

UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET



Saša Vatić

**UTICAJ NEJONSKIH SURFAKTANATA NA  
STRUKTURU I AKTIVNOST PEPTIDAZA**

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY



Saša Vatić

**INFLUENCE OF NONIONIC SURFACTANTS ON  
STRUCTURE AND ACTIVITY OF PEPTIDASES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

## KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

**Mentor:**

**Prof. dr Natalija Polović**, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Članovi komisije:**

**Prof. dr Radivoje Prodanović**, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Prof. dr Branko Jovčić**, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Prof. dr Ivanka Karadžić**, redovni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Prof. dr Danijela Krstić**, redovni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Datum odbrane:**

---

*Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji za biohemiju i biofiziku makromolekula, Katedre za biohemiju, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Radom je rukovodila Dr Natalija Polović, redovni profesor.*

*Nesebičnu kolegijalnu pomoć pružili su mi saradnici profesorke N. Polović: Dr Brankica Janković, istraživač. Dr. Jelica Milošević, asistent, Lidija Vrhovac, istraživač, Ivan Milenković, istraživač, Srđan Marković, istraživač kao i Dr Simeon Minić, asistent i Tamara Vasović, istraživač.*

*Spekroskopska ispitivanja urađena su u Centru za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.*

*Mikrobiološka istraživanja ove disertacije uradio je Dr Nemanja Marković, istraživač u grupi Dr Branka Jovčića, redovnog profesora Biološkog fakulteta, na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu.*

*Svima koji su doprineli ovoj disertaciji najiskrenije se zahvaljujem.*

*Zahvaljujem se i kolegicama Instituta za hemiju u medicini „Prof. Dr Petar Matavulj“, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, gde sam zaposlen, na razumevanju i podršci tokom izrade disertacije.*

## LISTA SKRAĆENICA

AmBic	Amonijum-bikarbonat
ANS	8-anilino-1-naftalen sulfonat
APS	amonijum-persulfat
ATR	prigušena totalna refleksija (od eng. Attenuated Total Reflectance)
BAPNA	N- $\alpha$ -benzoil-D,L-arginin-4-nitroanilid
BSA	goveđi serum albumin (od eng. Bovine Serum Albumin)
CBB G-250	Coomassie brilliant blue G-250
CBB R-250	Coomassie brilliant blue R-250
CD	cirkularni dihroizam (od eng. Circular Dichroism)
DMSO	dimetilsulfoksid
EDTA	etilendiamin-tetraacetat
FTIR	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (od eng. Fourier-transform infrared spectroscopy)
IAA	jodoacetamid
LDH	laktatdehidrogenaza
NMR	Nuklearna magnetna rezonanca
PMSF	fenilmetansulfonil-fluorid
QLL	kvazitečni sloj (od eng. quasi-liquid layer)
SDS	natrijum dodecil-sulfat (od eng. sodium dodecyl sulfate)
SDS PAGE	natrijum dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (od eng. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
T20	Tween 20
T80	Tween 80
TCA	trihlorosirćetna kiselina
TEMED	tetrametiletildiamin
T <sub>m</sub>	temperatura topljenja (od eng. Melting Temperature)
TX100	Triton X-100

## Uticaj nejonskih surfaktanata na strukturu i aktivnost peptidaza

### SAŽETAK

Aktivnost proteina je u korelaciji sa njihovim strukturnim konformacijama koje zavise od uslova okoline. Formulacije rastvora u kojima se proteini nalaze i uslovi pod kojima se oni čuvaju konsekvntno ostvaruju odlučujući uticaj na njihovu konformaciju i aktivnost. Ispitivanje stabilnosti i aktivnosti proteina u cilju nalaženja optimalnih uslova sastava rastvora, pri različitim uslovima uključujući snižene temperature, poseduje fundamentalnu naučnu važnost kao i potencijanu komercijalnu upotrebnu vrednost.

Cilj ove studije je definisanje okvira formulacija proteina, konkretno odabranih model peptidaza, u pogledu njihove strukture i optimalne aktivnosti sa posebnim naglaskom na prisustvo nejonskih surfaktanata, a zatim diferencijalno karakterisanje procesa vezanih za konformaciju peptidaza i njihovu konačnu upotrebnu vrednost.

Stabilnost i konformacija tripsina je ispitana za jone *Hofmeister*-ove serije koji imaju stabilizujuće kosmotropske efekte na njegovu strukturu i definisan je optimum u pogledu koncentracije i vrste puferskog sistema. Infracrvenom i fluorescentnom spektroskopijom okarakterisan je uticaj serije pufera kao i sadržaj nejonskih surfaktanata Tween 20, 80 i Triton X-100 na distorzije u nativnoj strukturi tripsina i primećeno postojanje metastabilnog intermediera – stopljene globule pri uslovima snižene temperature. Definisan je optimalan sastav komponenti koji tripsinu omogućava maksimizaciju održanja strukturnog integriteta i aktivnosti do 99% nakon sedam ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, pri čemu je potvrđena krioprotektivna uloga nejonskih surfaktanata.

Za papain i peptidaze lateksa smokve, okarakterisana je kazeinolitička, želatinolitička i kolagenolitička supstratna specifičnost klasičnim biohemijskim metodama, 2D elektroforezom i zimografijom, kao i uticaj nejonskih surfaktanata na njihovu stabilnost infracrvenom i fluorescentnom spektroskopijom.

Odabrane model peptidaze, tripsin, papain i smeša peptidaza lateksa smokve, u sinergiji sa odabranim nejonskim surfaktantima pokazali su potencijal za unapređenje metodologije detekcije mikroaerofilnih patogenih bakterija *Listeria monocytogenes* u pogledu povećanja osetljivosti i ekspeditivnosti postojećih protokola.

**Ključne reči:** uvijanje proteina, stopljena globula, peptidaze, denaturacija proteina na niskim temperaturama, *Hofmeister*-ova serija, nejonski surfaktanti, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, infracrvena spektroskopija sa *Fourier*-ovom transformacijom, *Listeria monocytogenes*.

**Naučna oblast:** Biohemija

**Uža naučna oblast:** Strukturna biohemija

## The influence of nonionic surfactants on the structure and activity of peptidases

### ABSTRACT

Protein activity is correlated with their structural conformations that depend on environmental conditions. Formulations of solutions in which proteins are found and the conditions under which they are stored consequently exert a decisive influence on their conformation and activity. Testing stability and activity of proteins to find the optimal solution composition, under different conditions including reduced temperatures, has fundamental scientific importance as well as potential commercial value.

This study aims to define the framework for protein formulations, for specifically selected model peptidases, in terms of their structure and optimal activity with particular emphasis on the presence of nonionic surfactants, and to differentially characterize processes related to the conformation of peptidases and their final commercial usability.

The stability and conformation of trypsin were examined for ions of the *Hofmeister* series that have stabilizing kosmotropic effects on its structure. The optimum in terms of concentration and type of buffer system was defined. The influence of the series of buffers and the nonionic surfactants Tween 20, 80, and Triton X-100 on distortions of the native structure of trypsin was characterized by infrared and fluorescence spectroscopy. The existence of a metastable intermediate - a molten globule at reduced temperature conditions was also observed. An optimal composition of components that enables trypsin to maximize the maintenance of structural integrity and activity up to 99% after seven freeze/thaw cycles was defined, while the cryoprotective role of nonionic surfactants was confirmed.

For papain and fig latex peptidases, the caseinolytic, gelatinolytic, and collagenolytic substrate specificity was characterized by classical biochemical methods, 2D electrophoresis and zymography, and the influence of nonionic surfactants on their stability by infrared and fluorescence spectroscopy.

The selected model peptidases trypsin, papain, and fig latex peptidase mixture, in synergy with selected nonionic surfactants, showed the potential to improve the methodology of detection of microaerophilic pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* in terms of increasing the sensitivity and expediency of existing protocols.

**Key words:** protein folding, fused globule, peptidases, protein denaturation at low temperatures, Hofmeister series, nonionic surfactants, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Fourier transform infrared spectroscopy, *Listeria monocytogenes*.

**Scientific field:** Biochemistry

**Scientific subfield:** Structural biochemistry

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DEO .....</b>	<b>3</b>
2.1. Problem uvijanja proteina .....	3
2.1.1. Stopljena globula .....	6
2.1.2. Termodinamički aspekti uvijanja proteina .....	7
2.1.3. Kinetički parametri uvijanja proteina .....	8
2.2. Stabilnost proteina u rastvorima.....	10
2.2.1. Denaturacija proteina na niskim temperaturama .....	10
2.2.2. Kosmotropi i haotropi.....	10
2.2.3. <i>Hofmeister</i> -ova serija.....	11
2.2.3.1. Termodinamičke osobine jona <i>Hofmeister</i> -ove serije .....	11
2.2.4. Struktura leda.....	13
2.2.4.1. Uticaj zamrzavanja na stabilnost proteina .....	14
2.2.4.2. Uticaj površine leda na stabilnost proteina .....	15
2.2.5. Nejonski surfaktanti.....	18
2.2.5.1. Uticaj nejonskih surfaktanata na stabilnost proteina na niskim temperaturama .....	19
2.3. Model peptidaze .....	21
2.3.1. Tripsin.....	21
2.3.2. Papain .....	23
2.3.3. Peptidaze lateksa smokve .....	25
2.4. Spektroskopske tehnike za praćenje konformacije proteina .....	27
2.4.1. Infracrvena spektroskopija sa <i>Fourier</i> -ovom transformacijom.....	27
2.4.2. Fluorescentna spektroskopija.....	28
2.5. Problem detekcije <i>Listeria monocytogenes</i> u fermentisanim mesnim proizvodima.....	29
<b>3. CILJEVI .....</b>	<b>31</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>32</b>
4.1. Reagensi i rastvori.....	32
4.1.1. Reagensi.....	32
4.1.2. Puferski rastvori.....	33
4.1.3. Nejonske površinski aktivne supstance .....	33
4.1.4. Enzimski preparati .....	33
4.2. Analitičke metode.....	34
4.2.1. Određivanje koncentracije proteina <i>Bradford</i> -ovom metodom.....	34
4.2.2. Elektroforetske tehnike.....	35
4.2.2.1. Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) .....	35
4.2.2.2. Zimogramska detekcija peptidolitičkih proteina.....	37
4.2.2.3. Izoelektrično fokusiranje (IEF) i 2D zimogramska detekcija.....	37
4.2.2.4. Denzitometrijska analiza elektroforetskih gelova.....	38



4.3. Funkcionalni testovi stabilnosti i aktivnosti peptidaza.....	38
4.3.1. Tretiranje peptidaza niskim temperaturama .....	38
4.3.2. Hidroliza sintetičkog supstrata BAPNA.....	39
4.3.3. Hidroliza BSA .....	39
4.3.4. Hidroliza želatina.....	39
4.3.5. Hidroliza kolagena.....	40
4.3.6. Hidroliza kazeina .....	40
4.3.7. Autoliza.....	40
4.4. Spektroskopske metode.....	41
4.4.1. Infracrvena spektroskopija sa <i>Fourier</i> -ovom transformacijom FTIR .....	41
4.4.1.1. Analiza spektara.....	41
4.4.1.2. Spektralna korelacija.....	42
4.4.2. Fluorescentna spektroskopija.....	42
4.4.2.1. Fluorescencija triptofana.....	42
4.4.2.2. Fluorescencija ANS .....	42
4.5. Mikrobiološke metode.....	43
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>44</b>
5.1. Uticaj jonskog sastava puferских sistema na aktivnosti tripsina prema BAPNA supstratu nakon zamrzavanja/odmrzavanja .....	44
5.2. Uticaj molarnosti pufera na aktivnost tripsina prema BAPNA supstratu tokom zamrzavanja/odmrzavanja .....	44
5.3. Strukturne promene tripsina u natrijum-fosfatnom puferu nakon zamrzavanja/odmrzavanja	45
5.4. Efekat nejonskih surfaktanata na aktivnost tripsina na sintetičkom supstratu BAPNA.....	47
5.5. Efekat nejonskih surfaktanata na strukturu tripsina .....	48
5.6. Uticaj nejonskih surfaktanata na autolizu tripsina .....	49
5.7. Uticaj nejonskih surfaktanata na dostupnost proteinskiх supstrata.....	49
5.8. Supstrate specifičnosti papaina i ficina .....	50
5.9. Analiza sastava i želatinolitičke aktivnosti peptidaza lateksa smokve.....	51
5.10. Kolagenolitička aktivnost papaina i peptidaze lateksa smokve .....	52
5.11. Uticaj nejonskih surfaktanata na stabilnost papaina i peptidaze lateksa smokve.....	54
5.12. Detekcija mikroorganizma <i>Listeria monocytogenes</i> .....	55
<b>6. DISKUSIJA .....</b>	<b>57</b>
<b>7. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>65</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>66</b>
<b>9. PRILOZI.....</b>	<b>92</b>

## 1. UVOD

Proteini su predstavnici biomakromolekulskih mašina koji imaju ključne funkcionalne uloge unutar organizama, uključujući katalizu metaboličkih reakcija, replikaciju genetičkih informacija, reagovanje na stimuluse, obezbeđivanje strukture ćelija i organizama, transport molekula itd. Međutim, strukturno su često nestabilni kada nisu u svom fiziološkom okruženju i svaki protein može imati specifične zahteve van svog normalnog biološkog miljea. Ukoliko ovi zahtevi nisu zadovoljeni, može doći do delimične ili potpune destabilizacije proteina, te samim tim i do smanjenja njegove aktivnosti. Štaviše, može se reći da svojstva okruženja u kome se proteini nalaze diktiraju strukturu, a samim tim i funkciju proteina. Imajući u vidu da je fenomen uvijanja proteina fizički proces kojim se proteinski lanac prevodi u svoju nativnu trodimenzionalnu strukturu, ključan za biološko funkcionisanje, razumevanje ovog fenomena je od fundamentalne važnosti [1].

Ključan aspekt u procesu uvijanja proteina predstavlja interakcija polipeptidne kičme proteina sa vodom [2]. Konsekventno, liotropne osobine svih činilaca rastvora u kome se dati protein nalazi imaju direktan uticaj na karakter uvijanja proteina, uključujući prisustvo jedinjenja kao što su jake kiseline ili baze, neorganske soli, organski rastvarači, temperatura ili detergentski. Među njima razlikujemo ona koja ostvaruju stabilizujući uticaj na nativnu strukturu proteina – kosmotrope, odnosno destabilizujući – haotropne [3]. Klasifikaciju jonskih jedinjenja prema sposobnosti taloženja smeše proteina belanaca kokošijeg jajeta prvi je predložio *Hofmeister* [4], [5], a njegova istraživanja specifičnih efekata jona i dalje su intrigantna oblast fizičke hemije i biofizike [6].

