

# Biotehnološka proizvodnja rekombinantnih terapijskih proteina s pomoću Escherichia coli

---

**Tomšić, Filip**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:476169>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-01**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**FILIP TOMŠIĆ**

**0058213889**

**BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA REKOMBINANTNIH  
TERAPIJSKIH PROTEINA S POMOĆU *Escherichia coli***

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 4

**Mentor:** prof. dr. sc. Blaženka Kos

**ZAGREB, 2021.**

## TEMELJNJA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**  
**Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura**

**Znanstveno područje: Biotehnološke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Biotehnološka proizvodnja rekombinantnih terapijskih proteina s pomoću**  
*Escherichia coli*

**Filip Tomšić, 0058213889**

**Sažetak:** *Escherichia coli* jedna je od najpoznatijih i najčešće korištenih mikroorganizama za proizvodnju rekombinantnih terapijskih proteina zahvaljujući temeljitom poznavanju genoma bakterije, velikoj brzini rasta i gustoći stanica, laganoj prilagodljivosti mikroorganizma procesima industrijskih razmjera i sveopćoj ekonomičnosti procesa. U ovom radu opisan je proces proizvodnje rekombinantnih terapijskih proteina, od ekspresije ciljanog proteina u samoj bakteriji, tehnika razbijanja stanica, izolacije i otapanja inkluzijskih tijela do renaturacije proteina i ponovnog smatanja u nativnu konformaciju. Nadalje, na primjeru proizvodnje rekombinantnog terapijskog proteina FGF21 opisane su mogućnosti poboljšanja procesa s ciljem optimizacije prinosa proizvoda uz zadržavanje zadovoljavajuće razine kvalitete ciljanog produkta.

**Ključne riječi :** *Escherichia coli*, rekombinantni proteini, poboljšanje procesa, FGF21

**Rad sadrži :** 36 stranica, 1 sliku, 1 tablicu, 42 literaturna navoda

**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. Blaženka Kos

**Datum obrane:**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Biotechnological production of recombinant therapeutic protein by *Escherichia coli***

**Filip Tomšić, 0058213889**

**Abstract :** *Escherichia coli* is one of the most famous and most commonly used microorganisms for the production of recombinant therapeutic proteins due to the thorough understanding of its genome, rapid growth rate and high cell density, its scalability and overall process economicity. This paper provides an insight into the process of production of recombinant therapeutic proteins from protein expression in *E. coli* through methods of cell disruption, isolation, solubilization of inclusion bodies, renaturation and refolding of proteins into their native conformation. Furthermore, methods of process intensification are explained using FGF21 recombinant protein production process as an example.

**Keywords:** *Escherichia coli*, recombinant protein production, FGF21, process intensification

**Thesis contains:** 36 pages, 1 figure, 1 table, 42 references

**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 Blaženka Kos, Full professor having a tenure

**Defence date:**

## SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Moguća mjesta nakupljanja terapijskih proteina tijekom proizvodnje .....	3
2.1. Intracelularno/unutarstanično nakupljanje sintetiziranih terapijskih proteina .....	3
2.2. Periplazmatsko nakupljanje sintetiziranih terapijskih proteina .....	3
2.3. Izvanstanična/ekstracelularna proizvodnja terapijskih proteina.....	4
2.4. Proizvodnja terapijskih proteina unutar inkluzijskih tijela.....	5
2.4.1 Prednosti i nedostaci proizvodnje terapijskih proteina unutar inkluzijskih tijela.....	6
3. Metode razbijanja stanica.....	7
3.1. Mehaničke metode razbijanja stanica .....	7
3.2. Fizikalno razbijanja stanica .....	8
3.3. Kemijsko razbijanje stanica .....	9
3.3.1. Prednosti i nedostaci fizikalnih i kemijskih metoda.....	9
3.4. Enzimsko razbijanje stanica .....	10
3.5. Kombinacija metoda razbijanja stanica .....	12
4. Uklanjanje nečistoća prije pročišćavanja proizvoda .....	13
5. Pročišćavanje inkluzijskih tijela .....	13
5.1. Centrifugiranje .....	14
5.2. Filtracija- membranski procesi.....	14
6. Otapanje inkluzijskih tijela .....	16
6.1. Tradicionalne metode otapanja inkluzijskih tijela .....	16
6.2. Alternativne metode otapanja inkluzijskih tijela .....	18
7. Renaturacija inkluzijskih tijela.....	19
7.1. Ključni procesni parametri renaturacije inkluzijskih tijela .....	19
7.2. Korištenje kemijskih aditiva s ciljem renaturacije proteina.....	20
7.3. Primjena enzima kao katalizatora renaturacije terapijskog proteina.....	21
7.4. Utjecaj koncentracije proteina, pH otopine, temperature i procesnog vremena .....	21
7.5. Metode renaturacije .....	22
7.5.1. Renaturacija metodom razrjeđivanja .....	23
7.5.2. Renaturacija korištenjem dijalize i dijafiltracije .....	24

7.5.3 Renaturacija na koloni – kromatografske metode .....	24
7.5.4. Renaturacija pri uvjetima visokog hidrostatskog tlaka .....	25
8. Kromatografske metode pročišćavanja .....	26
9. Mogućnosti povećavanja prinosa procesa proteina .....	27
9.1. Bazični proces proizvodnje proteina FGF21.....	27
9.2. Povećanje prinosa sinteze proteina .....	29
9.3. Povećanje prinosa procesa izolacije i pročišćavanja.....	29
9.3.1. Optimizacija uvjeta provođenja renaturacije .....	30
9.3.2. Dijafiltracija .....	31
9.3.3. Kiselinsko taloženje.....	31
10. Povećanje prinosa kromatografskih metoda pročišćavanja .....	32
11. Zaključak.....	32
12. Popis literature.....	34

## 1. Uvod

U ovom radu opisan je bazični postupak proizvodnje rekombinantnih terapijskih proteina pomoću *E. coli* u ulozi mikroorganizma producenta s naglaskom na najbitnije procesne korake koji uključuju razbijanje stanica, pročišćavanje, otapanje inkluzijskih tijela i renaturaciju proteina. Također, na primjeru proizvodnje rekombinantnog terapijskog proteina FGF21 opisane su mogućnosti povećanja prinosa procesa kroz optimizaciju procesnih uvjeta i pojedinačnih koraka proizvodnje ciljanog proteina. Proizvodnja rekombinantnih terapijskih proteina koristeći *E. coli* kao radni mikroorganizam počela se ekstenzivno razvijati prije 40-ak godina kao indirektna posljedica sve boljeg razumijevanja fiziologije i metabolizma *E. coli*. Prvi uspješno sintetiziran i masovno proizveden rekombinantni protein dobiven pomoću *E. coli* bio je humulin, rekombinantni oblik inzulina, koji je označio početak ere proizvodnje rekombinantnih proteina pomoću radnih mikroorganizama. Danas, više od trećine svih rekombinantnih proteinskih proizvoda dobiva se pomoću *E. coli*. Temeljito poznavanje genoma, velika brzina rasta, lagana prilagodljivost bakterije procesima različitih razmjera, visoka gustoća stanica, visok prinos željenih proteina, niska cijena hranjivih podloga te sveopća ekonomičnost procesa i opreme potrebne za rast čini *E. coli* optimalnim radnim mikroorganizmom za proizvodnju rekombinantnih proteina. Usprkos mnogim navedenim prednostima *E. coli* kao producenta rekombinantnih proteina postoje i brojne limitacije posebice kod proizvodnje kompleksnih topivih proteina. Primjerice, u samoj citoplazmi stanice vladaju vrlo reduktivni uvjeti koji limitiraju kvalitetno formiranje disulfidnih veza, prisutan je visok udio proteaza koje razgrađuju velik udio novo sintetiziranih proteina, ograničene mogućnosti uvođenja posttranslacijskih modifikacija (npr. glikozilacija) te ograničena mogućnost sekrecije dobivenih rekombinantnih proteina (Pieracci i sur., 2018). Posljedično, zbog navedenih izazova u proizvodnji kompleksnih topivih proteina, proizvodnja velike većine proteina bazira se na dobivanju ciljanih proteina u obliku netopivih agregiranih inaktivnih proteina, inkluzijskih tijela. Usprkos činjenici da su proteini agregirani u inkluzijska tijela netopivi u vodi i u inaktivnom su obliku, sinteza proteina u formi inkluzijskih tijela nudi mnoge prednosti, poglavito u vidu izolacije, pročišćavanja i povećanja prinosa proizvodnje. Metode i postupci optimizacije biotehnoloških procesa proizvodnje i pročišćavanja obrađene su na primjeru sinteze, izolacije i pročišćavanja terapijskog proteina FGF21 (engl. fibroblast growth factor 21). FGF21 metabolički je regulator s potencijalnim utjecajem na procese održavanja homeostaze glukoze i lipida što ga čini potencijalnim lijekom za dijabetes, kardiovaskularne disfunkcije/bolesti te poremećaje u metabolizmu lipida (Chen i sur., 2018). Sastoji se od 181 aminokiseline, približne molekularne

mase od oko 19,3 kDa. Količina proizvedenog FGF21, usprkos prvotnoj dostatnosti za početna ispitivanja, nije zadovoljavala potrebe kasnijih istraživanja, implicirajući na potrebu optimizacije procesa ekspresije proteina tijekom fermentacije kao i intenzifikacije i optimizacije procesa izolacije i pročišćavanja željenog produkta.

U nastavku rada opisane su metode sinteze, izolacije i pročišćavanja proteina vezanih u obliku inkluzijskih tijela, načini dobivanja aktivnog oblika ciljanog proteina (FGF21) zadovoljavajuće čistoće te načini optimizacije prinosa i ekonomičnosti procesa.



## **2. Moguća mjesta nakupljanja terapijskih proteina tijekom proizvodnje**

Sinteza rekombinantnih terapijskih proteina, kao i svih ostalih osnovnih staničnih proteina, odvija se unutar same stanice mikroorganizma producenta *E. coli*. Nakon sinteze, novonastali proteini/ polipeptidi mogu se zadržati unutar citoplazme stanice, mogu biti izlučeni u periplazmatski prostor stanice ili se izlučuju izvan stanice, gdje naknadno poprimaju sekundarnu, tercijsku te kvarternu strukturu, ovisno o svojstvima i vrsti proteina. Lokacija i topljivost sintetiziranog rekombinantnog terapijskog proteina ima značajan utjecaj na strategije izdvajanja kao i na odabir metoda izolacije i pročišćavanja u kasnijim koracima procesa (Balasundaram i sur., 2009).

### **2.1. Intracelularno/unutarstanično nakupljanje sintetiziranih terapijskih proteina**

Unutarstanično nakupljanje sintetiziranih proteina najčešće je korištena metoda u proizvodnji rekombinantnih proteina pomoću *E. coli*. Budući da se sintetizirani proteini nalaze unutar same stanice mikroorganizma producenta, neizbježno je razbijanje stanice kako bi se omogućila izolacija željenog produkta te njegovo kasnije pročišćavanje. Zbog dodatnog procesnog koraka, inaktivacije stanice mikroorganizma, neizbježan je porast troškova kojeg u slučaju sustava s ekstracelularnom sekrecijom proteina nema. Također, izloženost novosintetiziranog proteina citoplazmatskim proteazama predstavlja mogući rizik znatnog gubitka dijela ciljanog produkta. Unatoč ovim osporavajućim faktorima, fiziološki uvjeti unutar stanice za većinu su proteina optimalni za očuvanje stabilnosti sintetiziranog ciljanog produkta, što predstavlja izrazitu prednost prema ekstracelularno izlučenim proteinima koji su vrlo često izloženi nepovoljnim vanjskim uvjetima u fermentoru.

