoto K., Nomura K., Nishiura H., Ohdan K., Hayashi H., Kuriki T. (2007) Novel transglucosylating reaction of sucrose phosphorylase to carboxylic compounds such as benzoic acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104**: 22–29.
- Van Den Broek L. A. M., Van Boxtel E. L., Kievit R. P., Verhoef R., Beldman G., Voragen A. G. J. (2004) Physico-chemical and transglucosylation properties of recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**: 219–227.

- Vandamme E. J., Van Loo J., Machtelinckx L., De Laporte A. (1987) Microbial Sucrose Phosphorylase: Fermentation Process, Properties, and Biotechnical Applications. *Advances in Applied Microbiology*, **32**, str: 163–201.
- Verhaeghe T., Aerts D., Diricks M., Soetaert W., Desmet T. (2014) The quest for a thermostable sucrose phosphorylase reveals sucrose-6'-phosphate phosphorylase as a novel specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**: 7027–7037.
- Voet J. G., Abeles R. H. (1970) The Mechanism of Action of Sucrose Phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry*, **245**: 1020–1031.
- Doudoroff M., Weimberg R. (1954) Studies with three bacterial sucrose phosphorylases. *Journal of bacteriology*, **68**: 381–388.
- Xie C. H., Yokota A. (2005) Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov. comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**: 2419–2425.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada, te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in black ink, reading "Lucija Katalusić", written over a horizontal line.

Ime i prezime studenta