U kontekstu površinski aktivnih supstancija i formulacije proteinskih rastvora, važno mesto zauzimaju detergentski, a posebno nejonski detergentski zbog višestrukih prednosti od kojih su biološka kompatibilnost, biodegradabilnost, niska toksičnost samo neke [7]. Njihova široka biohemijska i industrijska upotreba podstiče istraživanja koja su usmerena ne samo ka definisanju njihovog uticaja na strukturu, stabilnost i aktivnost proteina u rastvorima, već i ka širem razumevanju mogućih sinergističkih efekata sa enzimima koji potencijano mogu unaprediti njihovu biotehnološku i medicinsku upotrebu. Takođe, važan koncept formulacije proteinskih rastvora u pogledu njihovog skladištenja predstavlja mehanizam denaturacije na niskim temperaturama koji je trenutno atraktivna oblast aktivnih istraživanja zbog potencijalnih komercijalnih primena [8], sa posebnim osvrtom na potencijalna krioprotektivna svojstva jona *Hofmeister*-ove serije i nejonskih surfaktanata [9].

Kako je korišćenje peptidaza često sastavni deo protokola za hidrolizu biološkog materijala prilikom detekcije patogenih mikroorganizama, sastav enzimskih preparata koji se potencijalno mogu koristiti u ove svrhe poprima važan značaj. Nedostatak jasno definisanih enzimskih formulacija i široko definisani protokoli za njihovu upotrebu u mikrobiološkim laboratorijama ukazuju na nužnost ispitivanja upotrebljivosti peptidaza u svrhe poboljšanja pouzdanih testova za detekciju patogenih mikroorganizama [10], [11].

Glavni cilj ove studije predstavlja diferencijalno ispitivanje uticaja sastojaka rastvora na strukturu i aktivnost odabranih peptidaznih model enzima. Poseban akcenat je stavljen na formulaciju rastvora u pogledu optimalnog izbora vrsta i koncentracija puferkih sistema i nejonskih surfaktanata koji omogućavaju optimalne uslove za čuvanje peptidaza na niskim temperaturama bez značajnog narušavanja njegovog integriteta u pogledu aktivne konformacije. Važan činilac studije predstavlja i validacija definisanih enzimskih formulacija u kontekstu efektnosti i supstratne specifičnosti za korišćenje u praktičnim uslovima.

Kao model peptidaza za ispitivanje uticaja puferkih sistema i nejonskih surfaktanata na niskim temperaturama odabran je tripsin za sekvenciranje, peptidaza koja ima izuzetan komercijalni značaj.

Korišćenjem kombinacije klasičnih biohemijskih i spektroskopskih metoda, konkretno infracrvenom spektroskopijom sa *Fourier*-ovom transformacijom i fluorescentnom spektroskopijom, validirani su sistemi rastvora i nejonskih surfaktanata kojima se postiže visok nivo očuvanja integriteta tripsina u pogledu njegove konformacije i aktivnosti nakon višestruko ponovljenih ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Visoka aktivnost i očuvanje strukture tripsina nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja potvrđuje krioprotektivni karakter odabranih nejonskih surfaktanata. Takođe je pokazano da autoliza tripsina ne dovodi do značajnog gubitka aktivnosti tripsina.

Papain i kolagenaze lateksa smokve su korišćene za potvrdu podobnosti definisanih puferskih sistema i nejonskih surfaktanata u pogledu očuvanja njihove strukture, aktivnosti i supstrate specifičnosti. Korišćenjem dvodimenzionalne elektroforeze i zimografije u prisustvu odgovarajućih inhibitora definisana je njihova opšta peptidolitička aktivnost, a kod peptidaza lateksa smokve i specifična kolagenolitička aktivnost peptidaza lateksa smokve. Imajući u vidu raznovrsnost proteina prisutnih u fermentisanim proizvodima od mesa, definisani enzimski preparati u pogledu specifičnosti supstrata, koncentracije i prisustva nejonskih surfaktanata uspešno su primenjeni za povećanje osetljivost metode detekcije i kvantifikacije mikroaerofilnih bakterija *Listeria monocytogenes*, koje su česti kontaminanti hrane.

## 2. TEORIJSKI DEO

### 2.1. Problem uvijanja proteina

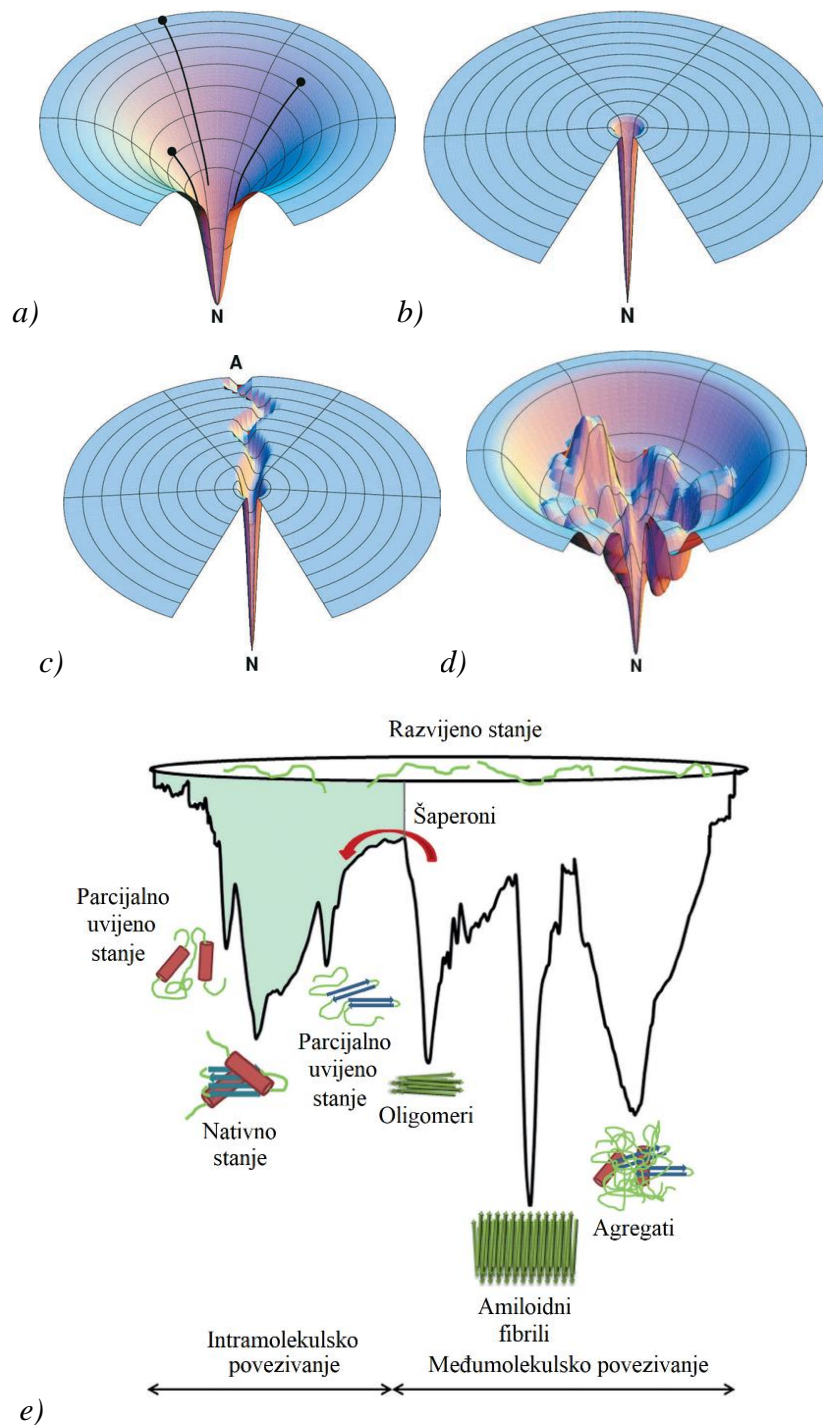
Temelji koncepta uvijanja proteina postavljeni su čuvenim eksperimentom *Christian B. Anfinsen*-a i njegovih saradnika, koji su početkom 1960-ih [12] pokazali su da se proteini mogu reverzibilno uvijati. Ovo implicira da su native strukture malih globularnih proteina termodinamički stabilna stanja, i da su stoga te konformacije proteina na globalnim minimumima njihovih slobodnih energija. *Cyrus Levinthal* je izneo argument kasnih 1960-ih [13], kasnije nazvan „*Levinthal-ov paradoks*“ [14], da za proteine postoji previše mogućih konfirmacija da bi nativnu strukturu u konformacioniom prostoru pronašli slučajnim pretraživanjem, kako je predložio Anfinsen (*Slika 2.1a i b*). *Levinthal* je zaključio da se proteini moraju uvijati specifičnim „*putevima uvijanja*“ (*Slika 2.1c*).

Po *Levinthal*-u, dva cilja, postizanje globalnog minimuma i brzina kojom se minimum dostiže, su međusobno isključiva. Ove dve opcije su termodinamička kontrola i kinetička kontrola. Termodinamička kontrola znači da protein dostiže svoj globalni minimum energije i da je uvijanje nezavisno od puta. Odnosno, nativna struktura je određena samo konačnim, a ne početnim uslovima i zahteva vreme do zauzimanja konačnog oblika. Kinetička kontrola znači da se uvijanje dešava brzo jer zavisi od puta odnosno, konačna struktura bi se mogla razlikovati u zavisnosti od uslova iz kojih je uvijanje pokrenuto, pa protein može dostići samo lokalne minimume. *Levinthal-ov* argument je doveo do potrage za putevima uvijanja.

Moderni pogledi na kinetiku uvijanja proteina pojavili su se kao rezultat kombinacije napretka u eksperimentalnim metodama koje su informativnije na atomskom nivou, i iz novog konceptualnog okvira statističko-mehaničkih modela. U metafori „*energetskih pejzaža*“, uvijanje se predstavlja kao curenje vode niz planinske obronke složenih oblika, a manje kao tok kroz jedan deo „*pejzaža*“. Ukratko, trenutni pogled stavlja naglasak na ansamble i višestruke puteve za uvijanje, a manje na specifične strukture i puteve (*Slika 2.1d*).

Ako bi postojala mogućnost posmatranja intermedijernih stanja tokom uvijanja, kinetički eksperimenti bi mogli ukazati na koji način proteini efektno pronalaze put do konačnog uvijenog stanja prolaskom kroz određene intermedijere. Moderna era eksperimenata uvijanja počela je ubrzo nakon *Levinthal-ovog* ključnog argumenta, potragom za intermedijernim stanjima uvijanja [15], [16]. Intermedijerne strukture uvijanja se mogu posmatrati kao one koje su na putu ili van putanje uvijanja ka nativnoj strukturi proteina. Implikacija je da samo posrednici na putu uvijanja mogu ukazati na način uvijanja, dok intermedijeri van puta vode u ćorsokak (*Slika 2.1e*). Kako je uvijanje relativno brz proces, detektovani su i opisani samo stabilni intermedijeri na putu uvijanja proteina, dok je u poslednjih 20-ak godina strukture tranzicionih intermedijera na putevima uvijanja proteina dobijaju teoretskim proračunima.

Uvijanje proteina vođeno je njegovom interakcijom sa vodom. Organizacija vode oko neuvijenih polipeptidnih lanaca ima krucijalnu ulogu u pokretanju procesa uvijanja proteina [17]. Usled hidrofobnog efekta smanjuje se površina sa vodom i izaziva povoljno smanjenje entropije [2], [18]. Plastično, ukoliko se molekul vode nalazi pored površine za koju ne može da se poveže vodoničnim vezama, nekompatibilnost ove površine [19] podstiče minimizaciju površine koja pokreće formiranje hidrofobnog jezgra proteina [20]. Odnosno, konformacija proteina teži da minimizira poremećaj vodenog matriksa [21]. Takav uzastopni „*hidrofobni kolaps*“ je nužno praćen i vođen strukturnim formiranjem vodoničnih veza sa polipeptidnom kičmom zajedno sa desolvatacijom [22]. Pokretačka sila je dakle oslobađanje vode koja će biti dostupna za hidrataciju drugih rastvorenih materija i maksimiziranje entropije sistema [2].



**Slika 2.1.** Energetski pejzaži puteva uvijanja proteina. (a) Idealizovan pejzaž levka, lanac formira unutarlančane interakcije i njegova unutrašnja slobodna energija (iznad nativnog stanja, N) raste zajedno sa njegovom konformacionom slobodom (širina levka). Polipeptidi sa različitim konformacijama (crne tačke) prate različite puteve (crne linije) u postizanju nativnog uređenja; (b) Anfinsenov pejzaž „golf terena“, lanac traži nativno uređenje (rupu) nasumično, na ravnoj energetskoj površini; (c) Levintalov energetski pejzaž levka sa kanjonom, lanac nasumično pretražuje sve dok ne naide na kanjon koji ga vodi u nativnu strukturu; (d) Energetski pejzaž sa lokalnim minimumima, energetska površina koja sadrži lokalne minimume u kojima intermedijer uvijanja polipeptida može postati prolazno zarobljen. Preuzeto i prilagođeno iz [23]. e) Šematski prikaz energetskog pejzaža pri uvijanju (zeleni levak) i agregaciji proteina (beli levak) [24]. Prilagođeno uz dozvolu autora.

Interakcije dipol-dipol u rastvoru mogu usporiti uvijanje proteina i smanjenje ovih interakcija može povećati stabilnost proteina. Put uvijanja je indukovano desolvacionim barijerama [25], elektrostatičkim interakcijama, a potpomognuta je i usmeravana kontaktima posredovanim vodom koji spajaju susedne ostatke aminokiselina [26]. Dodatni faktor je smanjenje vodenog omotača koji okružuje rastući polipeptidni lanac uvijanjem u sekundarne strukture, oslobađajući vodu koja ostvaruje povoljne vodonične veze na drugim mestima [27].

Slični faktori pomažu u organizovanju proteina uključenih u formiranje kvaternarnog nivoa strukture, gde svaka interakcija posredovana vodom, doprinosi u proseku  $4,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  stabilizaciji protein-protein interakcija [28]. Voda je stoga blisko uključena u vođenje uvijanja proteina, i važna komponenta u teorijskim predviđanjima strukture proteina [29]. Važnost sila hidratacije može se videti u konformacionom prelazu  $\alpha$ -heliksa u  $\beta$ -pločicu koji prati racemsko uvijanje polilizina [30].