### **2.2. Periplazmatsko nakupljanje sintetiziranih terapijskih proteina**

Gram-negativne bakterije, poput *E. coli*, u svojoj građi posjeduju 2 membrane. Vanjsku, većinski građenu od lipopolisaharida, i unutarnju, građenu od tankog sloja peptidoglikana. Između dvije spomenute membrane nalazi se periplazmatski prostor u kojem vladaju jedinstveni uvjeti, nešto

drugačiji po sastavu od same citoplazme. Primjerice, periplazma je vrlo oksidativno okruženje (za razliku od citoplazme koja je vrlo reduktivna) što pogoduje formiranju disulfidnih mostova koji su od ključne važnosti kod smatanja proteina u više strukture (Pieracci i sur., 2018). Nadalje, koekspresija enzima koji kataliziraju procese smatanja proteina u više strukture u periplazmi može uvelike poboljšati smatanje proteina i imati pozitivan utjecaj na njihovu topljivost (Ni i Chen., 2009). Također, postoji mogućnost implementacije tehnika selektivne ekstrakcije, točnije razbijanje samo vanjske membrane uz očuvanje unutarnje membrane što uvelike olakšava kasnije procese pročišćavanja budući da je količina staničnog materijala kojeg treba odvojiti od ciljanog proteina znatno manja nego je to slučaj kod uništenja cijele stanice mikroorganizma producenta (Pieracci i sur., 2018). Usprkos mnogim pozitivnim stranama translokacije proteina u periplazmu te selektivne ekstrakcije razbijanjem samo vanjske membrane, transport proteina još je uvijek neefikasan budući da je razumijevanje mehanizama translokacije proteina još uvijek nepotpuno. Zbog neučinkovitog transporta ciljanog proteina u periplazmatski prostor, usprkos mogućem visokom stupnju ekspresije ciljanog proteina u stanici, prinos nakon ekstrakcije u pravilu je nezadovoljavajući.

### **2.3. Izvanstanična/ekstracelularna proizvodnja terapijskih proteina**

Izvanstanična proizvodnja terapijskih proteina karakterizirana je visokim stupnjem čistoće proteina. Troškovi izolacije i pročišćavanja, koji su znatno manji budući da nema potrebe za degradacijom stanica, koncentracija proteolitičkih enzima, koja je znatno niža naspram koncentracije istih unutar stanice (što smanjuje rizik razgradnje produkta) te potencijalno povećanje kvalitete ciljanog proteina samo su neke od prednosti koje pruža ekstracelularna sekrecija proteina (Pieracci i sur., 2018).

S druge strane, takav je način sekrecije karakteriziran mnogim ograničenjima kao što su relativno niska prosječna produktivnost i ograničene mogućnosti transportnih mehanizama stanice zaduženih za sekreciju dobivenih produkata, što vrlo često za posljedicu ima nakupljanje sintetiziranih proteina u stanici, njihovo neprecizno sklapanje te agregaciju u nakupine inaktivnih proteina unutar inkluzijskih tijela. Nadalje, izlučeni proteini podložni su degradaciji pod djelovanjem visokog stupnja aeracije i sila smicanja koje su prisutne u fermentoru (Middelberg i sur., 1995).

Usprkos spomenutim benefitima izvanstanične sekrecije, optimizacija tog procesa s ciljem ekonomske i proizvodne isplativosti uključivala bi genetičke modifikacije metaboličkih i sekrecijskih putova stanice mikroorganizma producenta. Također, uz spomenutu nisku produktivnost sojeva i podložnost proteina degradaciji pod utjecajem nepovoljnih uvjeta koji vladaju u fermentoru, većina se rekombinantnih proteina u *E. coli* proizvodi intracelularno, i to u većini slučajeva u obliku u vodi netopivih agregiranih inaktivnih nakupina proteina, inkluzijskih tijela (Pieracci i sur., 2018).

#### **2.4. Proizvodnja terapijskih proteina unutar inkluzijskih tijela**

Inkluzijska tijela su gusti, netopljivi agregati proteina unutar citoplazme mikroorganizma producenta *E. coli* često lokalizirana na polovima samih stanica. Amorfne su, parakristalinične strukture, približne veličine od 500 do 1500 nm i prividne gustoće od približno 1,3 mg ml<sup>-1</sup> (Pieracci i sur., 2018). Formiranje inkluzijskih tijela u stanici mikroorganizma producenta pojava je koja nije isključivo specifična za rekombinantne proteine već ih mogu formirati i nativni proteini prisutni u stanici. Visoka koncentracija ne-smotanih proteina (najčešće u obliku mnogo različitih intermedijera) nakuplja se u stanici što u konačnici rezultira formacijom netopljivih nakupina proteina u inaktivnom obliku, inkluzijskih tijela (Singh i sur., 2015). Visoka koncentracija rekombinantnih proteina u stanici producentu rezultat je nemogućnosti sekrecije/izlučivanja tog proteina iz stanice budući da mikroorganizam domaćin ne posjeduje stanične mehanizme za izlučivanje proteina koji nisu prirodno prisutni. Nadalje, vjeruje se kako je primarni razlog nastajanja inkluzijskih tijela nesrazmjer brzina sinteze proteina i njegovog smatanja u kompleksnije strukture (sekundarna, tercijarna, kvarterna) u citoplazmi stanice. Budući da je brzina sinteze proteina znatno veća od brzine smatanja, dolazi do hidrofobnih interakcija između ne-smotanih, djelomično smotanih te pogrešno smotanih proteina. Osim nesrazmjera brzina sinteze i smatanja, na formaciju inkluzijskih tijela utječe još nekoliko faktora kao što su nedostatak intrinzičnih enzima koji pospješuju smatanje, nedostatak posttranslacijskih mehanizama te visoko reduktivno okruženje u citoplazmi koje inhibira formiranje disulfidnih veza. Formiranje inkluzijskih tijela ne pokazuje koorelaciju s intrinzičnim fizikalnim svojstvima sintetiziranog proteina, već je vjerojatno kombinacija prije navedenih faktora, uz utjecaj okoline koja vlada u citoplazmi stanice producenta te sveopće hidrofobnosti samog proteina (Pieracci i sur., 2018). Cjelokupni mehanizam formacije inkluzijskih tijela još uvijek nije u potpunosti razjašnjen te vrlo

vjerojatno varira ovisno o broju faktora koji utječu na formaciju inkluzijskih tijela koji su prisutni u određenom sustavu te o svojstvima samog proteina (McNerney i sur., 2015).

#### **2.4.1 Prednosti i nedostaci proizvodnje terapijskih proteina unutar inkluzijskih tijela**

Većina inkluzijskih tijela pokazuje vrlo visok stupanj čistoće, čak do 95 % udjela čini ciljani protein (De Bernardez-Clark i sur., 1991), dok je ostatak sačinjen od DNA molekula, membranskih proteina, RNA polimeraza te ostalih nečistoća podrijetlom iz stanice domaćina. Upravo je visoka čistoća jedna od glavnih benefita budući da znatno olakšava operacije pročišćavanja u daljnjim koracima. Nadalje, neke od prednosti sinteze ciljanih rekombinantnih proteina u obliku inkluzijskih tijela su laka izolacija iz topivih nečistoća te iz nečistoća manje gustoće (budući da je gustoća inkluzijskih tijela veća od gustoće većine nečistoća), stabilnost inkluzijskih tijela koja omogućuje fleksibilnost parametara procesa, smanjena podložnost djelovanju proteolitičkih enzima, visok stupanj produktivnosti (>30% ukupnih staničnih proteina), otpornost na toksične uvjete unutar stanice te sposobnost denaturacije i ponovnog smatanja u aktivni oblik, to jest nativnu konformaciju (Pieracci i sur., 2018).

Unatoč navedenim prednostima, potrebno je uzeti u obzir i izazove koji se javljaju tijekom procesa dobivanja topivog, aktivnog oblika proteina iz inkluzijskih tijela. Prije samog pročišćavanja, potrebno je provesti nekoliko dodatnih koraka kojima se ciljani proteini iz inkluzijskih tijela izoliraju, otapaju i renaturiraju: razbijanje stanica s ciljem izolacije inkluzijskih tijela, separaciju inkluzijskih tijela od ostataka stanica, ispiranje, inkluzijskih tijela kako bi se otopile nečistoće koje su se istaložile zajedno s inkluzijskim tijelima, otapanje inkluzijskih tijela s ciljem denaturacije inkluzijskih tijela kako bi se omogućilo ponovno smatanje (engl. refolding) te konačno renaturacija (ponovno smatanje) u nativnu konformaciju proteina (Pieracci i sur., 2018). U procesu konverzije inaktivnih netopivih proteina u izoliranim inkluzijskim tijelima u topive proteine u svojoj nativnoj konformaciji ključni su koraci otapanja i ponovnog smatanja tj. renaturacije proteina. Upravo je iz tog razloga pri razvitku cjelokupnog procesa obrade inkluzijskih tijela najveći fokus usmjeren upravo na procese otapanja i renaturacije proteina te na njihovu optimizaciju (Pieracci i sur., 2018).

### 3. Metode razbijanja stanica

Prvi korak u procesu izolacije i pročišćavanja formiranih inkluzijskih tijela je razbijanje stanice sa svrhom oslobađanja inkluzijskih tijela koje su koncentrirane u citoplazmi stanica producenta što omogućuje daljnje pročišćavanje i izolaciju željenih rekombinantnih proteina. Budući da se inkluzijska tijela nalaze u citoplazmi stanice, potrebno je potpuno razbijanje obje membrane *E. coli*. Mali lomovi ili umjereno povećanje permeabilnosti stanične membrane nije dovoljno za zadovoljavajuće rezultate izolacije zbog same veličine i netopive prirode inkluzijskih tijela (Peternel, 2013). Postoji širok spektar metoda razbijanja stanica, no generalno ih se može podijeliti u 4 kategorije: mehaničko, kemijsko, fizikalno i enzimsko razbijanje (Middelberg i sur., 1995). Odabir optimalne metode razbijanja stanica od ključne je važnosti te je prilikom odabira metode potrebno uzeti u obzir niz varijabli poput vremena trajanja procesa, stabilnosti i topljivosti proteina, svojstva stanica mikroorganizma producenta, fizikalna svojstva inkluzijskih tijela, lokacije inkluzijskih tijela unutar stanice, veličine zaostalih staničnih ostataka, željenu razinu čistoće i kvalitete izoliranih inkluzijskih tijela te prihvatljiv prinos na kraju provedenog razbijanja (Pieracci i sur., 2018). Općenito, cilj odabira metode razbijanja stanica je maksimalno optimizirati prinos inkluzijskih tijela te postići što viši stupanj čistoće uz što manju fragmentaciju stanica čime se drastično olakšavaju kasniji procesi separacije i pročišćavanja. Prednosti i nedostaci metoda razbijanja stanica navedeni su u Tablici 1.

#### 3.1. Mehaničke metode razbijanja stanica

Mehaničke metode industrijski su najrelevantnije zbog visokog stupnja učinkovitosti, lakoće skalabilnosti, sposobnosti obrade velikih količina biomase i zbog visokog radnog volumena (Middelberg i sur., 1995). Najčešće korištene mehaničke metode razbijanja stanica kod mikroorganizama (npr. *E. coli*) su homogenizacija pod visokim pritiskom i homogenizacija kugličnim mlinovima (Middelberg i sur., 1995). Također, u novije vrijeme istražuju se nove metode poput ultrazvučne dezintegracije, no ona za sada primarno pronalazi laboratorijsku primjenu te eventualno primjenu u postrojenjima relativno malog razmjera.

Primarni izazovi koji se javljaju kod mehaničkog razbijanja su niska razina selektivnosti, moguća mikronizacija staničnih ostataka, generiranje topline, moguće znatne sile smicanja, svaki od kojih

predstavlja rizik mogućeg nastanka oštećenja proteina u inkluzijskim tijelima koje je cilj izolirati (Peternel, 2013).

### **3.2. Fizikalno razbijanje stanica**

Fizikalno razbijanje stanica temelji se na razbijanju integriteta stanične membrane što dovodi do poroznosti membrane koja omogućava intracelularnim proteinima, staničnim komponentama te na posljétku i inkluzijskim tijelima prolaz kroz membranu i izlaz iz stanice. Inducira se autoliza stanice kao rezultat drastičnih promjena u okolišu stanice, primjerice djelovanjem visokog osmotskog tlaka, promjenom pH otopine u kojoj se nalazi stanica ili promjenom temperature (Ren i sur., 2007).

Razbijanje stanica na temelju indukcije osmotskog šoka temelji se na brzom promjeni uvjeta u kojima se stanica nalazi iz uvjeta visokog osmotskog tlaka (npr. 1M otopina saharoze) u uvjete niskog osmotskog tlaka (postignuto razrjeđenjem s vodom) što dovodi do slabljenja i pucanja stanične membrane (Middelberg i sur., 1995). Ipak, ta je metoda primjenjivija za izolaciju periplazmatskih proteina budući da su manji i često topljiviji. Također, cijena aditiva za početno koncentriranje otopine i stvaranje uvjeta visokog osmotskog tlaka i veliki volumeni potrebni za razrjeđenje u uvjete niskog osmotskog tlaka čine ovu metodu relativno nepraktičnom na industrijskoj skali (Pieracci i sur., 2018).