Nasuprot predočenom procesu, pri uvijanju proteina u uslovima sa smanjenim aktivitetom vode postoje prepreke za postizanje strukture sa minimalnom energijom. Brojni lokalni minimumi mogu zarobiti protein u neaktivnim konformacijama (*Slika 2.1d.*). Kada je protein potpuno hidratisan, potencijalni energetski pejzaž je znatno glatkiji (*Slika 2.1a.*) i pri adekvatnoj hidrataciji, proteini postizu svoju aktivnu konformaciju sa energetskim minimumom na jednostavan i brz način. Energetske barijere se umanjuju zbog optimizacije kretanja polipeptidne kičme i bočnih grupa aminokiselina brzim formiranjem odnosno razmenom vodoničnih veza. Bočni aminokiselinski ostaci takođe olakšavaju ovaj proces smanjenjem hidratacije peptidnih grupa (efekat zaštite) koji promoviše nativan tip uvijanja proteina [31].

Iako je na *Slici 2.1.* naznačena, ne postoji jedna struktura sa „minimumom energije“ već skup podstanja, sa malim energetskim razlikama. Fluktuacije između ovih podstanja, olakšane hidratacijom, dozvoljavaju određenu fleksibilnost koja je potrebna za aktivnost proteina. Iako se nativni protein nalazi na minimumu potencijalne energije, ova struktura nije na globalnom energetskom minimumu jer je put uvijanja proteina vođen, a ne slučajan proces. Jasno je da postoje i druge strukture sa nižim minimumima, kao što su proizvodi ireverzibilne denaturacije, koje sadrže drugačiju intermolekulsku strukturu [32].

Na *Slici 2.1.e* prikazana su sva konformaciona stanja koja polipeptid može da ima. Intermedijeri u kojima preovladavaju  $\beta$ -pločice mogu formirati jezgro agregacije (pod odgovarajućim uslovima) pre nego što će propagirati ka nativnoj strukturi, pošto su svi oblici agregata stabilniji od same native strukture [33].

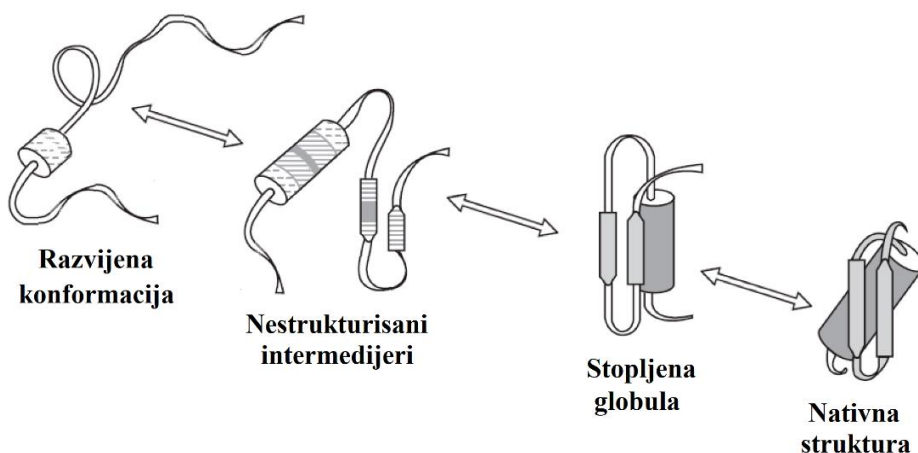
Kompatibilne rastvorene supstance koje stabilizuju vodu u hidratacionoj ljusci proteina i povećavaju površinski napon, takođe potpomažu održavanje native strukture proteina (*Hofmeister-ov efekat*). Za razliku od haotropnih denaturanta, aditivi koji stabilizuju strukturu proteina su udaljeni od njegove površine (ne vezuju se za površinu proteina) [34] i razlikuju se po svojim efektima u zavisnosti od njihove koncentracije, prisustva drugih rastvorenih supstanci, pH, temperature, pritiska i prirode proteina.

### 2.1.1. Stopljena globula

Detaljna struktura i termodinamika intermedijera uvijanja proteina aktivna je oblast istraživanja. Postoje oprečni stavovi u vezi sa mehanizmima uvijanja proteina, posebno u pogledu uloge stabilnih termodinamičkih intermedijera - stopljenih globula i predloženo je nekoliko modela za uvijanje proteina koji se odnose na stopljenu globulu, koja je veoma kompaktna, sa sekundarnom strukturom i topologijom nalik na nativnu, ali sa „fluktuirajućom“ tercijarnom strukturom usled mobilnosti bočnih lanaca. Formira se relativno kasno u procesu uvijanja [35]. Alternativno, predloženo je da je priroda intermedijera na putu uvijanja proteina jedinstvena za dati protein i određena njegovom sekvencom. Stoga je strukturalna priroda tranzicionih intermedijera različita od jednog proteina do drugog, osim za blisko srodne proteine, i može postojati više od jednog intermedijera [36].

Delimično uvijeni stabilni intermedijeri ili „stopljene globule“, primećeni su za veliki broj proteina i pretpostavlja se da većina proteina može da formira takve vrste, ako postoje odgovarajući eksperimentalni uslovi [37] i predložene su kao opšti intermedijeri pri uvijanju proteina [35]. Stopljene globule smatraju se stabilnim termodinamičkim kao i finalnim prolaznim kinetičkim intermedijerima tokom procesa uvijanja. Razlika između pravog (termodinamičkog) intermedijera i kompaktnog razvijenog međustanja može se utvrditi postojanjem barijere u slobodnoj energiji između pretpostavljenog intermedijera, nativnog i razvijenog stanja (*Slika 2.2.*). Najčešći uslovi u kojima se mogu detektovati stopljene globule ili drugi delimično uvijeni intermedijeri su destabilizujući, kao što je nizak pH, odsustvo stabilizacionih liganda ili prisustvo denaturanata. Stopljene globule i drugi delimično uvijeni intermedijeri imaju jaku sklonost ka formiranju rastvorljivih ili nerastvorljivih agregata, što se može kontrolisati koncentracijom proteina, jonskom silom i temperaturom rastvora proteina [8]. Podaci u vezi sa strukturnom prirodom stopljenih globula i delimično uvijenih intermedijera dobijeni su iz eksperimenata sa termodinamičkim intermedijerima proteina.

Postoje najmanje četiri glavne konformacije proteina (*Slika 2.2.*): (a) razvijena konformacija, tipično obuhvata veliki broj konformacija; (b) ansamblu nestrukturisanih tranzicionih intermedijera, sa minimalnim regionima sekundarnih struktura sličnim nativnim i kondenzovani su u odnosu na razvijeno stanje; (c) strukturirani kompaktni intermedijeri („klasične“ stopljene globule) sa sekundarnom strukturom sličnom nativnoj, topologijom i tercijarnim kontaktima, ali bez čvrstog pakovanja hidrofobnog jezgra koje se nalazi u nativnom stanju; (d) nativno stanje, u kome su bočni lanci čvrsto isprepleteni, što dovodi do gusto zbijene ukupne strukture.



*Slika 2.2.* Glavne konformacije proteina. Prilagođeno iz [38].

Karakteristična svojstva za „pravu“ stopljenu globulu su:

- Kompaktnost bliska nativnom stanju (hidrodinamički radijus veći za 10–20%), merena tehnikama kao što su viskozitet, dinamičko rasejanje svetlosti, gel hromatografija ili rasejanje rendgenskih zraka pod malim uglom.
- Sekundarne strukture slične nativnom stanju, a koje se mogu utvrditi tehnikama kao što su cirkularni dihiroizam (CD) ili infracrvena spektroskopija sa *Fourier*-ovom transformacijom (FTIR).
- Manji nivo uređenosti hidrofobnog jezgra u odnosu na nativnu konformaciju, o čemu svedoči nedostatak CD signala u bliskoj UV oblasti ili ekvivalentnost bočnih lanaca dobijenih iz 1D-NMR spektara.
- Značajna izložena hidrofobna površina u poređenju sa nativnom konformacijom, procenjena iz vezivanja hidrofobnih boja kao što je ANS (8-anilino-1-naftalensulfonska kiselina).
- Ograničena razlika entalpije i toplotnog kapaciteta između stopljene globule i potpuno razvijenog stanja.

Vezivanje fluorescentnih hidrofobnih boja kao što je ANS se često koristi da ukaže na prisustvo stopljenih globula [39]–[42]. Zasniva se na preferencijalnom vezivanju boje za intermedijer u poređenju sa nativnim stanjem, pri čemu je vezivanje za razvijena stanja izraženije od nativnog stanja zbog izloženosti hidrofobnih ostataka.

Iako stopljenoj globuli nedostaje potpuna uređenost hidrofobnog jezgra prisutna u nativnom stanju, ona zadržava visok nivo sekundarnih struktura sličnih nativnim [43]–[50]. Stopljene globule su kompaktne i u poređenju sa nativnim stanjem, njihovi hidrodinamički radijusi su povećani za do 15%, što se prevodi u ~50% povećanje zapremine [43]–[49], [51]–[62]. Imaju globularnu strukturu sličnu odgovarajućim nativnim globularnim proteinima [63]–[67]. Analiza stopljenih globula nekoliko proteina NMR spektroskopijom u rastvoru ukazuje da proteinski molekul u intermedijernom stanju, ne poseduje samo sekundarne strukture slične nativnim, već i tip uvijanja sličan nativnoj strukturi [47], [68]–[78].

### 2.1.2. Termodinamički aspekti uvijanja proteina

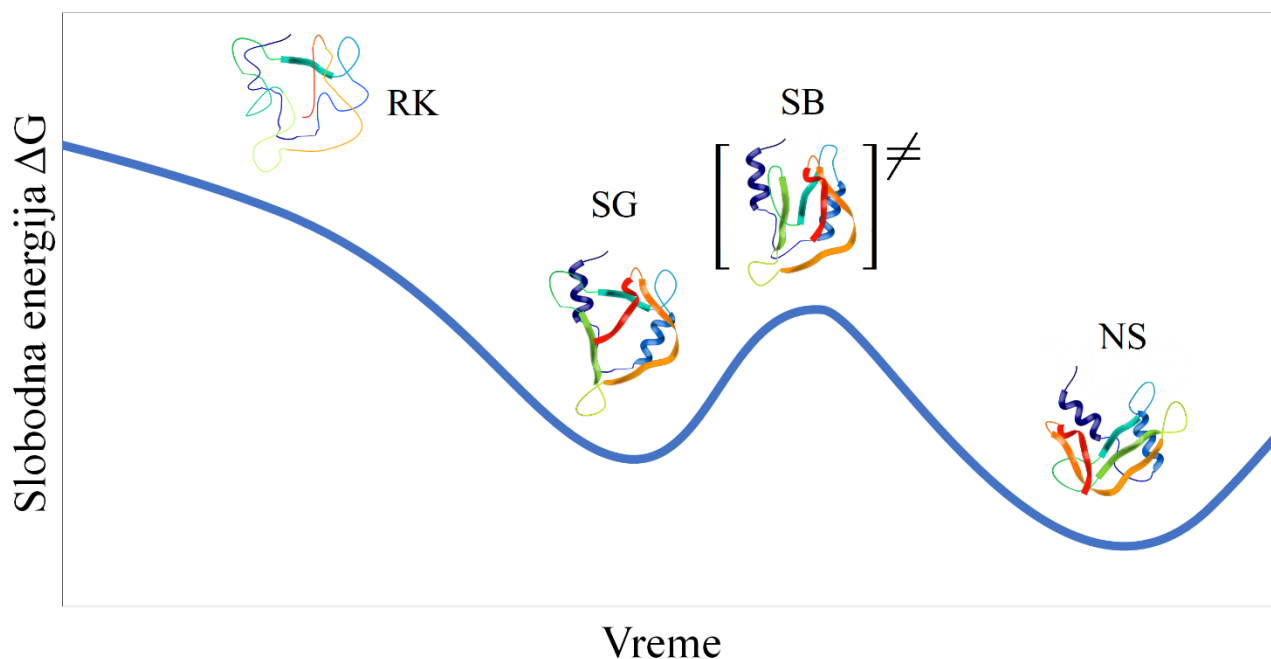
Pre nego što je detektovano intermedijerno stanje stopljene globule, denaturacija proteina se obično smatrala potpunim kooperativnim kolapsom jedinstvene globularne strukture proteina. Molekulska osnova kooperativne denaturacije proteina uključuje postojanje dva stabilna fazna stanja proteinskog lanca razdvojena barijerom slobodne energije. Proteinska globula ne može se denaturisati postepeno, bez energetske barijere [79] ili prevazilaženjem veoma niske barijere slobodne energije [80]. Denaturisani protein može imati gusto pakovanje, gotovo koliko i nativni protein, u zavisnosti od svojstava rastvarača i hidrofobnosti proteinskog lanca.

Globularni proteini poseduju polipeptidni lanac sa posebnom stabilnošću, fleksibilnim bočnim grupama koje su povezane sa rigidnom kičmom proteinskog lanca. Konformacija nativnog globularnog proteina poseduje čvrsto pakovanje, gotovo kao kod molekulskih kristala, bez kristalne rešetke. U proteinima, *Van der Waals*-ov radijus atoma zauzima 70–80% ravnotežnog rastojanja, dok u rastvorima zauzima 60–65% ravnotežnog rastojanja [81].

Aminokiselinski bočni ostaci (bočne grupe) proteina mogu biti podvrgnute rotacionoj izomerizaciji, skokovima između dozvoljenih konformacija. Svaki skok zahteva određenu slobodnu zapreminu u blizini lanca. Međutim, pošto nativna proteinska struktura ima kompaktno pakovanje, što doprinosi stabilnosti konformacije, svakom skoku je potrebna dodatna slobodna zapremina. (*Slika 2.3.*)



Ovakav mehanizam se odnosi na prelazak nativnog globularnog stanja u bilo koji denaturisani oblik [82]. Dakle, struktura proteina toleriše promenu uslova okoline do određene granice, a zatim nestaje kao celina. Ovo obezbeđuje pouzdanost njegovog biološkog funkcionisanja. Drugim rečima, iznenadni skok entropije koji se može desiti nakon što širenje globule pređe određeni prag, objašnjava poreklo tranzicije „sve ili ništa“ koja razdvaja nativno i denaturisano stanje. Takav globalni skok entropije se dešava zbog činjenice da se bočni lanci ne mogu osloboditi jedan po jedan, jer ih drži kruta kičma koja koordinirše njihove pozicije. Kod većih domena moguće je detektovati i postojanje trećeg, stabilnog intermedijernog stanja – stopljene globule, i u tim slučajevima se ne može govoriti o mehanizmu „sve ili ništa“.

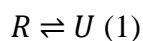


**Slika 2.3.** Glavna moguća stabilna stanja proteinskog molekula i nestabilno stanje barijere (SB) sa visokom slobodnom energijom koja obezbeđuje potpunu tranziciju između nativne strukture (NS) i stopljene globule (SG) i svih razvijenih konformacija. Plave linija označava relativnu slobodnu energiju  $\Delta G$  proteinskog molekula. Prilagođeno iz [38].

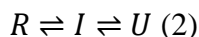
### 2.1.3. Kinetički parametri uvijanja proteina

Brojni dokazi ukazuju da je nativna struktura proteina stabilnija od razvijenih lanca u fiziološkim uslovima [39]–[41]. Vredno je napomenuti da ne postoji fundamentalna razlika između *in vivo* kotranslacionog uvijanja [83]–[85] i *in vitro* uvijanja skraćenih i kompletnih lanaca [86] za male proteine. Eksperimentalno izmerena vremena uvijanja kreću se od mikrosekundi za male, do sati za velike globularne proteine sa jednim domenom [13].

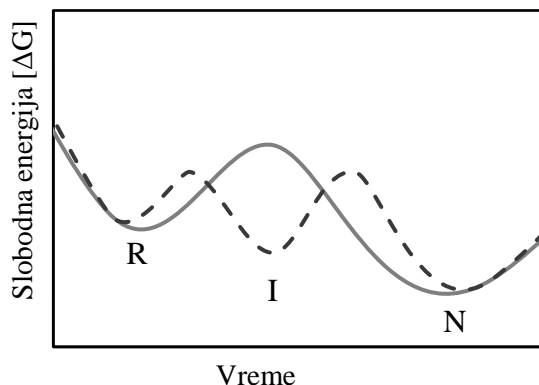
Razmatranje „Levinthal-ovog paradoksa“ dovelo je do ideje energetske pejzaža, gde proteinskih polipeptidni lanci teže da zauzmu nativne proteinske strukture što olakšava sekvencijalno uvijanje proteina (Slika 2.1d) [87]–[90]. Energetskim pejzažima predviđa se drastično smanje vremena potrebnog za uvijanje proteinskog lanca i bolje interpretira barijera slobodne energije koja razdvaja razvijena (R) i nativno (N) stanje proteina:



Uvijanja u kojima se ravnoteža i kinetika uvijanja/razdvijanja javljaju samo između R i N stanja, primećena su za veliki broj malih globularnih proteina, sa manje od 100 aminokiselinskih ostataka [91], [92]. Međutim, sugerisano je da postoje dva tipa globularnih proteina u smislu uvijanja, proteini sa dva stanja i proteini sa više od dva stanja [93]:



gde je I intermedijer uvijanja koji ima karakteristike stanja stopljene globule (*Slika 2.4*). Razumevanje odnosa između ova dva tipa proteina može biti važno za potpuno razumevanje molekulskih mehanizama uvijanja proteina. Iako jednačine (1) i (2) predstavljaju najjednostavnije šeme za uvijanje sa dva stanja i sa više od dva stanja sa jednim definisanim putem, reakcije uvijanja sa više paralelnih puteva su takođe primećene [94], [95]. Problem postojanja stabilnih intermedijera, odnosno model uvijanja proteina sa više od dva stanja, je polje koje trenutno predmet aktivnih istraživanja. Naime, formiranje kinetičkih, tranzicionih intermedijera se često dešava prebrzo da bi se direktno izmerilo konvencionalnim tehnikama [61], [96], [97]. Određeni iskoraci ka detekciji stabilnih intermedijera uvijanja proteina sa više od dva stanja su napravljeni korišćenjem merenjem promena fluorescencije triptofana [98], [99], [93], [100]–[107] fluorescencije ANS [100] i CD spektrometrijom [93], [101]–[108].



**Slika 2.4.** Energetski profili uvijanja proteina sa dva stanja (puna linija) i sa više stanja (isprekidana linija). R – razvijeno stanje, I – intermedijerno stanje (stopljena globula), N – nativno stanje.

## 2.2. Stabilnost proteina u rastvorima

### 2.2.1. Denaturacija proteina na niskim temperaturama

Denaturacija proteina na niskim temperaturama se obično odnosi na proces u kome se protein denaturiše smanjenjem temperature i predstavlja univerzalan fenomen [109]. Niska temperatura utiče na hidrofobne interakcije proteina u rastvoru i na samo uređivanje molekula vode u rastvoru, što na kraju dovodi do poremećaja efekta hidrofobnog kolapsa. U ovom odeljku biće predstavljen pregled načina kako, pored niske temperature i formiranje leda tokom zamrzavanja, dalji poremećaj hidrofobnih interakcija izaziva i lokalno povećanje koncentracije puferskih jona. Odnosno, kako promena koncentracija puferskih komponenti i aditiva u rastvoru dovodi do promene u termodinamičkim karakteristikama samog rastvora u bliskom okruženju proteina i kako kombinovani efekti mogu uticati na konformaciju proteina, 3D strukturu, aktivnost, denaturaciju i, na kraju, agregaciju [110]–[112].

Za native proteine se često kaže da su samo marginalno stabilni jer je termodinamička stabilnost mnogih nativnih proteina od 20-80 kJ/mol viša od odgovarajućih denaturisanih vrsta. Ovo je od kritične važnosti kad god na stabilnost i funkciju proteina utiču faktori sredine.

### 2.2.2. Kosmotropi i haotropi

Izrazi „kosmotrop“ (od grčkog κοσμος, red) i 'haotrop' (od grčkog chaos, kaos) predstavljaju rastvorene supstance koje stabilizuju, odnosno destabilizuju proteine i membrane. Haotropi razvijaju proteine, destabilizuju hidrofobne agregate i povećavaju rastvorljivost hidrofoba, dok kosmotropi stabilizuju proteine i hidrofobne agregate u rastvoru i smanjuju rastvorljivost hidrofoba [113].

Haotropne rastvorene supstance povećavaju entropiju sistema ometajući intramolekulske nekovalente interakcije kao što su vodonične veze, *Van der Waals*-ove i hidrofobne interakcije. Kako struktura i funkcija makromolekula zavise od neto efekta ovih sila, povećanje koncentracije rastvorenih haotropnih supstanci može denaturisati proteinske makromolekule i negativno uticati na enzimsku aktivnost. Takođe, kako uvijanje proteina zavisi od hidrofobnih interakcija aminokiselinskih ostataka polipeptidnih polimera i hidrofobnog efekta vode, haotropne rastvorene supstance, smanjujući neto hidrofobni efekat hidrofobnih regiona zbog poremećaja u strukturi vodoničnih veza molekula vode u hidratacionim ljuskama proteina i indirektno utiču upravo na ispoljavanje hidrofobnog efekta.

Haotropna disosovana jonska i nejonska jedinjenja ispoljavaju haotropni uticaj različitim mehanizmima. Dok haotropna nejonska jedinjenja direktno utiču na nekovalentne intramolekululske interakcije, jonska haotropna svojstva se ispoljavaju sprečavanjem stabilizacije sonih mostova i utiču na termodinamičke osobine vode, odnosno pojednostavljeno, utiču na karakter i dostupnost vodoničnih veza vode. Većina savremene literature koristi ove termine u kontekstu uticaja rastvorenih supstanci na strukturu vode u rastvorima makromolekula [114].

### 2.2.3. Hofmeister-ova serija

Jedan od ključnih faktora koji utiču na stabilnost proteina u rastvorima su liotropna svojstva svih činilaca datog rastvora. *Hofmeister*-ova serija ili niz predstavlja klasifikaciju jona po njihovim liotropnim svojstvima, odnosno empirijsko i kvalitativno rangiranje različitih jona prema njihovoj sposobnosti da talože smešu proteina belanaca kokošijeg jajeta. Serija je dobila ime po *Fraz*-u *Hofmeister*-u, pioniru u proučavanju i razumevanju kompleksnog fenomena efekta katjona i anjona na stabilnost proteina u rastvoru, koji se često naziva i *Hofmeister*-ov efekat (HE) [3], [115].

Iako mehanizam uticaja jona *Hofmeister*-ove serije na stabilnost proteina u rastvoru nije potpuno razjašnjen, pretpostavlja se da je rezultat promena u opštoj strukturi vode, odnosno specifičnih interakcija između jona, proteina i molekula vode [4].

Tipičan red jona u *Hofmeister*-ovom nizu je:

stabilizujući / kosmotropi	destabilizujući / haotropi
smanjena hidrofobna rastvorljivost	povećana hidrofobna rastvorljivost
$\text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- \sim \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^-$	
slabo hidratizirani anjoni	jako hidratizirani anjoni
$\text{N}(\text{CH}_3)_4^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Al}^{3+}$	
slabo hidratizirani katjoni	jako hidratizirani katjoni

Anjoni levo od  $\text{Cl}^-$  i katjoni levo od  $\text{H}^+$  mogu se podrazumevati kao kosmotropi jer imaju stabilizujuće efekte na proteine u rastvoru, dok se oni sa desne strane nazivaju haotropima, pri čemu je *Hofmeister*-ov efekat izraženiji kod anjona nego kod katjona. Kosmotropi, koji su „tvorci vodene strukture“, snažno su hidratizirani, imaju stabilizujući efekat na proteine i makromolekule. S druge strane, poznato je da haotropi („razbijači vodene strukture“) destabilizuju nativnu strukturu proteina.

*Hofmeister*-ova serija, sa najmanje 38 uočenih činilaca, poseduje opštu korisnost [4], [5], [115], uključujući efekte na strukturu i/ili denaturaciju bioloških makromolekula, efekte na hidrataciju i uticaj na pH vrednost rastvora. Relativne položaje jona u seriji treba smatrati samo indikativnim jer postoje varijacije zavisno od proteina, pH, temperature, koncentracije jona, rastvorenih gasova, osetljivosti metoda itd.

Ukratko, proteini su najstabilniji u rastvoru kada su okruženi molekulima vode koji su povezani vodoničnim vezama. Kako su joni soli ravnomerno raspoređeni u rastvoru, jer je njihova distribucija kontrolisana osmotskim gradijentom, haotropni joni sa slabim vodenim interakcijama su jače vezani za proteine dok su kosmotropski joni sa dobrom hidratacijom udaljeniji od proteina u vodenoj masi.

#### 2.2.3.1. Termodinamičke osobine jona Hofmeister-ove serije

Termodinamički parametri mogu biti indikativni za pozicioniranje jona u okviru *Hofmeister*-ove serije i izlistani su u *Tabeli 2.1*. Joni koji poseduju veliku gustinu naelektrisanja jače vezuju veće vodene klastere što korelira sa njihovim molarnim jonskim zapreminama (MJZ), odnosno joni izazivaju kontrakciju zapremine vode zbog svoje velike gustine naelektrisanja, upravo srazmerno

*Hofmeister*-ovom efektu. Entropije hidratacije koreliraju sa tendencijom da se pri rastvaranju smanjuje entropija vode [116].

Joni koji su slabo hidratirani pokazuju manju promenu viskoziteta sa koncentracijom, što se ogleda u negativnim *Jones-Dole*-ovim (B) koeficijentom (haotropi) i slabljenju mreže vodoničnih veza vode, dok su jako hidratirani joni sa pozitivnim B koeficijentom (kosmotropi) i vode jačanju mreže vodoničnih veza. Broj snažno vezanih molekula vode dobijenih koligativnim svojstvima je u korelaciji sa *Hofmeister*-ovom serijom, što B koeficijenti viskoznosti odlično ilustruju .

Slični efekti se mogu primetiti sa povećanjem jonskog površinskog napona,  $k_i = \Delta\gamma/\Delta c_i$  ( $\text{mN m}^{-1} \text{M}^{-1}$ ) [6], gde pozitivnije vrednosti ukazuje na jone koji sa vodom imaju nekonstruktivne interakcije.

Uticaj jona se može primetiti i u povećanju (viša traka na  $2.600 - 3.420 \text{ cm}^{-1}$ ) i smanjenju (niža traka na  $3.420 - 3.800 \text{ cm}^{-1}$ ) apsorpcije traka koje potiču od istežanja O-H u infracrvenim spektrima sa prigušenom totalnom refleksijom (od engleskog *attenuated total reflectance* - ATR). Očekuje se da će joni sa pozitivnim vrednostima  $\Delta\text{MA}_{\text{L-H}}$  ojačati vodonične voda-voda veze u svojim hidratacionim slojevima, a samim tim i povećati uređenost vodenih klastera, dok će ih oni sa negativnim vrednostima  $\Delta\text{MA}_{\text{L-H}}$  oslabiti [117]. Ovi parametri mogu biti od izuzetno korisni ukoliko se infracrvena spektroskopija koristi kao metoda za određivanje svojstava proteina u rastvorima u kojima konfigurišu i joni iz *Tabele 2.1*.

**Tabela 2.1.** Ključna svojstva hidratiranih jona. MJZ - Molarna jonska zapremina,  $\text{cm}^3/\text{mol}$  na 298,15 K; negativna vrednost ukazuje na kontrakciju zapremine;  $\Delta S$  - Entropija hidratacije,  $\text{kJ/mol}$ , 298,15 K; standardna molarna entropija umanjena za entropiju primarne hidrirane vode (odnosno, njena imobilizacija); B - Viskozitet Jones-Dole B-koeficijent,  $\text{dm}^3/\text{mol}$  na 298,15 K;  $k_i$  - Povećanje površinskog napona,  $\text{mN/m}\cdot\text{M}$  u opsegu koncentracija 0,1 M - 1,0 M (4) [6];  $\Delta\text{MA}_{\text{L-H}}$  - razlika u površini FTIR traka na  $(2.600 - 3.420) \text{ cm}^{-1}$  i  $(3.420 - 3.800) \text{ cm}^{-1}$  poređeno sa  $\text{SO}_4^{2-}$  (5) [117]; nd - nije dostupno; Ref. - Reference.