Razbijanje temperaturom temelji se na zagrijavanju stanične kulture na temperaturu oko 50 °C na kojoj dolazi do razbijanja vanjske membrane, dok je za unutarnju membranu potrebno zagrijati staničnu kulturu na temperaturu >50 °C (Tsuchido i sur., 1985). Dodatna prednost ove metode jest inaktivacija proteaza i ubijanje stanice mikroorganizma pri čemu zaostaju relativno veliki stanični ostaci koje je lako izdvojiti (Middelberg i sur., 1995). Osim zagrijavanja, postoji i alternativni pristup razbijanju stanica promjenom temperature, zamrzavanjem i odmrzavanjem stanica. Usprkos lakoći implementacije i potencijalnoj selektivnosti ove metode, dugotrajnost i limitirana učinkovitost čine ovu metodu relativno neisplativom (Pieracci i sur., 2018).

### 3.3. Kemijsko razbijanje stanica

Kemijsko razbijanje stanica postiže se dodatkom kemijskih aditiva poput detergenata, otapala, kaotropnih agenasa, kelirajućih iona ili dodatkom kiseline (čime se postiže acidifikacija) u otopinu stanica koji tada stupaju u direktnu interakciju s membranom i dovode do njene degradacije (Pieracci i sur., 2018). Detergenti, dodatkom u otopinu, stupaju u interakciju s lipidnim membranskim proteinima što rezultira formacijom micela (Middelberg i sur., 1995) dovodeći do razbijanja membrane i lize stanice te oslobađanja intracelularnih proteina i inkluzijskih tijela. Usprkos velikoj efektivnosti degradacije unutarnje citoplazmatske membrane bogate lipidima, detergentski pokazuju znatno slabije djelovanje na vanjsku membranu većinski građenu od lipopolisaharida, pa ih se stoga često koristi u kombinaciji s drugim metodama. Dodatkom otapala, primjerice toluena ili glikol etera, također se postiže permeabilizacija membrane no ni jedno od tih otapala ne djeluje na obje stanične membrane, stoga se također koriste u kombinaciji s drugim metodama za potpunu permeabilizaciju i dajući zadovoljavajuće prinose (Pieracci i sur., 2018). Dodatkom kiseline, acidifikacijom, osim razgradnje vanjske membrane stanice, zbog sposobnosti prodiranja molekula kiseline kroz obje membrane dolazi do pada pH unutar same stanice što dodatno doprinosi uspješnosti dezintegracije membrane i njene permeabilnosti (Alakomi i sur., 2000). Kelirajući agensi poput EDTA reagiraju s dvovalentnim kationima poput  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  koji se nalaze na vanjskoj strani membrane stanice. Keliranjem spomenutih kationa dolazi do destabilizacije membrane koja dovodi do povećane permeabilnosti (Falconer i sur., 1997). Nakon destabilizacije i razbijanja vanjske membrane, dodatkom drugih kemikalija s utjecajem na unutarnju membranu (npr. detergentski) postiže se razbijanje obje membrane.

#### 3.3.1. Prednosti i nedostaci fizikalnih i kemijskih metoda

Glavne prednosti kemijskih i fizikalnih metoda su lakoća implementacije u pogonima velikih razmjera, jednostavna integracija u već postojeću proizvodnu infrastrukturu i mali troškovi. Glavni izazovi fizikalnih i kemijskih metoda uključuju relativno dugo vrijeme provođenja procesa, cijenu kemijskih aditiva, potrebno uklanjanje korištenih aditiva u kasnijim stupnjevima pročišćavanja i potencijalni utjecaj na kvalitetu proizvoda (Pieracci i sur., 2018).

### 3.4. Enzimsko razbijanje stanica

Enzimsko razbijanje stanice temelji se na dodatku enzima koji svojim djelovanjem dovode do razbijanja membrane stanice. Najčešće se koriste enzimi poput lizozima ili enzima iz skupine muramidaza koji reagiraju s peptidoglikanom koji većinski gradi unutarnju membranu stanice. Već u slučaju razbijanja samo unutarnje membrane, vanjska membrana je oslabljena pa dolazi do pucanja što se može pospješiti dodatkom određenih kemikalija. Primjer takvog kemijskog spoja je Tween, kemijski aditiv koji se dodaje prije enzimskog tretmana te ima razarajuće djelovanje na vanjsku membranu bogatu lipopolisaharidima što rezultira povećanjem učinkovitosti (Pieracci i sur., 2018). Nadalje, moguć je dodatak i DNAza, enzima koji razgrađuju DNA molekule, s ciljem smanjenja viskoznosti lizata stanica koja se javlja kao posljedica oslobađanja velike količine DNA molekula nakon razbijanja membrane stanice. Digestija DNA molekula znatno doprinosi povećanju uspješnosti i lakšoj izolaciji i pročišćavanju ciljanog proteina u kasnijim koracima (Tin Lee i sur., 2004). Prednosti lize stanica pomoću enzima su visok stupanj učinkovitosti, blagi uvjeti provođenja metode i specifičnost metode što omogućava oslobađanje proteina iz ciljanog dijela stanice, bilo periplazme, citoplazme ili nekog od staničnih organela (Middelberg i sur., 1995).

Izazovi koji postoje prilikom enzimske razgradnje stanica su velika količina potrebnog enzima, cijena samog enzima, potreba za uklanjanjem dodanog enzima u daljnjim koracima pročišćavanja, potencijalno loš učinak na kvalitetu produkta te mogućnost nastajanja sitnih staničnih ostataka (mikronizacija) što uvelike komplicira daljnje pročišćavanje (Peternel, 2013). Također, u slučaju korištenja lizozima, budući da mu je vrijednost izoelektrične točke  $pI=11$ , a velika većina procesa provodi se pri pH vrijednostima nižim od te vrijednosti, lizozim je pozitivno nabijen i sklon stupanju u kompleks s inkluzijskim tijelima što predstavlja problem u kasnijim koracima izolacije (Pieracci i sur., 2018).



Tablica 1 : Usporedba metoda razbijanja stanica ( prema Pieracci i sur., 2018)

metode	Prednosti	nedostaci	reference
Mehaničke metode	<ul style="list-style-type: none"> <li>-vrlo učinkovita</li> <li>-lagan prijenos u veće mjerilo</li> <li>-pogodna za velike volumene</li> <li>-brza metoda</li> <li>-dobro istražena</li> <li>-ekonomična</li> <li>-učinkovito izdvajanje</li> <li>-kontinuirana</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-velik utrošak energije</li> <li>-moguće generiranje topline</li> <li>-niska selektivnost</li> <li>-moguća potreba nekoliko uzastopnih izvođenja</li> <li>-moguće nastajanje sitnih staničnih ostataka</li> <li>-snažne sile smicanja</li> <li>-visoka kapitalna ulaganja</li> </ul>	<p>(Middelberg, 1995) (Peternel i sur., 2013)</p>
Kemijske metode	<ul style="list-style-type: none"> <li>-moguća visoka selektivnost</li> <li>-lako prilagodljiva procesima različitih razmjera</li> <li>-fleksibilna</li> <li>-laka implementacija i kombinacija s drugim metodama</li> <li>-mala kapitalna ulaganja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-visoki operacijski troškovi</li> <li>-moguće dugo procesno vrijeme</li> <li>-šaržni proces</li> <li>-potrebno kasnije uklanjanje kemijskih aditiva</li> <li>-niska mogućnost izdvajanja</li> </ul>	<p>(Middelberg, 1995) (Falconer i sur., 1998) (Falconer i sur., 1997) (Allen i sur., 2007)</p>
Enzimske metode	<ul style="list-style-type: none"> <li>-efektivna</li> <li>-blaga</li> <li>-selektivna</li> <li>-specifična</li> <li>-niska kapitalna ulaganja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-visoki operativni troškovi u industrijskim mjerilima procesa</li> <li>-moguća potreba za pred-tretmanom</li> <li>-potrebno naknadno uklanjanje enzima</li> <li>-mogućnost aglomeracije sa inkluzijskim tijelima</li> <li>-limitiran operativni opseg</li> <li>-tvori male stanične ostatke</li> <li>-šaržni proces</li> </ul>	<p>(Middelberg, 1995) (Hopkins, 1991) (Peternel, 2013) (Peternel i Komel, 2010) (Van Hee i sur., 2004) ( Salazar i sur., 2007)</p>
Fizikalne metode	<ul style="list-style-type: none"> <li>-moguća selektivnost</li> <li>-moguća deaktivacija proteaza</li> <li>-veliki stanični ostaci</li> <li>-niska cijena</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-moguća potreba za visokim razrjeđenjem</li> <li>-slaba kontrola procesa</li> <li>-niska efikasnost</li> <li>-moguć visok kapitalni trošak</li> </ul>	<p>(Middelberg, 1995)</p>

Izazovi koji postoje prilikom enzimске razgradnje stanica su velika količina potrebnog enzima, cijena samog enzima, potreba za uklanjanjem dodanog enzima u daljnjim koracima pročišćavanja, potencijalno loš učinak na kvalitetu produkta te mogućnost nastajanja sitnih staničnih ostataka (mikronizacija) što uvelike komplicira daljnje pročišćavanje (Peternel, 2013). Također, u slučaju korištenja lizozima, budući da mu je vrijednost izoelektrične točke  $pI=11$ , a velika većina procesa provodi se pri pH vrijednostima nižim od te vrijednosti, lizozim je pozitivno nabijen i sklon stupanju u kompleks s inkluzijskim tijelima što predstavlja problem u kasnijim koracima izolacije (Pieracci i sur., 2018).

### **3.5. Kombinacija metoda razbijanja stanica**

Zbog često ograničenog djelovanja pojedinih metoda na samo određene dijelove stanice, često se provodi inkorporacija različitih metoda s ciljem njihovog međusobnog nadopunjavanja i zajedničkog poboljšanog učinka na razbijanje stanica te prinos i čistoću željenog produkta. Kombinacije metoda često su karakterizirane podjelom na ne-mehaničke metode koje kombiniraju kemijske, fizikalne ili enzimске metode i metode koje obuhvaćaju ne-mehanički predtretman nakon kojeg slijedi mehaničko razbijanje (Middelberg i sur., 1995). Primjerice, Bailey i sur. (1995) otkrili su kako dodatak gvanidin HCl-a (Gnd-HCl) i triton X-100 (TX-100) prije visokotlačne homogenizacije poboljšava učinkovitost razbijanja reducirajući potreban broj prolaza homogenizatora i smanjujući potreban radni tlak (Bailey i sur., 1995). Postignut je poboljšani prinos procesa i bolja kvaliteta razbijanja stanica uz manji udio mikronizacije što pozitivno utječe na poboljšanje procesa filtracije i kasnijeg pročišćavanja proizvoda. Drugi su radovi ispitivali utjecaj predtretmana stanica dodatkom detergenata, metalnih kelationa (metalnih kelatirajućih iona) i alkalnog pH s ciljem optimizacije procesa mehaničkog razbijanja uz provođenje istog u blažim uvjetima u usporedbi s procesom bez predtretmana (Pieracci i sur., 2018). Nadalje, provedena su mnoga istraživanja kombinacije više sukcesivnih nemehaničkih metoda razbijanja, primjerice kombinacija EDTA (koji se pokazao efikasnim u destabilizaciji vanjske membrane kelatirajući dvovalente iona kalcija i magnezija, (Middelberg i sur., 1995)) s lizozimom, ili nekom kemikalijom, koji imaju utjecaj na razbijanje unutarnje membrane stanice što dovodi do potpunog razbijanja staničnih membrana i omogućava izolaciju staničnih proteina ili ciljanih inkluzijskih tijela

(Middelberg i sur., 1995). Bitno je spomenuti kako se konstantno istražuju nove metode razbijanja stanica poput primjerice djelovanje hidrodinamičke kavitacije, plazme, razbijanje u pulsirajućem električnom polju i mnoge druge metode koje svoju primjenu već sada pronalaze u laboratorijima, a zasigurno će se u budućnosti neke od njih inkorporirati u postrojenja poluindustrijskih i industrijskih razmjera.