Katjoni	MJZ	$\Delta S$	B	$k_i$	$\Delta\text{MA}_{\text{L-H}}$	Anjoni	MJZ	$\Delta S$	B	$k_i$	$\Delta\text{MA}_{\text{L-H}}$
$\text{Al}^{3+}$	-58.7	-396	0.67	2.65	nd	$\text{HPO}_4^{2-}$	nd	nd	0.382	0.7	nd
$\text{Mg}^{2+}$	-32.2	-174	0.385	2.25	3522	$\text{CO}_3^{2-}$	nd	nd	+0.29	nd	nd
$\text{Ca}^{2+}$	-28.9	-132	0.298	2.10	1241	$\text{SO}_4^{2-}$	25	-126	0.206	0.55	0.00
$\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$	84.1	nd	0.123	-0.10	nd	$\text{F}^-$	4.3	-70	0.127	0.8	nd
$\text{Nd}^+$	-6.7	-5	0.085	1.20	-324	$\text{HCO}_3^-$	nd	nd	+0.03	nd	nd
$\text{H}^+$	-5.5	nd	0.068	-1.05	nd	$\text{Cl}^-$	23.3	6	-0.005	0.9	-1224
$\text{NH}_4^+$	12.4	5	-0.008	0.70	nd	$\text{Br}^-$	30.2	28	-0.033	0.55	-1804
$\text{K}^+$	3.5	34	-0.009	1.10	-335	$\text{NO}_3^-$	34.5	9	-0.045	0.15	-1770
$\text{Rb}^+$	8.6	52	-0.033	0.95	-255	$\text{ClO}_4^-$	49.6	30	-0.061	-0.7	-2584
$\text{Cs}^+$	15.8	59	-0.047	0.80	-15	$\text{I}^-$	41.7	55	-0.073	-0.05	-2405
Ref.	[118]	[118]	[118]	[6]	[117]	Ref.	[118]	[118]	[118] [119]	[6]	[117]

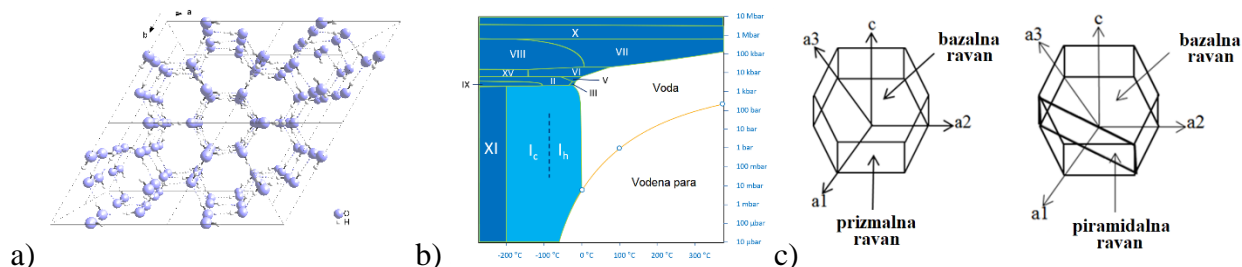
## 2.2.4. Struktura leda

Led se može naći u različitim polimorfnim oblicima. Pojedinačni molekuli vode u ledu mogu biti trodimenzionalno organizovani na više načina, zavisno od temperature i pritiska. Do sada je eksperimentalno uočeno najmanje 17 faza kristalnog leda [120], [121]. Na primer, struktura kristala može biti heksagonalna (led  $I_h$  i XVII), kubična (VII, X, XVI), romboedarska (II i IV), tetragonalna (III, VI, VIII, IX, XII), monoklična (V, XIII), ili ortorombična (XI, XIV, XV). Međutim, slika još nije potpuna i DFT simulacijama (od enleskog *density functional theory* – teorija funkcionalne gustine) nedavno su identifikovane čak 74.963 potencijalne strukture leda [122].

Najčešći oblik leda ispod 0 °C i pri atmosferskom pritisku je heksagonalna jedinica leda  $I_h$ . [123], [124] i poseduje pravilnu kristalnu strukturu u kojoj je jedan atom kiseonika vezan vodoničnim vezama za dva atoma vodonika (*Slika 2.5.*). Heksagonalnu jedinicu kristalne rešetke  $I_h$  karakterišu četiri ose,  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$  i  $c$ , a heksagonalna jedinica ima osam lica. Dva od ovih lica su normalne na  $c$ -osu i predstavljaju bazalne površine, a preostalih šest su lica prizme (*Slika 2.5c.*). Raspored intermolekulskih vodoničnih veza utiče na svojstva i faze leda. Na 0 °C i atmosferskom pritisku led najbrže raste duž  $a$ -ose dajući kristale heksagonalnog oblika koji rastu kao listovi.

Zajedno sa ledom  $I_h$  pri atmosferskom pritisku može nastati i led  $I_c$ , koji karakteriše kubični kristal [125], i u poređenju sa  $I_h$  oblikom pokazuje nižu nukleacionu barijeru [126]. Može nastati u malim kapljicama na veoma niskoj temperaturi u zavisnosti od prisustva rastvorenih supstanci [127].

Takođe je primećeno iz podataka o difrakciji da uzorci leda  $I_c$  nisu u potpunosti kubični, već sadrže i heksagonalno uređenje. Ova struktura, u kojoj konfiguriraju heksagonalni i kubični oblici leda u smeši, naziva se led  $I_{sd}$  i sugerisano je da je led  $I_{sd}$  možda čak i stabilniji od čistog  $I_h$  leda [128].

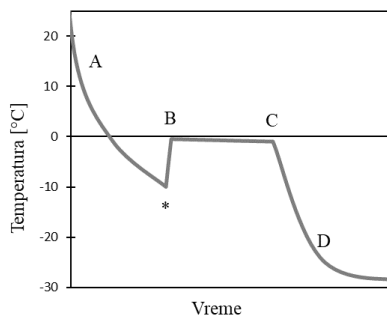


**Slika 2.5. (a) Kristalna struktura leda  $I_h$ . Isprekidane linije predstavljaju vodonične veze; (b) Fazni prelazi leda  $I_c$  i  $I_h$  u korelaciji sa drugim fazama leda; (c) šematski prikaz heksagonalne jedinice kristalne rešetke  $I_h$  leda koja ilustruje ose  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$  i  $c$  i bazalnu, prizmalnu i piramidalnu ravan.**

Kada je led prisutan u vodenom rastvoru, na dodirnoj površini kristalne rešetke leda i vodene mase nema naglog prelaza. Studije su pokazale da postoji polu-uređeni sloj između visoko uređene ledene rešetke i manje uređene vode koja okružuje kristale leda [129]. Ovaj sloj je nazvan kvazitečni sloj - QLL (od engleskog *quasi-liquid layer*) [130], [131]. Debljina dodirne površine kristalne rešetke leda i vodene mase je približno 10 - 15 Å. Stvarna debljina QLL faze u funkciji temperature nije dovoljno ispitana, ali gruba procena je da je uporediva sa razmakom rešetke na  $T \approx -10$  °C, i da se brzo povećava približavajući se temperaturi topljenja [132].

Tokom procesa zamrzavanja vode, kristalizacija prolazi kroz nekoliko faza (*Slika 2.6.*). Najpre se rastvor prehladi ispod ravnotežne tačke zamrzavanja (segment A-\* na *Slici 2.6.*). Prehlađeni rastvor

predstavlja metastabilno stanje, tokom kog molekuli vode teže formiranju klastera sa dugotrajnim vodoničnim vezama [133] i kada je temperatura dovoljno niska da omogući prelazak energetske barijere za proces nukleacije, kristalizacija leda se brzo dešava u celom rastvoru (tačka \* na Slici 2.6.) pri čemu dolazi do oštrog porasta temperature rastvora do vrednosti koja je bliska ravnotežnoj tački zamrzavanja. Daljim hlađenjem rastvora, dolazi do rasta kristala leda adsorpcijom molekula vode na površinu kristala leda i novih nukleacija istovremeno (segment B-C na Slici 2.6.). Konačno, da bi se obezbedilo potpuno očvršćavanje, potrebno je da se nastavi sa hlađenjem rastvora (segment C-D na Slici 2.6.) [134]. Rastom kristala leda upravljaju dva fizička fenomena, kinetika vezivanja za površinu kristala leda i difuzija kroz rastvor.



**Slika 2.6. Temperaturni profil tokom zamrzavanja vodenog rastvora.**

#### 2.2.4.1. Uticaj zamrzavanja na stabilnost proteina

Proces zamrzavanja izazva štetne efekte za protein u rastvoru i dovodi do denaturacije, agregacije i gubitka aktivnosti. Brojni fenomeni mogu doprineti neželjenim konformacionim promenama proteina, uključujući denaturaciju na niskim temperaturama, indirektno povećanje koncentracije sastojaka rastvora i formiranje kristala leda [135], [136].

Na fizičko okruženje proteina snažno utiče proces indirektnog povećanja koncentracije rastvoraka, koji izaziva varijacije u jonskoj sili, relativnom sastavu rastvorenih supstanci, promenu pH vrednosti usled kristalizacije komponenti pufera [137] i fenomena razdvajanja faza [138]. Ukoliko je protein stabilan u uskom opsegu pH vrednosti, taloženje komponenti pufera može dovesti do denaturacije. Ove prividne promene u kiselosti mogu biti povezane sa promenama u pK vrednosti sastojaka preferencijalnim uključivanjem molekula vode iz vodene mase kristalima leda. Brzine degradativnih procesa, kao što su hidroliza i oksidacija, mogu se povećati tokom procesa zamrzavanja [139], [140]. Nedavno je predloženo da formiranje klastera vode na temperaturama ispod temperature zamrzavanja katalizuje reakcije prenosa protona u reakcijama hidrolize i deaminacije [141].

Na niskim temperaturama hidratacija nepolarnih ostataka je izraženija i molekuli vode mogu narušiti strukturu proteina, promovišući izlaganje hidrofobnog jezgra i gubitke u sadržaju sekundarnih struktura. Ovaj fenomen naziva se denaturacija na niskim temperaturama i uzrokovan je smanjenom entalpijom interakcije vode i hidrofobnih ostataka, a rezultuje formiranjem kompaktnih, delimično neuvijenih stanja proteina i visokim stepenom penetracije rastvarača u hidrofobno jezgro [110], [142]–[147].

Formiranje kristala leda predstavlja još jedan kritičan faktor u destabilizaciji proteina. Dramatično smanjenje fosforescencije ostatka Trp-48 u rastvorima azurina nakon formiranja leda [148], sugerise da do destabilizacije proteina dolazi formiranjem kristala leda. Denaturacija proteina kao što su cilijarni neurotrofni faktor (CNTF), fosfofruktokinaza (PFK), laktatdehidrogenaza (LDH), glutamatdehidrogenaza (GDH), antagonist interleukina-1 receptora (IL-1ra) i protein koji vezuje

faktor nekroze tumora (TNFbp), tokom zamrzavanja/odmrzavanja povezana je sa povećanjem dodirne površine led-voda [149].

Sniženje aktivnosti katalaze,  $\beta$ -galaktozidaze i LDH primećeno je tokom brzog zamrzavanja [150]. Formiranje nerastvorljivih agregata humanog hormona rasta (hGH) povećava se sa povećanjem brzine hlađenja što dovodi do formiranja manjih kristala leda koji imaju veći odnos površine i zapremine [151].

Sarciauk et al. predložili su mehanizam formiranja agregata koji uključuje denaturaciju goveđeg imunoglobulina (IgG) na dodirnoj površini leda i rastvora. Denaturacija je bila reverzibilna nakon odmrzavanja, dok je pri liofilizaciji i naknadom rekonstitucijom bila ireverzibilna, a pri brzom hlađenju primećena je povećana agregacija. Povišenje koncentracije proteina poboljšalo je procenat detektovane aktivnosti proteina nakon zamrzavanja/odmrzavanja. Kako je povećanje dodirne površine između leda i rastvora konačno, količina apsorbiranih molekula proteina na površinu leda je fiksna, i povišenjem koncentracije proteina smanjuje se procenat apsorbiranih molekula proteina [150], [152].

Fluorescencija triptofana nativnog i denaturisanog proteina azurina mutanta C112S iz *Pseudomonas aeruginosa*, ukazuje da je njegova stabilnost značajno umanjena u prisustvu leda. Stabilnost zavisi od količine vode koja je u ravnoteži sa ledom, pri čemu interakcija protein-led povećava površinu nativne strukture koja je dostupna rastvaraču, a smanjuje površinu denaturisane konformacije [153].

U skladu sa ovim zapažanjem, primećen je značajan gubitak aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) pri zamrzavanju. Međutim, u koncentrovanim rastvorima na istoj temperaturi, ali bez leda, nije došlo do denaturacije, što sugerise da je formiranje leda odlučujući faktor prilikom denaturacije proteina [154].

Slično, infracrvena spektroskopija LDH i humanog imunoglobulina (IgG) pokazuje povećanje intermolekulskih  $\beta$ -pločica pri interakciji sa kristalima leda [155]. IC spektri ova dva proteina koji su bili udaljeni od površine kristala leda, slični su spektrima prikupljenim iz početnog rastvora što sugerise da je blizina površine leda ključna za promovisanje konformacionih promena. U sličnoj studiji, agregacija IgG2 na  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  bila je povezana sa formiranjem leda [156].

#### 2.2.4.2. Uticaj površine leda na stabilnost proteina

U prethodnom odeljku predstavljeni su dokazi o negativnom uticaju formiranja leda na stabilnost proteina. Međutim, pitanje koje se spontano nameće iz prethodne diskusije je: koji su razlozi u osnovi ledom izazvane denaturacije proteina? Ono što otežava odgovor je odsustvo hemijskih razlika između vode i leda. Štaviše, strukturne razlike su takođe minimalne, pošto su i voda i led sastavljeni od tetraedarske mreže molekula vode povezanih vodoničnom vezom. Zašto bi jedna ista supstanca čije su strukture neznatno različite u njena dva agregatana stanja, uticala na ponašanje proteina na tako različit način? Ovo predstavlja intrigantno i složeno polje istraživanja, pre svega zato što trenutno nije dostupno mnogo eksperimentalnih tehnika za potpuno rešavanje ovog problema.

Strambini i Gabellieri [148] sugerisu da konformacione promene proteina mogu nastati iz direktne interakcije između proteina i površine leda, kao što je šematizovano na *Slici 2.7a*. U tom kontekstu, detektovano je nakupljanje proteina mleka [157] i albumina [158], [159] u blizini površine leda, korišćenjem svetlosne i transmisionne elektronske mikroskopije odnosno konfokalne Ramanske mikrospektroskopije. Utvrđeno je da se rekombinantni humani interferon- $\gamma$  (rhIFN- $\gamma$ ) akumulira na površini led/tečnost tokom liofilizacije, ali značajno manjim intenzitetom nego na površini vazduh/tečnost [160]. Akumulacija rhIFN- $\gamma$  na površini led/tečnosti tokom liofilizacije, nije odgovorna za agregaciju, već pri sledećem koraku, sušenju, dolazi do agregacije denaturisanog polipeptida [161].



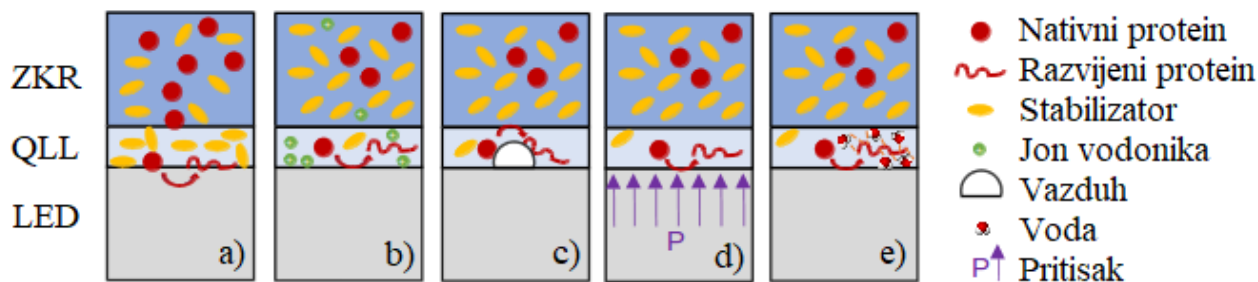
Međutim, osim ukoliko protein ne pokazuje antifriz svojstva, izlišno je diskutovati o njegovoj direktnoj adsorpciji na kristale leda. NMR studije u čvrstom stanju pokazuju da se hidrataciona ljuska proteina koji nemaju antifriz svojstva, ne zamrzava ispod temperature zamrzavanja rastvora [162], [163]. Ubikvitin zadržava svoju hidratacionu ljusku čak i na  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pri čemu ne dolazi do njegove direktne interakcije sa površinom leda [164]. Uopšteno, pretpostavlja se da se većina proteina ponaša kao ubikvitin i da hidrataciona ljuska ostaje u kvazitečnom obliku do temperatura koje su mnogo niže od ravnotežne temperature zamrzavanja [165]. Stoga nikakva direktna interakcija sa ledom ne bi bila moguća iznad ove temperature.

Rezultati sinhrotronske difrakcije rendgenskih zraka visoke rezolucije dalje sugerišu da albumin goveđeg seruma ima tendenciju da se situira u kvazitečnom sloju vode iznad kristala leda, ali bez njegovog direktnog adsorbovanja na površinu leda [166]. Slično ponašanje je primećeno za rekombinantni humani albumin i monoklonska antitela [167].

Treba imati na umu da fizičko mikrokruženje proteina ograničenog unutar QLL sloja može biti značajno drugačije od onog koji se nalazi u vodenoj masi i stabilizator koji nije u vodenoj masi neće ispoljavati svoj krioprotektivni efekat. Bhatnagar et al. [167] predložili su model interakcije protein/led gde gradijenti koncentracije u tečnoj fazi u blizini kristala leda zavise od pokretljivosti vrsta koje se nalaze u rastvoru i zapreminski veće vrste imaju tendenciju da se koncentrišu bliže površini leda, zbog svoje manje pokretljivosti. Istovremeno, pH u QLL se može smanjiti zbog prisustva negativnog naelektrisanja na površini kristala leda [167], [168]. Dvostruki električni sloj koji se na kraju formira može dovesti do povećane koncentracije katjona, uključujući jone vodonika (*Slika 2.7b.*).

Drugo moguće objašnjenje uključuje zarobljavanje vazduha na površini leda. Koristeći fluorescentnu mikroskopiju, primećeno je da nekoliko vazdušnih mehurića može ostati zarobljeno između kristala leda [150]. Mehurići vazduha su takođe primećeni optičkom mikroskopijom i rasejanjem neutrona pod malim uglom [169], [170]. Proteini se mogu denaturisati na hidrofobnoj površini vazduh-voda (*Slika 2.7c.*). Predloženo je i da sličnim mehanizmom rast kristala leda dovodi do povećanja koncentracije rastvorenih gasova [136] i ovako zarobljeni kiseonik može ubrzati reakcije oksidacije polipeptida tokom zamrzavanja [171], [172]. Poremećena populacija kristala leda primećena je sinhrotronskom difrakcijom rendgenskih zraka visoke rezolucije u zamrznutim rastvorima rekombinantnog humanog albumina, lizozima, antifriz proteina insekata i monoklonskog antitela [167]. Ova neuređena populacija ledenih kristala identifikovana je kao oblik leda pod visokim pritiskom, led III ili led IX. Ovo zapažanje objašnjava se ekspanzijom zapremine koja može nastati tokom formiranja leda, a koja može dovesti do mehaničkih naprezanja i visokog lokalnog pritiska. Vrednosti pritiska izazvanog zamrzavanjem koje prelaze 2 kBar, teoretski su predviđene [136]. Razvijanje proteina može biti izazvano povišenjem pritiska [173], a kombinacija povišenog pritiska i niske temperature može imati sinergijski efekat na razvijanje proteina [174] (*Slika 2.7d.*).

Teorijskim metodama molekulske dinamike proteina L (poreklom od bakterijske vrste *Peptostreptococcus magnus*) [175], efekat površine leda predložen je kao dodatan faktor koji utiče na denaturaciju na niskim temperaturama. Primećeno je da je protein destabilizovan u prisustvu ledene ploče, u poređenju sa rastvorom u rasutom stanju na istoj temperaturi bez leda. Iako nije pokazana direktna interakcija između proteina i površine, uočena je denaturacija posredovana obližnjim slojem „tečnih“ molekula vode. Ovi molekuli značajno usporeni prisustvom leda formiraju znatno veći broj vodoničnih veza sa proteinom, učestvuju u solubilizaciji čak i nepolarnih delova koji su generalno slabo hidratirani. Ove vodonične veze su izuzetno jake i podsticale su prodiranje rastvarača u protein L i posledično izlaganje njegovog hidrofobnog jezgra, što je uobičajena karakteristika denaturacije na niskim temperaturama [147] (*Slika 2.7e.*).



**Slika 2.7.** Mogući mehanizmi, ledom izazvane, denaturacije proteina (zamrzavanjem koncentrovan rastvor – ZKR, kvazi tečni sloj – QLL (od engleskog *quasi-liquid layer*). (a) Adsorpcija na površini leda [148]; (b) raspodela proteina u QLL, gde je koncentracija stabilizatora smanjena, a lokalni pH je kiseliji nego u rastvoru koncentrovanom usled zamrzavanja [167]; (c) Akumulacija vazdušnih mehurića na površini i unutar leda [136], [155]; (d) Razvijanje proteina izazvano pritiskom usled mehaničkih naprezanja povezanih sa rastom i tipom leda [167]; (e) Pojačavanje fenomena denaturacije na niskim temperaturama, posredovanih molekulima tečnosti u QLL [175]. Preuzeto i prilagođeno iz [176].

## 2.2.5. Nejonski surfaktanti

Nejonski surfaktanti, niosurfaktanti, su amfifilna jedinjenja čije polarne grupe ne nose električnu šaržu (*Slika 2.8.*) i obično se oslanjaju na funkcionalnu grupu koja je sposobna da ostvari vodonično vezivanje i potencijalno bude deprotonovana. Obično su to kovalentno vezane hidrofilne grupe koje sadrže kiseonik i koje su vezane za hidrofobne strukture. Iako nisu dobre *Brønsted*-ove kiseline, obezbeđuju pristojnu rastvorljivost u polarnim rastvaračima, na primer, u vodi [177]. Uopšteno, rastvorljivost nejonskih surfaktanata niže su od rastvorljivost jonskih surfaktanata, ali ne menjaju pH rastvora i njihova kritična koncentracija za formiranje micela je, u poređenju sa jonskim surfaktantima, obično viša, što može biti od prednost jer omogućava višu koncentraciju surfaktanata u rastvoru bez potencijalno neželjenog rizika formiranja micela [178].

Nejonski surfaktanti su izuzetno korisni jer su blagi i ne narušavaju potencijalne specifične protein/ligand interakcije dok i dalje zadržavaju potencijal za rastvaranje nepolarnih jedinjenja i agregata, na primer, fosfolipida dvoslojnih membrana. To ih čini pogodnim za narušavanje integriteta ćelijskih membrana u procesu koji se naziva (ćelijsko) liziranje [7]. Razlike između pojedinačnih tipova nejonskih surfaktanata su neznatne, a izbor je prvenstveno vođen uzimajući u obzir njihova svojstva (np. efikasnost, efektnost, toksičnost, dermatološku kompatibilnost, biorazgradljivost) ili dozvole koje su vezane za tehnologiju hrane [7].

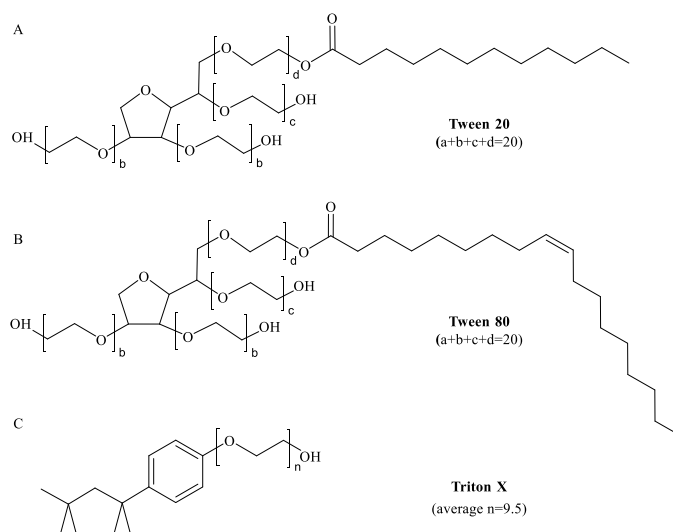
Polisorbat 20 (komercijalni brendovi uključuju *Kolliphor PS 20*, *Scattics*, *Alkest TW 20*, *Tween 20* i *Kotilen-20* u daljem tekstu Tween 20) i polisobat 80 (*Kolliphor PS 80*, *Montanox 80*, *Alkest TW 80*, *Tween 80*, *PS 80*, *Kotilen-80* u daljem tekstu Tween 80) su nejonski surfaktanti koji su zasnovani na sorbitanu (proizvod dehidratacije sorbitola), zbog čega se obično nazivaju polisorbitanskim surfaktantima (*Slika 2.8.*). Tri bočne grupe oligoetilen glikola, različite dužine, vezane su za ugljenohidratnu komponentu sorbitana povećavajući hidrofilnost glavne grupe i zajedno čine jezgro svih Tween surfaktanata. Hidrofobni rep čine masne kiseline povezane estarskim vezama sa oligoetilen-glikolskim repom pri čemu u Tween 20 konfigurira laurinska kiselina, a u Tween 80 oleinska kiselina [179]. Njihova stabilnost i relativna netoksičnost omogućavaju im da se koriste kao detergentski i emulgatori sa brojnim naučnim, farmakološkim i primenama u domaćinstvu.

Neke od primena Tween-a 20 su kao sredstvo za sprečavanje nespecifičnog vezivanja antitela u imunotestovima kao što su *Western blotovi* i ELISA u Tris ili fosfatnim puferima u razblaženjima od 0,05% do 0,5% v/v, za stabilizaciju proteinskih rastvora i kao sredstvo za rastvaranje membranskih proteina, za liziranje ćelija u koncentracijama od 0,05% do 0,5% v/v i generalno u kombinaciji sa drugim detergentima, solima i aditivima.

Tween 80 se koristi kao emulgator u tehnologiji hrane. Interesantna je njegova upotreba u industriji sladoleda, gde u koncentracijama do 0,5% (v/v), omogućava glatkoću, lakše rukovanje i povećanu otpornost na topljenje [180]. Tween 80 sprečava da proteine mleka potpuno oblože kapljice masti. Ovo im omogućava da se spoje u lance i mreže, koje zadržavaju vazduh u smeši i obezbeđuju čvršću teksturu koja zadržava svoj oblik dok se sladoled topi. Koristi za stabilizaciju vodenih formulacija lekova za parenteralnu primenu [181], kao ekscipijent u vakcinama [182]. Sa fenol crvenim se koristi kao test za identifikaciju fenotipa soja ili izolata u mikrobiološkim kulturama [183].

Triton X-100 (*Slika 2.8.*) je nejonski surfaktant koji poseduje hidrofilni polietilenski lanac sa u proseku 9,5 etilenoksidnih jedinica i aromatičnu lipofilnu, hidrofobnu grupu, dok je ugljovodonična grupa 4-1,1,3,3-tetrametilbutil-fenilna grupa. Triton X-100 je registrovani zaštićen proizvod kompanije Rohm & Haas Co. Najčešće se koristi za liziranje ćelija i ekstrakciju proteina ili organela, kao i za permeabilizaciju membrana živih ćelija [184], inaktivaciju virusa sa lipidnim omotačem [185], solubilizaciju membranskih proteina u kombinaciji sa zwitter-jonskim deterdžentima kao što je CHAPS [186], za ograničavanje širenja kolonija kod *Aspergillus nidulans* [187], za decelularizacija

tkiva [188], uklanjanje SDS-a iz SDS-PAGE gelova pre renaturisanja proteina unutar gela, sastojak je u vakcinama protiv gripa [189] i dr.



**Slika 2.8. Nejonski surfaktanti Tween 20, 80 i Triton X-100.**

### 2.2.5.1. Uticaj nejonskih surfaktanata na stabilnost proteina na niskim temperaturama

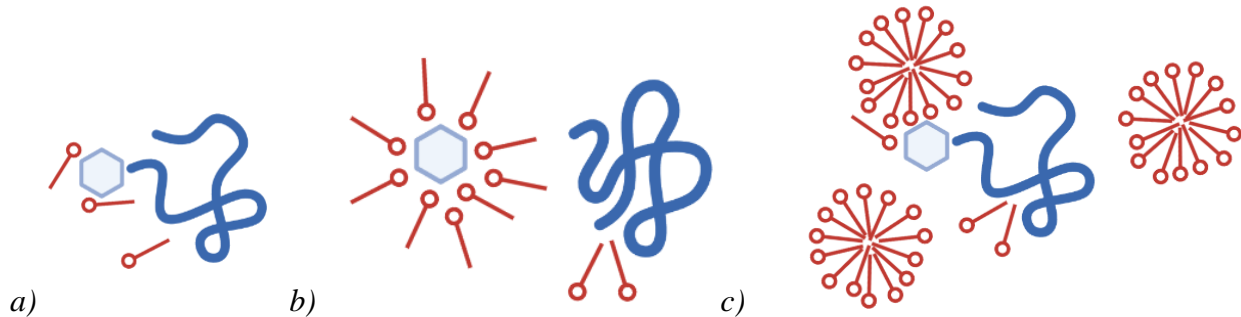
Predloženo je nekoliko mogućih mehanizama za protekciju proteina surfaktantima na niskim temperaturama. Pri specifičnoj interakciji sa hidrofobnim mestima na proteinu, nejonski surfaktanti slabo da se vezuju za površinu proteina [190]–[192]. Zaštitna sposobnost je u korelaciji sa količinom surfaktanta potrebnog za zasićenje ovih hidrofobnih površina, odnosno molarni odnos surfaktanta prema proteinu. Interakcija između surfaktanta i proteina je slaba na sobnoj temperaturi, što je utvrđeno fluorescentnom spektroskopijom i difuzionim NMR eksperimentima [193].