#### **4. Uklanjanje nečistoća prije pročišćavanja proizvoda**

Nakon destrukcije stanica i izolacije, uz inkluzijska tijela, u novonastaloj otopini (lizatu stanica) prisutne su mnoge stanične nečistoće u obliku staničnih intracelularnih proteina, dijelova liziranih stanica, DNA molekule, lipida, itd. Visok stupanj nečistoća ima negativan utjecaj na učinkovitost izdvajanja proizvoda te na daljnje korake izolacije i pročišćavanja koji slijede stoga se prije njih po potrebi može provesti specifično uklanjanje nečistoća s ciljem smanjenja udjela nečistoća u uzorku. Odabir predtretmana ovisi o specifičnom sastavu uzorka, metodi razbijanja stanica koja je korištena te o planiranim metodama daljnjeg pročišćavanja. Primjeri predtretmana su selektivno taloženje DNA molekula (povećavaju viskoznost) pomoću polietilenimina (PEI), spermina ili smanjenjem pH (Pieracci i sur., 2018). Također, moguća je liza DNA molekula DNazama. U oba slučaja, smanjenje koncentracije DNA u uzorku znatno pospješuje proces filtracije i smanjuje viskoznost uzorka što olakšava daljnje operacije pročišćavanja (Pieracci i sur., 2018).

#### **5. Pročišćavanje inkluzijskih tijela**

Nakon oslobađanja formiranih netopivih inkluzijskih tijela iz stanica mikroorganizma producenta potrebno ih je izdvojiti iz smjese sačinjene od drugih staničnih proteina, DNA molekula, staničnih ostataka i ostalih topivih staničnih nečistoća. Znatno veća gustoća inkluzijskih tijela naspram ostalim molekulama i nečistoćama kao i razlika u topljivosti najbitnija su svojstva na temelju kojih se provodi separacija. Kvalitetna rekuperacija inkluzijskih tijela kojom se postiže koncentriranje i značajno poboljšanje u čistoći uzorka uvelike utječe na prinos i kvalitetu naknadnih koraka

otapanja i renaturacije inkluzijskih tijela. Najčešće korištene metode razdvajanja su centrifugiranje i filtracija (Pieracci i sur., 2018).

## 5.1. Centrifugiranje

Najčešće korištena metoda separacije korištena u tehnologiji inkluzijskih tijela je centrifugiranje, a ovisno o potrebama postoji nekoliko izvedbi koje su pronašle svoju primjenu u laboratorijskim istraživačkim pogonima kao i u industriji. Općenito, prilikom izolacije inkluzijskih tijela provodi se centrifugiranje pri relativno niskim brzinama.

Centrifuga s konusnim diskovima primjer je izvedbe koja je optimizirana za korištenje u industrijskim pogonima velikih razmjera. Tipične brzine centrifugiranja koje se koriste kod ovakvih izvedbi kreću se od 5000g do 20000g (Fischer i sur., 1992). Velika razlika u gustoći između inkluzijskih tijela i staničnih ostataka osigurava prednost centrifugalnim separacijskim tehnikama naspram membranskih procesa budući da je dokazano kako omogućuju veću proteinsku čistoću (Clark, 2001). Bitno je imati na umu kako ti rezultati ovise o procesnim parametrima i samom proteinu koji se izolira. Nadalje, na taj se način postiže značajno smanjenje volumena smjese što kao posljedicu donosi smanjenje volumena tankova potrebnih za daljnje procese obrade i smanjuje sveopće troškove kemikalija i procesa koji se provode u daljnjem pročišćavanju, otapanju i renaturaciji ciljanih proteina.

## 5.2. Filtracija-membranski procesi

Kao alternativa centrifugalnim procesima separacije inkluzijskih tijela mogu se koristiti tangencijalna mikrofiltracija i ultrafiltracija s membranama velikih pora, „cut-off“ od 10-20kDa (Pieracci i sur., 2018).

Tangencijalna mikrofiltracija nudi mnoge prednosti pred korištenjem centrifugalnih metoda zbog svoje jednostavne implementacije i temeljitog razumijevanja fizikalnih procesa koji se odvijaju na membrani tijekom separacije. Nadalje, tangencijalnom mikrofiltracijom moguće je odvojiti značajne količine topivih kontaminirajućih proteina, DNA molekula i endotoksina koji se oslobađaju u koraku razbijanja stanica (Clark i sur., 2001). Budući da su veličine pora membrane prilagođene prosječnoj veličini inkluzijskih tijela, (50 do 1500 nm), spomenute nečistoće prolaze

kroz pore membrane dok netopiva inkluzijska tijela zaostaju na membranama te se djelovanjem tangencijalnog toka odnose s membrane i skupljaju u koncentriranoj i pročišćenoj otopini, koncentratu. Nečistoće koje su nešto manje topljive i istalože se zajedno s inkluzijskim tijelima, mogu se uspješno odvojiti uvođenjem dodatnog koraka dijafiltracije tijekom provođenja tangencijalne mikrofiltracije, koji se temelji na dodatku otopine u dobiveni koncentrat nakon prvog provođenja tangencijalne mikrofiltracije koja omogućuje otapanje spomenutih istaloženih nečistoća (McNerney i sur., 2015). Batas i sur. (1999) ispitivali su prolaz nečistoća kroz membranu nakon tretiranja pri različitim uvjetima (koncentracijama i sastavom otopine za ispiranje), koristeći 0,1 i 0,45 mikromolarne membrane. Uspjeli su postići čistoću od 46 %, usporedivu s čistoćom dobivenom prilikom centrifugiranja koja je iznosila 55 % (Batas i sur., 1999). Usprkos lakoći implementacije, korištenje dijafiltracije s ciljem daljnjeg pročišćavanja od otopljenih nečistoća rezultira velikim povećanjem potrošnje otopine za dijafiltraciju, čak i do 50 puta naspram volumenu potrebnom kod procesa centrifugiranja (Meagher i sur., 1994). Nadalje, aditivi koji se nalaze u otopinama za dijafiltraciju mogu imati negativan utjecaj na veličinu pora i integritet membrane, stoga je njihov utjecaj potrebno ispitati i procijeniti prije implementacije (Meagher i sur., 1994). Prije implementacije membranskih procesa separacije potrebno je procijeniti potrebnu veličinu pora membrana i sastav same membrane kako ne bi došlo do nepoželjnih interakcija između membrane i smjese molekula koju pročišćavamo. Također, potrebno je odabrati najbolju izvedbu membrane, potreban protok permeata, optimalan TMP (transmembranski tlak) i brzinu tangencijalnog protoka (Pieracci i sur., 2018).

Iako je membranske procese lako implementirati u postojeća postrojenja, lako ih je prilagoditi parametrima procesa i razumijevanje procesa koji se zbiva je vrlo temeljito, centrifugalni procesi sparni s ispiranjem dobivenih peleta inkluzijskih tijela pružaju veću čistoću konačnog produkta (Pieracci i sur., 2018).

S druge strane, bitno je spomenuti kako postoje proteini za koje se postižu bolji rezultati pročišćavanja primjenom membranskih procesa što dokazuje kako je pri odabiru metode pročišćavanja potreban individualni pristup svakom proteinu. Zahvaljujući izrazito netopljivoj prirodi proteina agregiranih u obliku inkluzijskih tijela moguća je implementacija koraka ispiranja inkluzijskih tijela s blago otapajućom otopinom koja otapa nečistoće istaložene zajedno s inkluzijskim tijelima. Zbog bolje topljivosti spomenutih nečistoća moguće ih je prevesti u topivi oblik i na taj način izdvojiti, povećavajući pritom čistoću smjese inkluzijskih tijela koja ima bitan utjecaj na prinos u kasnijim procesima izolacije i pročišćavanja proizvoda. Primjerice, redukcijom

broja kontaminirajućih proteaza u uzorku, smanjuje se potencijal njihovog djelovanja na otopljene proteine nakon otapanja inkluzijskih tijela (Georgiou i sur., 1999). Također, što je izraženija prisutnost nečistoća u uzorku prije provođenja renaturacije to je veća vjerojatnost agregacije i smanjene učinkovitosti ponovnog smatanja proteina (Pieracci i sur., 2018). Otopine za ispiranje često se sastoje od kombinacije raznih detergenata, kaotropnih molekula (urea), soli i enzima poput DNAza. Postizanje ravnoteže između otapanja istaloženih staničnih nečistoća i neotapanja inkluzijskih tijela temelji se na empirijskim analizama i kombinaciji prije navedenih tvari koje pospješuju otapanje u specifičnim omjerima pri kojima je postignuto optimalno otapanje željenih tvari (ispituje se na temelju „trial-error“ metode). Primjerice, visoke koncentracije kaotropnih tvari ili detergenata efektivno otapaju inkluzijska tijela dok umjerene količine tih spojeva efektivno otapaju netopive stanične ostatke (Pieracci i sur., 2018).

## **6. Otapanje inkluzijskih tijela**

### **6.1. Tradicionalne metode otapanja inkluzijskih tijela**

Nakon provedenih procesa razaranja stanica, izdvajanja i ispiranja, slijedi otapanje inkluzijskih tijela. Cilj ovog koraka je denaturirati i reducirati agregirane proteine sadržane u inkluzijskim tijelima kako bi se kasnije mogla provesti renaturacija tih proteina, procesa koji je usko vezan uz otapanje budući da uvjeti u kojima se vrši otapanje proteina imaju značajan utjecaj na proces renaturacije (Eiberle i sur., 2010). Kako bi se postiglo što potpunije otapanje i denaturacija ciljanog proteina potrebno je razmotriti i optimizirati korištene kemikalije i procesne parametre vođenja procesa.

Tradicionalni pristup temelji se na korištenju visokih koncentracija denaturirajućih spojeva za postizanje potpune denaturacije. U ovom se slučaju javlja problem ekonomičnosti procesa budući da zahtjeva visoke koncentracije denaturirajućih agenasa. Alternativno, istraživani su pristupi s upotrebom blagih denaturacijskih sredstava (engl. mild-solubilization) prilikom kojih se ciljani protein samo parcijalno denaturira zadržavajući pritom dijelove sekundarne strukture. Potrebna je manja količina denaturirajućeg sredstva, povećana je brzina renaturacije, i smanjeni su sveukupni troškovi procesa (Pieracci i sur., 2018).

Najčešće korištena skupina spojeva za otapanje proteina su kaotropi, specifičnije urea i gvanidin-HCl. Oba su spoja dokazano učinkovita u otapanju inkluzijskih tijela, no gvanidin-HCl pokazao se efikasnijim za većinu ispitanih inkluzijskih tijela. S druge strane, usprkos boljoj učinkovitosti, cijena gvanidina je 5 do 10 puta veća od uree što je često odlučujući faktor u velikim industrijskim postrojenjima s ograničenim budgetom. Primarni problem pri korištenju koncentrirane uree je prisutnost izocijanata koji se oslobađa, posebice prilikom zagrijavanja, i koji ima negativan utjecaj na karbomilaciju u ciljanim proteinima (Pieracci i sur., 2018). Općenito, usprkos učinkovitosti otapanja inkluzijskih tijela koju pokazuju, tradicionalno korištene visoke koncentracije kaotropnih agenasa pokazuju visoke tendencije taloženja proteina što negativno utječe na sveukupni prinos procesa i komplicira naknadne korake pročišćavanja i separacije. Također, visoke koncentracije kaotropnih agenasa mogu oštetiti procesnu opremu (Pieracci i sur., 2018).

Kao rješenje ovih problema moguća je implementacija pristupa s manjom koncentracijom kaotropnih reagensa prilikom čega proteini zadržavaju dijelove svoje sekundarne strukture što doprinosi poboljšanju uspješnosti renaturacije nekih proteina. Dokazan je pozitivan učinak otapanja inkluzijskih tijela podrijetlom iz *E. coli* u blažim uvjetima naspram korištenja visoke koncentracije kaotropnih agenasa na temelju poboljšanog prinosa procesa. Odabir tehnike otapanja ovisi o proteinu i mnogim procesnim faktorima. Osim kaotropnih sredstava, za denaturaciju i otapanje proteina korišteni su i detergentski i određene aminokiseline (Pieracci i sur., 2018).

Korištenje arginina, čestog aditiva korištenog za supresiju agregacije proteina u mnogim koracima pročišćavanja, također je istraživano za primjenu u procesima otapanja s istim ciljem, supresije agregacije proteina. Tsumoto i sur. (2003) demonstrirali su potencijal arginina da unaprijedi proces otapanja u prisutnosti gvanidin-HCl-a. Reducirajući agensi, poput ditiotreitola (DTT), glutationa (GSH), cisteina i beta merkaptioetanol (BME), također su se pokazali učinkovitima u poboljšanju denaturacije redukcijom disulfidnih veza prisutnih u proteinima inkluzijskih tijela koji sadrže cistein. Na temelju poznavanja strukture ciljanog proteina, točnije udjela disulfidnih veza u strukturi proteina, može se zaključiti ima li potrebe u otopinu za otapanje dodavati reducirajuće agense ili ne.