Prvi mogući mehanizam zaštite je situacija u kojoj ne postoje interakcije aditiva sa površinom proteina. Ovo bi stvorilo termodinamički nepovoljan sistem, posebno ako je protein denaturisan, jer se površina polipeptida izložena rastvaraču povećava sa razvijanjem proteina. Stoga se favorizuje najstabilniji sistem, nativna struktura [194]. Primer je polietilen glikol (PEG) koji štiti proteine ovim mehanizmom [194]. Surfaktanti su, međutim, generalno aktivni u niskim koncentracijama i ovi entropijski efekti zapremine se mogu zanemariti.

Druga teorija je da se denaturacija dešava na dodirnoj površini led-voda. Brzo hlađenje dovodi do stvaranja malih kristala leda, sa većom površinom od kristala koji nastaju sporim hlađenjem. Kako brzo hlađenje stvara mnogo veći stres za proteine od sporog hlađenja [9], [148]–[150], [195], surfaktanti mogu stabilizovati strukturu proteina takmičeći se sa proteinom za adsorpciju na površini led-voda. Stabilnost proteina zavisi od koncentracije i koncentrovaniji rastvor proteina će biti otporniji na denaturaciju izazvanu zamrzavanjem. Ova suštinska stabilnost može biti posledica oštećenja i denaturacije proteina na dodirnoj površini led-voda tokom zamrzavanja. Ako se konačan broj proteinskih molekula može denaturisati na površini led-voda, onda će povećanje koncentracije dovesti do manjeg procenta oštećenih molekula [196].

Zaštitne sposobnosti Tween-a 80 prema LDH proizilaze iz kompeticije surfaktanta sa proteinom za vezivanje na površini leda, kao što je šematski ilustrovano (Slika 2.9.). U dovoljnim koncentracijama, Tween 80 smanjuje mogućnost interakcije proteina sa kristalima leda. Kada je količina Tween molekula dovoljno velika da potpuno pokrije površinu leda, LDH je potpuno zaštićen od denaturacije,

ali ukoliko se koncentracija poveća do kritične koncentracije za formiranje micela, delovi površine leda mogu ostati dostupni za destruktivne interakcije sa proteinom. Sa daljim povećanjem koncentracija iznad kritične koncentracije za formiranje micela na temperaturi kristalizacije površina leda može biti se manje pokrivena. Kako je površina leda odnosno veličina kristala leda u korelaciji sa brzinom hlađenja, potrebna je veća koncentracija nejonskih surfaktanata za potpunu zaštitu proteina ukoliko se brzina hlađenja poveća [194].



**Slika 2.9. Ilustracija mogućih interakcija između Tween-a 80 (crveni štapići), leda (svetlo plavi heksagoni) i LDH (tamnoplavo) u čvrstom stanju pri različitim koncentracijama Tween-a 80 (koncentracija raste od *a* ka *c*). Prilagođeno iz [194].**

## 2.3. Model peptidaze

### 2.3.1. Tripsin

Tripsin (EC 3.4.21.4) prvi je opisao i nazvao *Kühne* [197] 1876. godine kao proteolitičku aktivnost u sekretima pankreasa [198]. *Kühne* je ovu aktivnost razlikovao od aktivnosti pepsina po višoj optimalnoj pH vrednosti ovog preparata. Kako je postignuto razdvajanje i karakterizacija pojedinačnih peptidaza pankreasa, naziv tripsin je postao povezan sa peptidolitičkom aktivnošću koja katalizuje hidrolizu peptidne veze posle Arg ili Lis. Dostupnost tripsina iz goveđeg pankreasa omogućila je prečišćavanje enzima u kristalnoj formi [199].

Tripsin se smatra prototipom serinskih endopeptidaza porodice S1, jer je fundamentalno razumevanje ove porodice izvedeno na osnovu proučavanja ovog enzima [200]. Polipeptidni lanac sastoji se od 223 aminokiselinska ostatka i sadrži šest disulfidnih mostova. Dominantne sekundarne strukture čine antiparalelne  $\beta$ -pločice i  $\alpha$ -heliks pri čemu razlikujemo dva domena sa sličnim strukturama (*Slika 2.10.*) [201].

Tripsin snažno preferira hidrolizu amidnih supstrata nakon P1 argininskih ili lizinskih ostataka. Preferentnost ka Arg u odnosu na Lis je 2 do 10 puta veća za različite peptidne supstrate [202]. Međutim, diskriminacija između Arg i Lis za estarske supstrate je niža jer reaktivnost estarske veze smanjuje selektivnost enzima. Sekundarna mesta vezivanja na obe strane raskidajuće peptidne veze igraju sporednu ulogu u određivanju specifičnosti prema supstratima, iako zauzetost ovih mesta doprinosi katalitičkoj efikasnosti [203], [204]. Specifični identiteti aminokiselina koje zauzimaju pozicije P2 do P4 ne povećavaju aktivnost ili specifičnost tripsina. Međutim, biblioteke tetrapeptidnih supstrata [205] ilustruju da određene aminokiseline mogu inhibirati aktivnost, pri čemu Arg, Ile, Leu, Lis ili Phe na P2 smanjuju aktivnost 2 do 16 puta, dok Pro na poziciji P3 smanjuje aktivnost 3 do 9 puta. Ostatak koji zauzima poziciju P4 ne utiče na aktivnost [206]. U malim sintetičkim supstratima, formiranje intermedijera acil-enzima je obično korak koji određuje brzinu raskidanja amidnih veza tripsinom, dok je hidroliza ovog intermedijera korak koji određuje brzinu za hidrolize estera. Brzina acilovanja sa supstratom je glavna determinanta specifičnosti [207], i jedan je od razloga za širu supstratnu specifičnost tripsina prema estarskim supstratima u poređenju sa peptidima. Za proteinske supstrate, vezivanje supstrata može biti korak koji ograničava brzinu. Tipični supstrati za kolorimetrijske eseje uključuju Bz-Arg-OEt, Tos-Arg-OMe, Bz-Arg-pNA i Suc-Ala-Ala-pNA [208].

Vrednosti molekulske mase tripsina su približno 25 kDa, dok vrednosti pI mogu varirati u zavisnosti od prisustva katjonske i anjonske forme. Optimalan pH tripsina je približno 8, iako se neznatno razlikuje zavisno od vrste tripsina. Reakcioni pufer zahteva umerene količine (20 mM) kalcijuma ( $\text{CaCl}_2$ ) za maksimalnu aktivnost i stabilnost peptidaze [203]. Tripsin je stabilan u obliku liofilizovanog praha ili u rastvoru na pH 3 pri kojoj uglavnom neaktivan [8] i postoje indikacije da može biti reverzibilno denaturisan ureom [208].

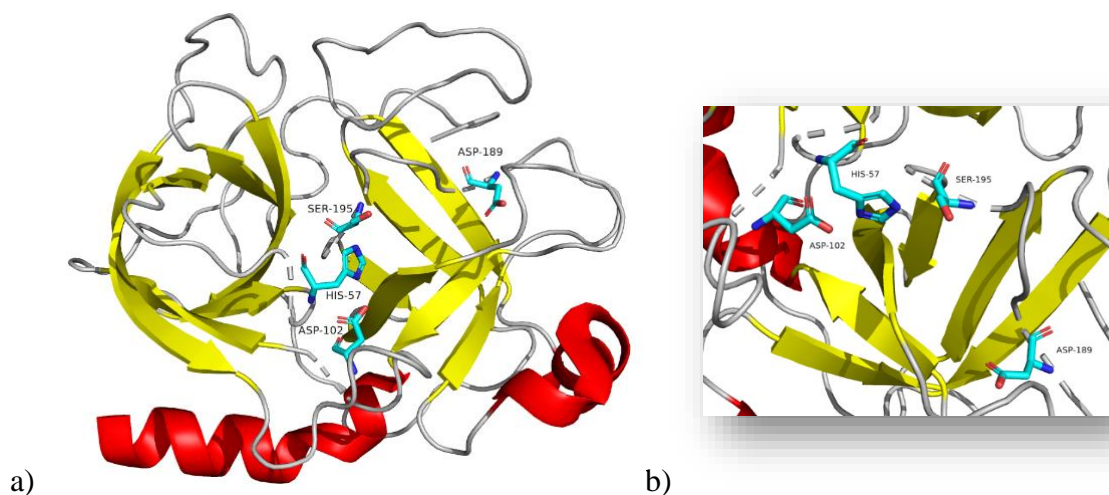
Tripsin i njegov zimogeni oblik, tripsinogen, ne sadrže post-translacione modifikacije osim peptidolitičke obrade zimogena prilikom aktiviranja peptidaza. Propeptid sisara (obično heksapeptid) sadrži sekvencu za hidrolizu enteropeptidazom ili samim aktivnim tripsinom kojom se izazivaju konformacione promene i omogućava aktivacija enzima [209], [210].

Mnogi opšti serin-peptidazni inhibitori kao što su fenilmetansulfonil fluorid (PMSF), diizopropil fluorofosfonat (DFP) i dihloroizokumarin (DCC) inhibiraju tripsin. Drugi inhibitori proteina uključuju ekotin, inhibitor tripsina iz soje, aprotinin,  $\alpha$ 2-makroglobulin i inhibitor  $\alpha$ 1-proteinaze.

Trodimenzionalnu strukturu goveđeg tripsina odredile su 1974. godine nezavisno dve grupe [211], [212] i ova struktura predstavlja prototip strukture za S1 porodicu peptidaza. Strukturne analize eukariotskih i prokariotskih članova ove porodice otkrile su zajedničku trodimenzionalnu strukturu

[209], [213]. Tercijarna struktura enzima izuzetno je očuvana, iako primarna struktura može značajno da varira. Himotripsin poseduje gotovo identičnu tercijarnu strukturu, ali je manje od 50% identičan u primarnoj strukturi i razlikuju se po specifičnosti prema supstratima. Položaji ključnih aminokiselinskih ostataka katalitičke trijade Asp/His/Ser (*Slika 2.10.*) su identični u ove dve peptidaze. Aktivni tripsin se sastoji od jednog polipeptidnog lanca, u kom su katalitički ostaci premošćeni sa dve  $\beta$ -pločice. Ser-195 deluje kao nukleofil u reakciji hidrolize, proizvodeći acilovani intermedijer, His-57 deluje kao opšta baza [214], [215], a Asp-102 stabilizuje His-57 i neutrališe pozitivno naelektrisanje tokom katalitičke reakcije. Zamena asparaginske kiseline sa Asn dovodi do 104 puta manje aktivnosti enzima [216], dok premeštanje Asp-102 na poziciju 214 daje peptidazu koja zadržava približno 0,5% aktivnosti prema peptidnim supstratima. Zamena His-57 ili Ser-195 sa Ala dovodi do 105 puta manje aktivnosti [217] pri čemu je rezidualna aktivnost posledica strukturnih karakteristika stabilizacije tetraedarskog intermedijera. Naime, peptidni supstrati formiraju antiparalelnu  $\beta$ -pločicu vezivanjem za tripsin. Specifičnost prema supstratu je prvenstveno određena bočnim lancem Asp-189, koji se nalazi na dnu S1 džepa za vezivanje. Zamena ovog ostatka sa Ser dovodi do smanjenja vezivanja supstrata koji poseduju Arg/Lis [218], [219] što ukazuje da je ovaj aminokiselinski ostatak kritičan za prepoznavanje i pravilno pozicioniranje supstrata.

Ostale strukturne karakteristike tripsina uključuju visokoafinitetno mesto za vezivanje kalcijuma, koje je doprinosi stabilnosti enzima i predstavlja zaštitu od autolize [220]. Supresija autoproteolitičke aktivnosti tripsina postiže se modifikacijom lizinskih ostataka tripsina reduktivnim metilovanjem, usporavajući autoproteolizu do 70% [221].



**Slika 2.10.** Tripsin (a) i aktivno mesto tripsina (b). Svetlo plavo – R - ostaci katalitičke trijade, model loptica-štapčić Asp-102, His-57, Ser-195, Asp189 u hidrofobnom džepu, crveno –  $\alpha$ -heliksi, žuto –  $\beta$ -pločice. PDB struktura 1AZ8 je adaptirana korišćenjem PiMOL-a.

### 2.3.2. Papain

Papain (EC 3.4.2.2) je endolitički biljni cistein-peptidazni enzim izolovan iz lateksa papaje (*Carica Papaya L.*) koji se prikuplja zasecanjem kože nezrele papaje. Pripada papainskoj superfamilji, odnosno familiji C1, klanu cistein-peptidaza CA. Papain pokazuje opštu proteolitičku aktivnosti prema proteinima, kratkim peptidima, esterima aminokiselina i amidnim vezama. Preferencijalno lizira peptidne veze koje uključuju aminokiseline arginin, lizin i aminokiselinske ostatke nakon fenilalanina [222].

Globularni protein papain je jednolančani protein sa molekulskom masom od 23406 Da i sastoji se od 212 aminokiselina sa četiri disulfidna mosta i katalitički važnim amino-kiselinskim ostacima u položajima Gln19, Cys25, His158 i His159 [223]–[225]. Papain je cistein hidrolaza stabilna i aktivna u širokom spektru uslova. Stabilan je na povišenim temperaturama [226] i otporan na visoke koncentracije denaturišućih sredstava, kao što su urea (do 8 M) ili organski rastvarači (do 70% EtOH). Optimalan pH za aktivnost papain je u opsegu od 3.0-9.0 [227], [228].

Sastoji se od dva dobro definisana domena (*Slika 2.11.*) i predstavlja odličan model sistem za studije konformacionih svojstava proteina [227]. Stabilizovan je sa tri disulfidna mosta koji pružaju potporu za interakcije bočnih ostataka doprinoseći stabilnosti enzima [225], [227]. Njegova trodimenzionalna struktura sastoji se od dva različita strukturna domena sa pukotinom koja sadrži aktivno mesto sa katalitičkom dijadom sačinjenom od cisteina-25 i histidina-159. Iako se smatralo da aspartat-158 igra ulogu analognu ulozi aspartata u katalitičkoj trijadi serin-peptidaze, ova tvrdnja je opovrgnuta [222]. Molekul papaina poseduje nestabilniji  $\alpha$ -helikoidni N-terminalni domen koji u prisustvu manjih koncentracija denaturanata zauzima stanje stopljene globule, dok u C-terminalnom domenu preovladava antiparalelna  $\beta$ -pločica [229], [230].