Kelatirajući agensi poput EDTA također mogu često biti prisutni s ciljem prevencije zrakom katalizirane oksidacije slobodnih cisteinskih grupa izloženih tijekom denaturacije i redukcije (Singh i sur., 2005). Prilikom odabira procesnih parametara i sastava otopine za otapanje, potrebno je

razmotriti nekoliko faktora kao što su vrsta denaturanta, koncentracija svake komponente u otopini, vrijeme trajanja reakcije, pH i fizikalne parametre samog procesa (Clark, 2001). Optimizacija ovih parametara i identifikacija optimalnih uvjeta procesa igra bitnu ulogu u maksimizaciji prinosa procesa i čistoće produkta te također doprinosi smanjenju sveukupnih troškova vođenja procesa.

## **6.2. Alternativne metode otapanja inkluzijskih tijela**

Proces otapanja moguće je dodatno poboljšati uklanjanjem netopivih nečistoća i netopivih inkluzijskih tijela budući da ona mogu poslužiti kao mjesta nukleacije (engl. nucleation spots) tijekom renaturacije čime se značajno povećava potencijal za pojavu agregacije. To je moguće postići inkorporacijom dodatnog koraka pročišćavanja prije ili tijekom procesa otapanja čime se postiže poboljšani prinos renaturacije proteina kao rezultat smanjenja količine nečistoća. Također, moguće je inkorporirati dodatni korak centrifugiranja s ciljem uklanjanja zaostalih netopivih nečistoća ili inkorporacija kromatografske metode pročišćavanja. Primjerice, provođenjem dodatnog koraka pročišćavanja prije renaturacije u procesu izolacije rekombinantnog lizozima iz bjelanjka kokošnjeg jajeta prinos ponovnog smatanja proteina povećan je s 15 % na 43 % (Batas i sur., 1999). Važno je prije uvođenja dodatnog koraka pročišćavanja uzeti u obzir čistoću postojećeg ciljanog proteina, količinu nečistoća prisutnih u uzorku, željeni prinos i potrebnu čistoću proteina kojeg je cilj izolirati i ekonomske troškove uvođenja dodatnog koraka pročišćavanja te na temelju spomenutih čimbenika ispitati isplativost i procijeniti postoji li opravdana potreba za uvođenjem dodatnog koraka pročišćavanja.

Nadalje, istraživani su integrirani pristupi simultanog izvođenja otapanja inkluzijskih tijela tijekom koraka razbijanja stanica u fermentoru. Glavni nedostatak ovakvog integriranog procesa je smanjena sposobnost razdvajanja otopljenih staničnih nečistoća od sada već također otopljenih inkluzijskih tijela. Također, izraženija je osjetljivost ciljanih rekombinantnih proteina na djelovanje proteaza, dok to nije slučaj kada su ti proteini agregirani u obliku inkluzijskih tijela što je ujedno i jedna od glavnih prednosti i razloga korištenja metode koja uključuje izolaciju ciljanih proteina u obliku inkluzijskih tijela. Intrinzična gustoća rekombinantnih proteina u otopljenom obliku također je znatno manja nego u slučaju agregacije proteina u inkluzijska tijela što zajedno s ostalim navedenim nedostacima ima značajan utjecaj na prinos i uspješnost naknadnog procesa renaturacije (Pieracci i sur., 2018)



## **7. Renaturacija inkluzijskih tijela**

Nakon provedene denaturacije i otapanja inkluzijskih tijela slijedi proces ponovnog smatanja proteina u njihovu nativnu konformaciju. Cilj procesa renaturacije je smanjiti koncentraciju denaturirajućih i reducirajućih agenasa koji su omogućili otapanje i denaturaciju inkluzijskih tijela do koncentracije pri kojoj je moguća ponovna formacija nativnih disulfidnih veza i smatanje proteina u nativni oblik. Renaturacija proteina i formacija viših stupnjeva smatanja proteina (sekundarna, tercijarna i kvarterna struktura) diktirana je primarnom strukturom proteina koju određuje redoslijed aminokiselina u polipeptidnom lancu. Vrijeme renaturacije može varirati od nekoliko sekundi do nekoliko dana, ovisno o kompleksnosti procesnih parametara procesa kao i o dodatku aditiva koji pospješuju i ubrzavaju proces, no najveći utjecaj na vrijeme i uspješnost renaturacije ima formacija nativnih disulfidnih veza kao i koncentracija proteina u uzorku (Pieracci i sur., 2018). Identifikacija optimalnih procesnih parametara i uvjeta u kojima se provodi renaturacija od ključne je važnosti za smanjenje vremena provedbe procesa i poboljšanje prinosa. Primarni izazov u procesu renaturacije proteina je formacija neželjenih proteinskih agregata, stoga je potrebno identificirati prikladnu brzinu uklanjanja agenasa korištenih za otapanje inkluzijskih tijela iz otopine i odrediti optimalnu koncentraciju proteina pri kojoj je formacija agregiranih i krivo smotanih proteina najmanja. Agregirane je proteine potrebno odstraniti iz otopine uvođenjem dodatnog koraka pročišćavanja što rezultira ne samo gubitkom prinosa već i povećanjem procesnih troškova. Hidrofobni dijelovi molekula proteina koji su često izloženi nakon potpunog otapanja i denaturacije također imaju značajan utjecaj na pojavu agregacije proteina tijekom renaturacije. Maksimalizacija prinosa renaturacije minimalizacijom formacije proteinskih agregata od ključne je važnosti za postizanje ekonomske isplativosti procesa (Pieracci i sur., 2018).

### **7.1. Ključni procesni parametri renaturacije inkluzijskih tijela**

Ključni parametri koje je potrebno razmotriti pri razvoju procesa renaturacije uključuju optimizaciju procesnog vremena, minimalizaciju pojave agregacije i pogrešnog smatanja proteina, visok prinos procesa, laku prilagodljivost procesima različitih industrijskih razmjera i sveopću ekonomičnost procesa. Budući da se mnogi industrijski važni proteini međusobno značajno razlikuju, razvoj uniformnog procesa nije moguć stoga je potrebno na temelju promatranja

utjecaja pojedinih operacijskih parametara i komponenata renaturacijske otopine na protein odabrati optimalne procesne parametre za provođenje renaturacije proteina (Yang i sur., 2011).

## **7.2. Korištenje kemijskih aditiva s ciljem renaturacije proteina**

Raznoliki kemijski aditivi mogu se dodati u otopinu za renaturaciju s ciljem optimizacije formiranja željenih disulfidnih veza, inhibicije agregacije, održavanja proteina u otopljenom obliku, sprječavanja neželjene oksidacije i promoviranja ponovnog smatanja proteina u nativnu konformaciju. Neki od aditiva imaju sposobnost utjecaja na više prije navedenih čimbenika no najčešće se nekoliko aditiva koristi u kombinaciji. Mehanizmi djelovanja pojedinih aditiva još uvijek nisu poznati i mogu varirati ovisno o proteinu. Moguće je na temelju stečenih znanja i iskustava dizajnirati otopinu za renaturaciju sa zadovoljavajućim svojstvima, no optimizaciju sastava otopine moguće je provesti jedino empirijski, na temelju mehanizma pokušaja i pogreške (Clark, 2001).

Često su korištene tvari koje imaju ulogu stabilizacije proteina u otopljenom stanju i samim time smanjuju rizik od agregacije. Kroz cijeli proces renaturacije od ključne je važnosti održati ravnotežu između brzine uklanjanja denaturanta (koji drži proteine u otopljenom obliku) iz otopine i u isto vrijeme održavati uvjete koji omogućuju ponovno smatanje proteina što je omogućeno smanjenjem koncentracije denaturanta. Visoke koncentracije rezidualnog denaturanta mogu rezultirati smanjenjem brzine ponovnog smatanja, dok s druge strane niske koncentracije denaturirajućih agenasa mogu rezultirati taloženjem proteina (Tran-Moseman i sur., 1999). S ciljem minimalizacije formiranja agregata proteina i njihovog taloženja, osim održavanja povoljne brzine uklanjanja denaturirajućeg agensa, često se koriste i aditivi koji se mogu dodati u renaturacijsku otopinu, primjerice aminokiseline poput arginina, polimeri poput PEG-a (polietilen-glikol) ili detergentski poput SDS-a (natrijev dodecil-sulfat) koji mogu zaštititi izložene hidrofobne dijelove proteinskih molekula i onemogućiti međusobnu interakciju proteinskih intermedijera (Vallejo i Rinas, 2004).

Osim spomenutih proteinskih stabilizatora koji održavaju proteine u topljivom obliku i sprječavaju njihovu agregaciju i taloženje, bitno je u otopini za renaturaciju proteina osigurati uvjete koji omogućavaju formiranje nativnih disulfidnih veza. Takvi se uvjeti postižu korištenjem puferских sustava u kojima se potiče nastajanje nativnih disulfidnih veza koje stabiliziraju intermedijerne

oblike proteina prilikom ponovnog smatanja proteina. Dodatak tiola male molekulske mase poput glutationa i cisteina pozitivno utječu na nastajanje disulfidnih veza. Problem koji se javlja u tom slučaju jest visoka cijena takvih molekula ukoliko se koriste u visokim koncentracijama ili velikim količinama. Bitno je napomenuti kako je za postizanje optimalnih uvjeta u otopini potrebno uzeti u obzir molarni omjer oksidiranog i reduciranog oblika molekule tiola. Formiranje nativnih disulfidnih veza u proteinima koji ih sadrže često je limitirajući korak u procesu, no ujedno je i od esencijalne važnosti za formiranje nativne strukture proteina (Pieracci i sur., 2018).

### **7.3. Primjena enzima kao katalizatora renaturacije terapijskog proteina**

Enzimi mogu također biti primjenjeni kao katalizatori renaturacije proteina (engl. molecular chaperones - molekularni pratioci, šaperoni) u nativnu konformaciju. Treba napomenuti kako je njihova odsutnost ili limitirana aktivnost jedan od glavnih razloga formiranja inkluzijskih tijela tijekom sinteze proteina budući da je njihova aktivnost ključna za uspješno smatanje proteina *in vivo*. Problemi koji su vezani uz primjenu enzimskih aditiva s ciljem poboljšanja renaturacije uključuju visoku cijenu, potrebu za uklanjanjem dodanih enzima u kasnijim procesima i potencijalno limitiran operacijski učinak te je zbog ovih razloga primjena enzimskih aditiva ekonomski neisplativa i industrijski teško primjenjiva. Primjeri često korištenih enzimskih aditiva su GroEL ili GroES sistem prisutan u nativnoj *E. coli*, protein disulfidna izomeraza (PDI) koji potiče formiranje nativnih disulfidnih veza (Pieracci i sur., 2018). Prije primjene aditiva potrebno je razmotriti njihov utjecaj na prinos renaturacije, cijenu procesa, utjecaj na čistoću uzorka i sposobnost uklanjanja aditiva u daljnjim procesima izolacije i pročišćavanja proizvoda.

### **7.4. Utjecaj koncentracije proteina, pH otopine, temperature i procesnog vremena**

Koncentracija proteina jedan je od najvažnijih čimbenika koji utječe na renaturaciju proteina. Procesi renaturacije često pokazuju tendenciju opadanja prinosa renaturiranog proteina u nativnoj konformaciji s povećanjem koncentracije otopljenih proteina u renaturacijskoj otopini zbog

povećanog potencijala za stupanje u međumolekulske interakcije koje dovode do agregacije. Tipične koncentracije proteina u procesu renaturacije temeljenom na razrjeđenju iznose između 0,01-1 mg L<sup>-1</sup>. U procesu industrijskih razmjera teži se provođenju renaturacije pri najvišim mogućim koncentracijama čime se postiže maksimalno smanjenje procesnog volumena što sam proces čini upravljivijim i smanjuje procesne troškove utroška energije za provođenje procesa, utroška otopine za renaturaciju, itd. Upravo se povećanjem koncentracije i posljedičnim smanjenjem volumena postižu najveće razlike u optimizaciji ostalih metoda (Pieracci i sur., 2018). pH renaturacijske otopine najveći utjecaj ima na stabilnost i konformaciju proteina u otopini te također djelovanjem na tiolne spojeve utječe na formaciju disulfidnih veza (Misawa i sur., 1999) budući da povišen pH ubrzava tvorbu disulfidnih veza. Nadalje, niže temperature smanjuju tendenciju agregacije proteina, ali također usporavaju i brzinu renaturacije, dok povišene temperature povećavaju brzinu renaturacije, ali i agregaciju proteina. Bitno je napomenuti kako utjecaj temperature varira od proteina do proteina. U jednom je istraživanju primijećeno kako promjena s niske na visoku temperaturu tijekom procesa renaturacije rezultira poboljšanjem početne aktivnosti (Xie i sur., 1996). Početak ponovnog smatanja proteina pri nižim temperaturama s ciljem formiranja stabilnijih intermedijera rezultira smanjenjem agregacije nakon povišenja temperature pri kojoj se proces renaturacije odvija brže. Provođenje renaturacije pri nižim temperaturama također značajno povećava i procesno vrijeme, posebice u slučaju rada s kompleksnijim proteinima, što dovodi do neizbježnog povećanja procesnih troškova. Brzina provođenja procesa renaturacije ima značajan utjecaj na prinos procesa, pri čemu je najčešće brzina izvođenja obrnuto proporcionalna prinosu procesa stoga je optimizacija procesa renaturacije s ciljem smanjenja procesnog vremena uz istovremenu maksimizaciju prinosa renaturacije kritična za razvoj industrijski isplativog procesa (Pieracci i sur., 2018). Nagla promjena koncentracije reducirajućeg agensa tijekom renaturacije, usprkos povećanju brzine izvođenja renaturacije, može rezultirati smanjenjem prinosa procesa budući da se stabilni intermedijeri ne stignu formirati prije no što je utjecaj agregacije zbog prebrzog uklanjanja denaturanta prevelik (West i sur., 1998).

## 7.5. Metode renaturacije

Tri najčešće korištene metode renaturacije uključuju direktno razrjeđenje smjese u kojoj se nalazi otopljeni protein s renaturacijskom otopinom, dijaliza ili dijafiltracija pomoću membrane i metode

renaturacije na koloni gdje se otopljeni protein ili veže na matriks ili prolazi bez vezanja (kromatografske metode). Odabir metode varira ovisno o proteinu kojeg je cilj renaturirati, o njegovim fizikalnim i kemijskim svojstvima kao i o ograničenjima postojećeg postrojenja i sveopćim troškovima metode, stoga se procjena optimalne metode renaturacije određuje empirijski.

### **7.5.1. Renaturacija metodom razrjeđivanja**

Renaturacija razrjeđivanjem jedna je od jednostavnijih metoda pa je stoga vrlo često implementirana mnogim postrojenjima. Najbitniji parametar kojeg je potrebno kontrolirati prilikom primjene ove metode renaturacije je koncentracija proteina koja mora biti relativno niska kroz proces (Clark, 2001). Postoji nekoliko izvedbi ove metode od kojih je najjednostavnija izvedba u jednom koraku u kojem se dodaje velika količina otopine za renaturaciju s ciljem smanjenja koncentracije proteina i denaturirajućeg agensa do koncentracija koje omogućavaju renaturaciju proteina (engl. flash dilution). Primarni problemi ove metode uključuju veliko povećanje volumena koje predstavlja veliki izazov u industrijskim pogonima bez potrebne infrastrukture. Nadalje, nagla promjena okruženja u kojem se nalaze proteini uzrokovana naglim razrjeđenjem renaturacijskom otopinom može rezultirati ubrzanim procesom renaturacije proteina i samim time povećava se potencijal pogrešnog smatanja proteina (Clark, 2001). Također, zbog velikog volumena otopine moguća je potreba za uvođenjem dodatnog koraka koncentriranja otopine prije daljnjih postupaka pročišćavanja što veže sa sobom dodatne troškove i može rezultirati gubitkom prinosa (Panda, 2003).

Kako bi se izbjegli spomenuti problemi vezani uz razrjeđivanje u jednom koraku, razvijeno je nekoliko metoda koje se temelje na postepenom, serijskom razrjeđivanju (engl. step-wise) otopine koja otapa protein s renaturacijskom otopinom do postizanja optimalnih uvjeta renaturacije. Tako se na primjer može koristiti razrjeđivanje u nekoliko koraka, dodajući alikvota denaturiranog proteina u renaturacijski pufer u određenim vremenskim intervalima ili kontinuirano (engl. puls/drip) (Clark, 2001). Metoda reverznog razrjeđivanja također pronalazi svoju primjenu, a temelji se na uzastopnom dodavanju alikvota renaturacijskog pufera u otopinu denaturiranih proteina s koracima miješanja i mirovanja između svakog dodavanja (Burgess, 2009). Izazov s kojim se susreće ova metoda je povećan rizik od pojave agregacije zbog visoke koncentracije

proteina u početku renaturacije proteina kada koncentracija denaturirajućeg agensa padne ispod koncentracije u kojoj onemogućava otapanje.

### **7.5.2. Renaturacija korištenjem dijalize i dijafiltracije**

Metode dijalize i dijafiltracije koriste semipermeabilnu membranu za provedbu izmjene pufera na temelju sile pritiska ili difuzije. Dijafiltracija omogućuje veću kontrolu nad brzinom uklanjanja denaturirajućeg agensa te je integracija u postojeće industrijske pogone jednostavnija (Vallejo i Rinas, 2004). Usprkos boljoj kontroli procesa dijafiltracije, zbog prisutnosti različitih proteinskih intermedijera nastalih kroz proces renaturacije, velik je potencijalni rizik pojave agregacije. Nadalje, primijećen je gubitak prinosa kao posljedica nespecifične adsorpcije proteina na korištene membrane pa je stoga potrebno sastav, svojstva i format membrane pomno odabrati ovisno o svojstvima proteina. Korištenje hidrofилnih membrana pokazalo je pozitivan učinak na smanjenje adsorpcije proteina i povećanje prinosa (Clark, 2001). S druge strane, dijaliza se temelji na izmjeni pufera difuzijom te može biti relativno spora i glomazna kada se izvodi u industrijskim mjerilima zbog potrebnog velikog volumena renaturacijskog pufera. Također, izazov predstavlja slaba mogućnost kontrole procesa i kompleksna potrebna oprema. Općenito, renaturacija provedena metodom dijafiltracije generalno se može provoditi pri višim koncentracijama proteina naspram metoda koje se temelje na razrjeđenju što rezultira znatno manjom potrošnjom puferne otopine za renaturaciju (Pieracci i sur., 2018).

### **7.5.3 Renaturacija na koloni – kromatografske metode**

Nekoliko je kromatografskih tehnika razmatrano za upotrebu u procesu renaturacije kao alternativa dosadašnjim metodama s ciljem ublažavanja interakcija između molekula intermedijera koje nastaju kroz proces renaturacije, npr. gel-kromatografija ili gel-filtracija (engl. size-exclusion chromatography (SEC)). Istraživana je također i adsorpcijska kromatografija koja se temelji na vezanju proteina u denaturiranom obliku, te se nakon koraka ispiranja, kojem je cilj s kolone odstraniti ostatak denaturanta, protein eluira s nosača na koji je bio vezan koristeći otopinu za renaturaciju. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija i kromatografija temeljena na hidrofobnim interakcijama također su istraživane budući da pridonose poboljšanju kvalitete

renaturacije zbog mogućnosti stabilizacije proteinskih intermedijera i samim time smanjenjem agregacije te je na taj način uz renaturaciju ujedno provedeno i pročišćavanje koje doprinosi stabilnosti i kvaliteti konačnog proteina. Prednosti provođenja renaturacije na koloni uključuju fizičku separaciju proteina kroz proces vezanjem na matriks kolone, moguće ponovno otapanje proteinskih agregata koji se nađu na koloni, provođenje procesa pri maksimalnim koncentracijama i integracija metode purifikacije (Pieracci i sur., 2018). Potencijalni izazovi korištenja kromatografskih metoda u svrhu renaturacije proteina su moguće taloženje proteina zbog naglog izdvajanja iz otopine s denaturirajućim agensom što rezultira mogućim uništavanjem kolone i problemima s čišćenjem. Nadalje, moguća je inhibicija renaturacije i refoldinga proteina zbog nepovoljne konformacije koju zauzima prilikom vezanja na netopivi matriks. Produktivnost procesa također može biti ograničena kapacitetom kolone (De Bernardez Clark i sur., 1998). U novije vrijeme sve je češća primjena tzv. „moving bed“ tehnologije s poboljšanim svojstvima poput većeg radnog volumena i bolje kromatografske učinkovitosti. U toj su izvedbi kromatografske kolone sekvencijalno povezane protokom dviju mobilnih faza koje protječu u suprotnim smjerovima i s naizmjeničnim ulazom i izlazom iz kolone u kolonu, u smjeru toka mobilnih faza, što stvara dojam pomicanja kolona (Šušković i Kos, 2020). Identifikacija uvjeta povoljnih za proces renaturacije i provođenje procesa na koloni vodeći računa o vremenu zadržavanja proteina na koloni kao i kinetike smatanja proteina od ključne je važnosti za optimizaciju izmjene pufera na koloni i procesa renaturacije koji se pritom provodi. Potrebno je pritom uzeti u obzir parametre poput kapaciteta punjenja kolone (load capacity), vrijeme punjenja kolone, sastav otopine za ispiranje i eluciju, pH otopina, volumen primijenjene kolone, optimalna temperatura, itd. (Pieracci i sur., 2018).

#### **7.5.4. Renaturacija pri uvjetima visokog hidrostatskog tlaka**

Uvjeti visokog hidrostatskog tlaka pokazali su se kao povoljni za provođenje otapanja inkluzijskih tijela i njihovih agregata pri inače nedenaturirajućim uvjetima i bez potrebe za dodavanjem visokih koncentracija aditiva. Vrijednosti hidrostatskog tlaka od 1 do 3 kbar pokazale su se dostatnima za uspješno provođenje disocijacije proteinskih agregata, dok pri tlakovima iznad 3 kbar dolazi do potpune denaturacije i otapanja proteina. Djelovanje pritiska promovira tranziciju proteina u strukturu koje zauzimaju najmanji mogući volumen što je za većinu proteina slučaj u njihovom disociranom i denaturiranom stanju. Jedna od glavnih prednosti ove metode temelji se na činjenici

da proteini pod djelovanjem umjerenih vrijednosti hidrostatskog tlaka, uz dodatak aditiva u znatno manjim koncentracijama no što je to slučaj u prije navedenim metodama, zauzimaju niže stupnjeve složenosti (sekundarna i tercijarna struktura) pri kojima dolazi do uspješne disocijacije proteinskih agregata. Nakon vraćanja uvjeta tlaka na atmosferske vrijednosti disocirani proteini pokazuju sposobnost ponovnog smatanja u njihove native konformacije, a povećanje uspješnosti ponovnog smatanja raste s vremenom inkubacije i snižavanjem tlaka. Brojne publikacije navode primjenu hidrostatskog tlaka za renaturaciju brojnih proteina izoliranih iz *E. coli*, poput penametričkog kolera toksina B (Rodrigues i sur., 2014), T4 lizozima (Crisman i sur., 2009), GGBP (gram-negative bacteria-binding protein) 1,2,3 (Lee i sur., 2006), itd. Dokazano je također kako niske koncentracije aditiva poput Triton X-100, Tween-20, uree i glicerola uvelike povećavaju prinos renaturacije do vrijednosti viših od 78 % (Lee i sur., 2006). Daljnje poboljšanje procesa kod određenih proteina također je moguće radom pri temperature ispod nule te dodatkom reducirajućih agenasa koji potiču nastajanje disulfidnih veza (Pieracci i sur., 2018).

## **8. Kromatografske metode pročišćavanja**

Nakon procesa renaturacije proteina, otopina koja sadrži renaturirane ciljne proteine, ali i mnoge nečistoće obrađuje se daljnjim koracima pročišćavanja s ciljem izolacije ciljanog rekombinantnog terapijskog proteina zadovoljavajuće čistoće. Najzastupljenije su kromatografske metode pročišćavanja koje se najčešće provode u 2 stupnja, kroz 2 kromatografske kolone koje na stacionarni matriks vežu ciljani protein koji se kasnije eluira (bind and elute mode) (Pieracci i sur., 2018) .

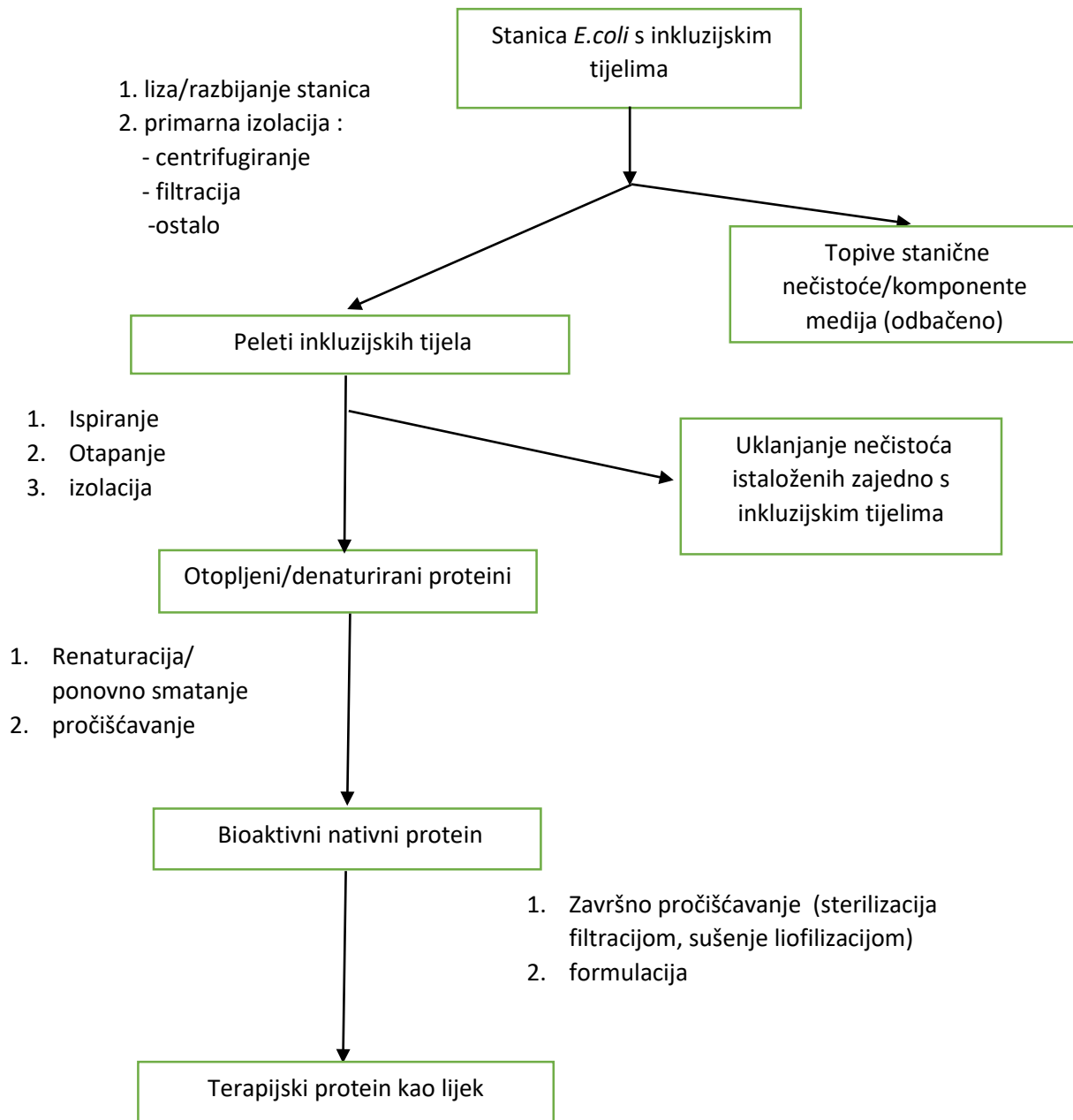


## 9. Mogućnosti povećavanja prinosa procesa proteina

S povećanjem interesa proizvodnje rekombinantnih terapijskih proteina pomoću prokariotskih radnih mikroorganizama, kao posljedica pozitivnih rezultata dobivenih u laboratorijskim istraživanjima javila se potreba za povećanjem razmjera proizvodnje do poluindustrijskih i industrijskih postrojenja koje su u mogućnosti zadovoljiti količinske potrebe željenog proteina koje su dovoljne za provođenje naprednih kliničkih studija. Ranije opisane metode otapanja, pročišćavanja i renaturacije proteina koje su uspješno korištene u laboratorijskim izvedbama pokazale su se ekonomski i tehnološki neisplative pri većim volumenima (prijenos u veće mjerilo nije isplativ) što je posljedično rezultiralo istraživanjem i razvojem poboljšanih procesa. Otapanje i renaturacija procesni su koraci koji pokazuju najizraženije gubitke prinosa kroz cijeli proces proizvodnje stoga je njihova intenzifikacija prioritet. Osim procesa izolacije i pročišćavanja proizvoda, poboljšanja su uvedena i u procesu biotehnoške proizvodnje proizvoda kao i u razvoj i optimiziranje produktivnosti stanične kulture (Chen i sur., 2018). Proces proizvodnje rekombinantnog proteina FGF21 bazičnom metodom pokazao je zadovoljavajuće rezultate prinosa i čistoće produkta vođen u laboratorijskim razmjerima, ali prijenos procesa u veće mjerilo koji je neizbježan za proizvodnju dovoljne količine kvalitetnog produkta za naprednija klinička istraživanja ekonomski nije isplativ. Upravo iz tog razloga optimizacija procesa je neizbježna (Chen i sur., 2018).

### 9.1. Bazični proces proizvodnje proteina FGF21

Bazni proces proizvodnje rekombinantnog terapijskog proteina FGF21 pomoću *E. coli* razvijen je po uzoru na konvencionalni proces proizvodnje rekombinantnih proteina prikazan na slici 1.



Slika 1. uobičajen proces izdvajanja, izolacije i pročišćavanja inkluzijskih tijela (prema Pieracci i sur., 2018)

Nakon fermentacije i izdvajanja stanica provodi se liza stanica s ciljem oslobađanja formiranih inkluzijskih tijela iz stanice, najčešće mehanički (visokotlačnom homogenizacijom). Nakon toga slijedi primarno izdvajanje inkluzijskih tijela iz smjese ostataka stanica i staničnih membrana, proteina, ostataka DNA najčešće centrifugiranjem ili tangencijalnom filtracijom. Dobivene pelete inkluzijskih tijela se dodatno tretira ispiranjem specifičnim puferskim otopinama koje omogućuju

otapanje zaostalih, prije netopivih nečistoća. Nadalje, provodi se otapanje i denaturacija peleta. Dobiveni otopljeni i denaturirani proteini tada se renaturiraju otopinom za renaturaciju koja omogućava ponovno smatanje proteina u nativno stanje što rezultira dobivanjem bioaktivnih molekula. Daljnje pročišćavanje može se provesti raznim kromatografskim postupcima specifično prilagođenima svojstvima ciljanog proteina. Prosječan prinos opisanog bazičnog procesa izolacije i pročišćavanja proizvoda iznosi oko 25 % (Chen i sur., 2018).

## **9.2. Povećanje prinosa sinteze proteina**

Prvi korak u intenzifikaciji proizvodnje FGF21 bio je poboljšanje razine ekspresije ciljanog proteina u samoj stanici producenta što je postignuto genetičkim manipulacijama gena koji kodiraju za željeni protein postižući tako optimalni sastav kodona (codon-bias). Također, ispitano je nekoliko različitih vektora (s različitim promotorima, terminatorima i brojem kopija) i nekoliko različitih kultura stanica *E. coli*. Inicijalno korištena bakterijska kultura za produkciju FGF21 bila je BL21(DE3) s plazmidom PFE80791. Dobiveni titar proteina ekspresijom u ovoj bakterijskoj kulturi iznosio je otprilike 1,0 g L<sup>-1</sup>. Ispitivanjem raznih kombinacija kulture domaćina i ekspresijskih vektora, najbolje rezultate pokazao je sustav koji čini *E. coli* derivirana iz soja K12, točnije GB004 u kombinaciji s rpoH358 vektorom. Postignuto je povećanje dobivenog titra proteina i do 16 g L<sup>-1</sup> (Chen i sur., 2018).

## **9.3. Povećanje prinosa procesa izolacije i pročišćavanja**

Drastično povećanje titra dobivenog proteina sa sobom povlači potrebu optimizacije cjelokupnog procesa izolacije i pročišćavanja proizvoda. Glavni je fokus na procesima poboljšanja prinosa procesa pročišćavanja, povećanja uspješnosti ponovnog smatanja proteina i optimizacije kromatografskih postupaka.

### 9.3.1. Optimizacija uvjeta provođenja renaturacije

Značajan utjecaj na prinos procesa pročišćavanja inkluzijskih tijela ima pH otopine kojom se vrši ispiranje. Dokazano je kako je prilikom ispiranja inkluzijskih tijela bazičnom otopinom (pH=8,0, 25mM tris) prinos procesa bio manji od 50 %, uglavnom zbog otapanja ciljanog proteina. Održavanjem pH otopine za ispiranje oko vrijednosti pH=6,4 (koristeći fosfatni pufer) postignut je puno veći prinos ciljanog proteina budući da nije došlo do otapanja proteina. Nadalje, korišteni volumen otopine za ispiranje pokazao se kao vrlo utjecajan faktor na prinos procesa pročišćavanja. U bazičnom procesu, homogenizacija je provedena pri volumenu od 1x fermentacijskog volumena, pri čemu je nakon centrifugiranja 10 % inkluzijskih tijela zaostalo u sluzavom sloju, jednoj od 3 faza nastalih nakon centrifugiranja pri brzini od 13500xg. Zaostala je tijela moguće pročititi razrjeđenjem spomenutog sloja i ponovnom centrifugom, no uvođenje dodatnog procesnog koraka uvijek rezultira i povećanjem troškova procesa. S druge strane, provođenjem homogenizacije pri volumenu od 2x fermentacijskog volumena, količina inkluzijskih tijela u sluzavom sloju reducirana je na 6,4 %, čime je prinos pročišćavanja povećan na 85 % (Chen i sur., 2018). Bazični proces renaturacije provodi se metodom razrjeđenja otopine u kojoj se nalaze denaturirani otopljeni proteini zajedno s tvarima koje su dodane s ciljem otapanja inkluzijskih tijela do koncentracija tih tvari pri kojima više nemaju utjecaj na topljivost proteina, što posljedično omogućuje ponovno smatanje proteina u njihovu nativnu konformaciju. Također, proces se provodi pri koncentraciji proteina manjoj od 0,5 g L<sup>-1</sup> pri temperaturi od 2 do 8 °C. Usprkos zadovoljavajućem prinosu procesa i udjelu formiranih dimera manjim od 10 %, problem predstavlja niska koncentracija proteina pri kojoj se proces provodi (0,5 g L<sup>-1</sup>) budući da je prinos proteina u fermentaciji i do 16 g L<sup>-1</sup>. Potrebno je stoga optimizirati proces renaturacije s ciljem postizanja zadovoljavajuće kvalitete i prinosa renaturiranog proteina uz provođenje procesa pri visokim koncentracijama. Značajan utjecaj na kinetiku ponovnog smatanja proteina imaju uvjeti u kojima se provodi proces poput pH, koncentracija kaotropnih agenasa, temperatura, koncentracija proteina, koncentracija otopljenog kisika, itd. Nastajanje disulfidnih veza pospješena je provođenjem procesa u bazičnim uvjetima (>8). Pri pH vrijednostima između 8 i 7,5 formiranje disulfidnih veza je usporeno, dok je pri vrijednostima pH ispod 7 formiranje disulfidnih veza neznatno. S porastom temperature raste uspješnost ponovnog smatanja, ali i agregacije proteina, rezidualni ostaci uree mogu utjecati na usporavanje formiranja disulfidnih veza (samim time usporavaju agregaciju), a dodatak bakra, magnezija i kobalta također pospješuje smatanje proteina (ubrzavajući oksidaciju). Tvorba neželjenih proteinskih dimera

naglašenija je pri višim koncentracijama proteina, a umjetno dodani cisteinski ostaci na FGF21 proteinu glavni su uzročnici tvorbe neželjenih međumolekulskih disulfidnih veza. Rješenje tog problema dolazi u obliku dodatnog kontroliranog koraka redukcije nakon smatanja proteina u kojem je moguće djelovanjem DTT-a reducirati većinu formiranih dimera u monomere bez negativnih utjecaja na intermolekulske disulfidne veze budući da DTT preferencijalno reducira međumolekulske disulfidne veze.

### **9.3.2. Dijafiltracija**

U bazičnom procesu, koncentracija denaturirajućih reagensa smanjena je razrjeđenjem otopine renaturacijskim puferom. U poboljšanom procesu proizvodnje FGF21 proteina, uklanjanje kaotropnih agenasa (korištenih za denaturaciju i otapanje inkluzijskih tijela) provodi se procesom dijafiltracije. Istraživanja su pokazala kako je koncentracija proteina dobivena procesom koji uključuje dijafiltraciju barem 10 puta veća od koncentracije dobivene provođenjem bazičnog procesa temeljenog na razrjeđenju. Također, uvelike je smanjena potrošnja pufera (Salazar i sur., 2007).

Implementacijom prije navedenih procesnih uvjeta u procesu renaturacije proteina korištenjem dijafiltracije moguće je uspješno provoditi proces renaturacije pri koncentracijama proteina višim od  $10 \text{ g L}^{-1}$ , čak i do  $16 \text{ g L}^{-1}$  pa je samim time proces dovoljno optimiziran za usklađivanje s visokoproduktivnim sojevima bakterije u fermentoru.

### **9.3.3. Kiselinsko taloženje**

U baznom procesu, za pročišćavanje nakon ponovnog smatanja proteina, korišten je dubinski filter (engl. charged depth filter), ali njegova primjena u poboljšanom procesu nije moguća zbog brzog začepjenja filtera kao rezultat visokih koncentracija proteina. Iz tog se razloga kao alternativna metoda pročišćavanja otopine nakon renaturacije proteina u poboljšanom procesu koristi metoda kiselinskog taloženja. Kiselinsko taloženje temelji se na sniženju pH vrijednosti s 8 na vrijednost od 3,5 korištenjem glicin-HCl pufera te ponovnim dizanjem pH vrijednosti na  $\text{pH}=6,5$  s tris-baznim puferom čime se postiže taloženje neželjenih proteina i ostalih staničnih nečistoća. Uvođenjem koraka kiselinskog taloženja uspješno je povećan kapacitet punjenja kromatografske

kolone za 2,5 puta. Nakon provedbe kiselinskog taloženja provodi se dodatni korak centrifugiranja s ciljem odvajanja istaloženih tvari iz otopine FGF21 proteina koja se u daljnjim koracima dodatno pročišćava kromatografskim postupcima (Chen i sur., 2018).

## 10. Povećanje prinosa kromatografskih metoda pročišćavanja

Glavni aspekti kromatografskih metoda pročišćavanja koje je cilj optimizirati su kapacitet punjenja kolone i prinos bez negativnih utjecaja na kvalitetu produkta. Nekoliko je tipova kolona i različitih nosača razmatrano u tu svrhu, a najbolje je rezultate pokazala primjena QHP I SPHP smola (Chen i sur., 2018).

## 11. Zaključak

Produkcija rekombinantnih terapijskih proteina koristeći *E. coli* kao mikroorganizam producent, posebice u obliku inkluzijskih tijela, istraživana je dugi niz godina te glasi kao jedna od najboljih metoda dobivanja rekombinantnih proteina zbog temeljitog poznavanja genoma i svojstava *E. coli* kao mikroorganizma producenta, visokog prinosa procesa i zadovoljavajuće kvalitete dobivenih proteina. Bitno je spomenuti kako ne postoji šablonizirani proces proizvodnje primjenjiv za većinu proteina, već je za produkciju svakog proteina potrebno kroz istraživanje razviti optimizirani proces počevši od uvjeta provođenja fermentacije, izbora metode razbijanja stanica i raznih postupaka pročišćavanja. Posebice je važan razvoj procesa otapanja inkluzijskih tijela i renaturacije proteina budući da oni iskazuju najveće gubitke prinosa stoga je individualno razvijanje tih procesnih koraka za svaki protein imperativ. Usprkos tome, na temelju razumijevanja temeljnih fizikalnih i kemijskih svojstava ciljanog proteina, potreba mikroorganizma producenta i osnovnih procesnih operacija te uvjeta pri kojima se izvode moguće je na temelju iskustva postaviti shemu procesa proizvodnje i izolacije ciljanog proteina. Poboljšanje procesa proizvodnje rekombinantnih terapijskih proteina prikazano je na primjeru transformacije bazičnog procesa proizvodnje rekombinantnog proteina FGF21 u poboljšani proces korištenjem genetički modificiranih sojeva *E. coli*s poboljšanim svojstvima produkcije ciljanog proteina (prinos proteina i do 16 g L<sup>-1</sup>) te prilagodbom procesa izolacije i pročišćavanja proizvoda koji se mogu provoditi

pri puno višim koncentracijama pročišćavanog proteina ( $16 \text{ g L}^{-1}$ ). Poboljšanje se postiže optimizacijom uvjeta u kojima se provodi pročišćavanje proteina, povećanjem korištenog volumena otopine za ispiranje, provođenjem procesa izolacije i pročišćavanja pri optimalnim uvjetima pH vrijednosti i temperature. Nadalje, poboljšanje procesa postignuto je i implementacijom kromatografskih nosača (smola) s poboljšanim kapacitetom punjenja (engl. load capacity) i uvođenjem dodatnog koraka kiselinskog taloženja prije obrade otopine kromatografskim metodama što rezultira povećanjem kapaciteta kromatografske kolone za 2,5 puta. Sveukupno gledano, optimizacijom procesa proizvodnje i izolacije proteina FGF21 postignuto je drastično smanjenje procesnih troškova (smanjenjem procesnog vremena, potrebnih volumena otopina za ispiranje) uz zadržavanje zadovoljavajuće kvalitete ciljanog proteinskog produkta.

## 12. Popis literature

- Alakomi H. L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I. M. (2000) Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2001–2005.
- Allen J. R., Patkar A. Y., Frank T. C., Donate F. A., Chiu Y. C., Shields J. E., Gustafson M. E. (2007) Use of glycol ethers for selective release of periplasmic proteins from Gram-negative bacteria. *Biotechnology Progress* **23**: 1163–1170.
- Bailey S. M., Blum P. H., Meagher M. M. (1995) Improved homogenization of recombinant *Escherichia coli* following pretreatment with guanidine hydrochloride. *Biotechnology Progress* **11**: 533–539.
- Balasundaram B., Harrison S., Bracewell D. G. (2009) Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends in Biotechnology*. **27**: 477–485.
- Batas B., Schiraldi C., Chaudhuri J. B. (1999) Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography. *Journal of Biotechnology* **68**: 149–158.
- Burgess R. R. (2009) Refolding solubilized inclusion body protein. *Methods in Enzymology* **463**: 259–282.
- Chen S., Wellborn W. B., Cundy J. T., Mangalath-Ilam R., Cook S. A., Stork M. J., Martin J. P., Capron M. H., Sobacke S. E., Srinivasan S., Quaadgras J. P. (2018) Process Development and Intensification for a Recombinant Protein Expressed in *E. coli*. U: Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes, Jagschies G., Lindskog E., Łacki K., Galliher P., ur., Elsevier. str. 769-791.
- Clark E. D. (2001) Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 202–207.
- Crisman R. L., Randolph T. W. (2009) Refolding of proteins from inclusion bodies is favored by a diminished hydrophobic effect at elevated pressures. *Biotechnology and Bioengineering* **102**: 483–492.
- De Bernardez Clark E., Hevehan D., Szela S., Maachupalli-Reddy J. (1998) Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs aggregation. *Biotechnology Progress* **14**: 47–54.
- De Bernardez-Clark E., Georgiou G. (1991) Inclusion bodies and recovery of proteins from the aggregated state, Protein Refolding. *American Chemical Society, Washington, DC*: 1–20.
- Eiberle M. K., Jungbauer A. (2010) Technical refolding of proteins: do we have freedom to operate? *Biotechnology Journal* **5**: 547–559.
- Falconer R. J., O'Neil B. K., Middelberg A. P. (1998) Chemical treatment of *Escherichia coli*. II. Direct extraction of recombinant protein from cytoplasmic inclusion bodies in intact cells. *Biotechnology and Bioengineering* **57**: 381–386.



- Falconer R. J., O'Neill B. K., Middelberg A. P. (1997) Chemical treatment of *Escherichia coli*: 1. Extraction of intracellular protein from uninduced cells. *Biotechnology and Bioengineering* **53**: 453–458.
- Fischer B., Sumner I., Goodenough P. (1992) Isolation and renaturation of bio-active proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Arzneimittelforschung* **42**: 1512–1515.
- Georgiou G., Valax P. (1999) Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods in Enzymology* **309**: 48–58.
- Hopkins T. R. (1991) Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. *Food and Bioprocess Technology* **12**: 57–83.
- Lee S. H., Carpenter J. F., Chang B. S., Randolph T. W., Kim Y. S. (2006) Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure. *Protein Science* **15**: 304–313.
- McNerney T., Thomas A., Senczuk A., Petty K., Zhao X., Piper R., Carvalho J., Hammond M., Sawant S., Bussiere J. (2015) PDADMAC flocculation of Chinese hamster ovary cells: enabling a centrifuge-less harvest process for monoclonal antibodies. *MAbs* **7**: 413–428.
- Meagher M. M., Barlett R. T., Rai V., Khan F. R. (1994) Extraction of rIL-2 inclusion bodies from *Escherichia coli* using cross-flow filtration. *Biotechnology and Bioengineering* **43**: 969–977.
- Middelberg A. P. (1995) Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances* **13**: 491–551.
- Misawa S., Kumagai I. (1999) Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers* **51**: 297–307.
- Ni Y., Chen R. (2009) Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* **31**: 1661–1670.
- Pieracci J. P., Armando J. W., Westoby M., Thommes J. (2018) Industry Review of Cell Separation and Product Harvesting Methods. U: Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes, Jagschies G., Lindskog E., Łacki K., Galliher P., ur., Elsevier. str. 165-206.
- Panda A. K. (2003) Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **85**: 43–93.
- Peternel S., Komel R. (2010) Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microbial Cell Factories* **9**: 66.
- Peternel Š., (2013) Bacterial cell disruption: a crucial step in protein production. *New Biotechnology* **30**: 250–254.
- Ren X., Yu D., Yu L., Gao G., Han S., Feng Y. (2007) A new study of cell disruption to release recombinant thermostable enzyme from *Escherichia coli* by thermolysis. *Journal of Biotechnology* **129**: 668–673.

Rodrigues D., Farinha-Arcieri L. E., Ventura A. M., Chura-Chambi R. M., Malavasi N. V., Lemke L. S., Guimaraes J. S., Ho P. H., Morganti L. (2014) Effect of pressure on refolding of recombinant pentameric cholera toxin B. *Journal of Biotechnology* **173**: 98–105.

Salazar O., Asenjo J. A. (2007) Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnology Letters* **29**: 985–994.

Singh A., Upadhyay V., Upadhyay A. K., Singh S. M., Panda A. K. (2015) Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories* **14** (41)1-10.

Singh S. M., Panda A. K. (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**: 303–310.

Šušković J., Kos, B. (2020) Biotehnoška proizvodnja lijekova, Biotehnologija 4, predavanje 1, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pristupljeno: 1.7.2021., [https://moodle.srce.hr/2020-2021/pluginfile.php/4329833/mod\\_resource/content/1/biotehnologija%204\\_2020\\_1.pdf](https://moodle.srce.hr/2020-2021/pluginfile.php/4329833/mod_resource/content/1/biotehnologija%204_2020_1.pdf)

Tin Lee C., Morreale G., Middelberg A. P. (2004) Combined in-fermenter extraction and cross-flow microfiltration for improved inclusion body processing. *Biotechnology and Bioengineering* **85**: 103–113.

Tran-Moseman A., Schauer N., De Bernardez Clark E. (1999) Renaturation of *Escherichia coli*-derived recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Protein Expression and Purification* **16**: 181–189.

Tsuchido T., Katsui N., Takeuchi A., Takano M., Shibasaki I. (1985) Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 298–303.

Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Arakawa T. (2003) Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**: 1383–1386.

Vallejo L. F., Rinas U. (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories* **3**: 11.

Van Hee P., Middelberg A. P., Van Der Lans R. G., Van Der Wielen L. A. (2004) Relation between cell disruption conditions, cell debris particle size, and inclusion body release. *Biotechnology and Bioengineering* **88**: 100–110.

West S. M., Chaudhuri J. B., Howell J. A. (1998) Improved protein refolding using hollow-fibre membrane dialysis. *Biotechnology and Bioengineering* **57**: 590–599.

Xie Y., Wetlaufer D. B. (1996) Control of aggregation in protein refolding: the temperature-leap tactic. *Protein Science* **5**: 517–523.

Yang Z., Zhang L., Zhang Y., Zhang T., Feng Y., Lu X., Lan W., Wang J., Wu H., Cao C., Wang X. (2011) Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS ONE*: 6.

## Izjava o izvornosti

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

Felip Tomšić

Ime i prezime studenta