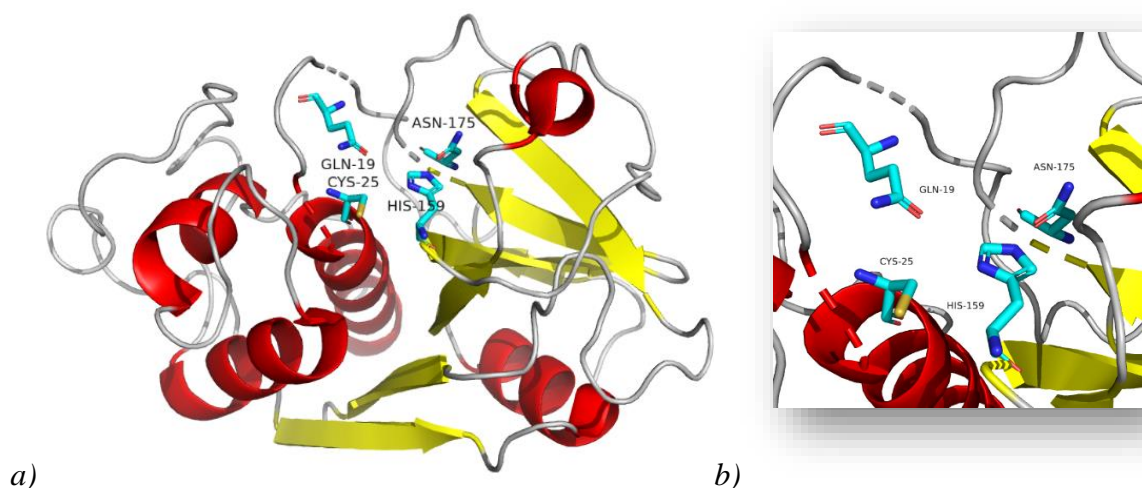
Istraživanja u cilju razumevanja specifičnosti strukturnih efekata inhibitora, niskog pH i prisustva metalnih jona na konformaciju papaina su od velike važnosti [231], [232]. Konformaciono ponašanje papaina u vodenom rastvoru u jonskog detergenta prisustvu natrijum dodecil-sulfata SDS-a (od engleskog *sodium dodecyl sulfate*) pokazuje visok sadržaj  $\alpha$ -helikoidalnih razvijenih struktura zbog snažnih elektrostatičkih interakcija [231]. U intermedijernom stanju na pH 2.0, papain iskazuje sekundarne strukture  $\beta$ -pločice pri čemu je stepen denaturacije niži u poređenju sa onim koji je izložen visokim koncentracijama gvanidijum hlorida (6 M) i načelno pokazuje veliku tendenciju ka agregaciji pri visokim koncentracijama soli [227]. Hidrofobne interakcije imaju glavni uticaj na konformaciju proteina i najzastupljenije aminokiseline sa hidrofobnim ostacima su alanin, valin, leucin, metionin i izoleucin. Formiranja intermedijernih stanja papaina indukovano različitim koncentracijama denaturanata ukazuje da dolazi do diferencijalnog rasplivanja domena i da hidrofobne interakcije igraju važnu ulogu u stvaranju dva različita termodinamička intermedijera [233]. Katalitička aktivnost papaina pokazuje široku hidrolaznu specifičnost, preferentno ka velikim hidrofobnim ostacima na položaju P2 polipeptidnog lanca, osim ukoliko se na položaju P1 nalazi valin [229]. Stabilan je u organskim rastvaračima, otporan na nizak sadržaj vode i katalizuje reakcije u organskim rastvaračima sa promenjenom specifičnošću u odnosu na vodene rastvore [234]. Papain je blago otporan na denaturaciju na povišenim temperaturama do  $79 \pm 2$  °C, pri čemu u prisustvu SDS primarno dolazi do razvijanja N-terminalnog domena bogatog  $\alpha$ -helikoidnim strukturama. Kod termalne denaturacije bez detergenata, pokazano je da je razvijeni N-terminalni domen podložan naknadnom formiranju  $\beta$ -pločica koje su specifičan indikator agregacije proteina [235]. Otpornosti na denaturaciju SDS-om papaina zasniva se na podložnosti vezivanju SDS, tokom prelaza između različitih konformacija pri čemu je papain kinetički stabilan sa niskom strukturnom fleksibilnošću. Samim tim, prozor za narušavanje strukture se otvara samo pri povišenim temperaturama [236].

Mehanizam funkcije papaina zasniva se na cisteinu-25 koji u aktivnom mestu nukleofilno interaguje sa karbonilim ugljenikom peptidnog lanca oslobađajući amino-terminalni deo, potpomognut deprotonovanjem histidinom-159, formirajući tiolat-imidazolinijumski par, dok asparagin-175



pomaže u orijentisanju imidazolnog prstena histidina-159 omogućavajući deprotonovanje [222], [225]. Papain se može efikasno inhibirati jodoacetamidom (IAA) formiranjem stabilne veze u aktivnom mestu sa Cis25 [237].

Papain se koristi u industriji hrane za omekšavanje mesa, delujući na miofibrilarne proteine i proteine vezivnog tkiva [238]. Takođe se koristi u procesima bistrenja u prehrambenoj industriji [239], za poboljšanje meltabilnosti i rastegljivosti sira [240]. Papain se koristi kao sredstvo za disociaciju, bez štetnog uticaja na zdravo tkivo zbog specifičnosti enzima. Naime, deluje samo na tkiva kojima nedostaje  $\alpha$ 1-antitripsinska plazmatična antipeptidaza koja inhibira proteolizu u zdravim tkivima [241].



**Slika 2.11. (a) Papain i (b) aktivno mesto papaina. Katalitički ostaci su prikazani svetlo plavom bojom, modelom loptica-štapić Cis-25, His-159 i Asn-175. Crveno –  $\alpha$ -heliksi, žuto –  $\beta$ -pločice. PDB struktura 1PE6 je adaptirana korišćenjem PiMOL-a.**

### 2.3.3. Peptidaze lateksa smokve

Mlečni lateks iz rezova stabljike, listova i nezrelog ploda biljaka iz roda *Ficus*, porodice *Moraceae*, sadrži peptidaznu aktivnost. Postoji više od 1300 vrsta fikusa, od kojih mnoge sadrže lateks sa peptidaznom aktivnošću [242], ponekad zbog prisustva više od jedne peptidaze [243]. Peptidaze mogu poticati iz različitih delova biljaka, uključujući plodove, stabljike, semenke i laticice [244], i igraju ključne uloge u biljkama kao što su degradacija skladišnih proteina pri klijanju semenki [245], aktivacija proenzima i degradacija defektnih proteina [246].

Ovo poglavlje ograničeno je na raspravu o glavnim peptidaznim komponentama lateksa sredozemne smokve (*Ficus carica*).

Peptidaze lateksa smokve se od većine ostalih komponenti sirovog lateksa smokve mogu odvojiti vrlo jednostavnim odmaščivanjem hidrofobnih primesa nepolarnim organskim rastvaračima kao što su heksan ili petroleter [247]. Ovim se odvajaju komponente primarne zaštite biljke, hidrofobna terpenoidna, taninska, sterolska, alkaloidna, lipidna i druga jedinjenja, od smeše hidrofilnih enzima [248]. Dobijeni „sirovi“ ekstrakt pored peptidazne aktivnosti široke specifičnosti koja se prvenstveno pripisuje ficinu, cistein peptidazi sa širokom specifičnošću prema supstratima [249], [250], sadrži serin peptidaze sa želatinaznom i kolagenaznom aktivnošću [247]. Kombinovane, dostupnost lateksa smokava i jednostavna ekstrakcija smeše enzima, sa širokim spektrom supstrane specifičnosti, omogućavaju proizvodnju ovog preparata u velikim količinama i impliciraju važnost daljeg istraživanja potencijalnih biomedicinskih i biotehnoloških primena.

Dominantne peptidaze lateksa smokve (*Ficus carica* var. *Brown Turkey*) ficini, prečišćeni beli prah sa antihelmintičkom aktivnošću, svoj naziv duguju *Robbins*-u [251] koji ih je prvi prečistio i opisao. Kristalni preparat neimenovane vrste koji je pripremio *Walti* [252] takođe je nazvao ficin. Okarakterisani su kao mešavina cisteinskih peptidaza funkcionalno povezanih sa papainom. Međutim, iako podaci sugerišu da je ficin „sličan papainu“ u smislu svoje specifičnosti, hidroliza oksidovanog B lanca insulina ilustrovala neke razlike. Papain je u značajnoj meri hidrolizovao deset veza [253], a ficin šest [254], od kojih su samo tri bile među onima koje je papain hidrolizovao. Gly, Ser, Glu, Tir i Phe su bili smešteni u S1 džepu ficina, a lokacija S2, koja se generalno smatra primarnom determinantom specifičnosti u enzimima sličnim papainu, interaguje sa Cis, Val, Leu, Gli i Phe, što sugeriše da ficini imaju određenu specifičnost za hidrofobne aminokiselinske ostatke u ovom džepu. Aminokiselinske sekvence oko aktivnog mesta Cis i His ostataka [255] ukazuju na veliku sličnost sa onima oko ekvivalentnih ostataka u papainu i zajedno sa sličnom inhibicijom ficina i papaina pilećim cistatinom [256], [257], sugerišu da su ficini članovi porodice C1.

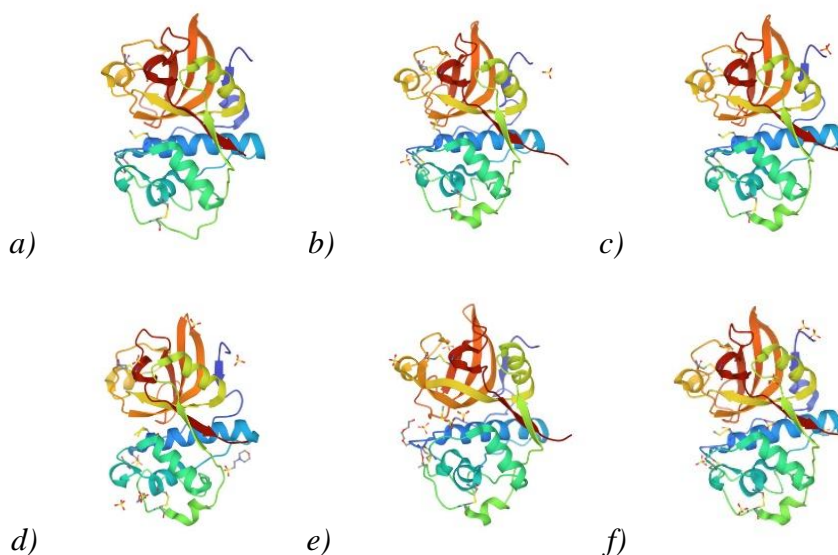
Strukturne informacije o ficinima su ograničene i predmet su aktuelnih istraživanja. Ficin je izolovan iz komercijalnih preparata frakcionisanjem solima i hromatografijom na karboksimetil celulozi. Iako je predloženo postojanje nekoliko izoformi ficina, okarakterisana je samo glavna komponenta. Utvrđeno je da je korišćenjem ove peptidaze veliki broj peptidnih veza hidrolizovan, i peptidne veze nakon aromatičnog ostatka hidrolizovane su efikasnije od ostalih. Odnosno, ova izoforma ima specifičnost prema aromatičnim ostacima, ali je prilično nespecifičan [254]. Izoforme ficina sa različitom peptidaznom specifičnošću prisutne su u različitom odnosu tokom zrenja plodova, a do danas su kristalizovane četiri peptidaze (A, B, C i D) (*Slika 2.12.*) i njihove strukture su dostupne [247], [249], [258]. Njihova analiza ukazuje da sve četiri izoforme poseduju glikozidne post-translacione modifikacije, i da imaju veliku sličnost sekvence sa bromelainom [249]. Ficini izolovani iz lateksa različitih stabala fikusa poseduju određena karakteristična svojstva. Ficin izolovan iz lateksa *Ficus racemosa*, pokazuje širu specifičnost, širi opseg optimalnog pH i povišenu termičku stabilnost, što ukazuje da se ova peptidaza razlikuje od drugih poznatih ficina dobijenih iz *F. glabrata* i *F. carica*. Tačan odnos različitih aktivnih komponenti lateksa smokve je promenljiv u zavisnosti od zdravlja stabla, uslova okoline, zalivanja itd. [258], [259], pri čemu se koncentracija proteina tokom zrenja voća u lateksu ravnomerno povećava, dok se sadržaj ficinskih peptidaza smanjuje [247].

Kulture ćelija *Ficus carica* mogu se koristiti za proizvodnju ficina. Ove kulture su pokazale optimalnu aktivnost u odnosu na benzoilarginin-*p*-nitroanilid (BAPNA) nakon 28 dana [260].

Maksimalna aktivnost ficina se postiže u pH opsegu od 5-8 i temperaturnom opsegu od 45-55°C. Slično drugim cisteinskim peptidazama, ficin zahteva cistein ili druge redukcijske agense za aktivaciju. Dok su optimalni pH uslovi u kontekstu hidrolitičke aktivnosti u regionu pH 7, optimalan pH zavisi od koncentracija supstrata. Poluživot ficina na 60°C je 1,5 h [250]. Enzim se nepovratno inaktivira oksidacionim agensima i jodoacetatom, dvovalentnim metalima [261]. Izoforme ficina pokazuju slično ponašanje pri denaturaciji ureom i postojanje intermedijera pri kiselim pH vrednostima, analogno papainu sa kojim dele generalne strukturne karakteristike [262]. Postepeno razvijanje smeše izoformi ficina potvrđuje hipotezu da raznolikost sekvenci obezbeđuje stabilizaciju. Kako sve izoforme doprinose svojstvima lateksa, ekspresija više izoformi u nezrelim smokvama je odgovorna za široku supstratnu specifičnost i veću stabilnost, pružajući bolju zaštitu u periodu zrenja [247].

U cilju ispitivanja peptidaznih sposobnosti, uspešno je ekstrahovan kolagen iz tetiva goveda nakon prethodnog tretmana ficinom, pri čemu je za postizanje optimalnih rezultata niska količina ficina [263]. Komparativna aktivnost peptidaza za omekšavanje i disocijaciju tkiva ukazuje da je bromelain (0,29 mg/122,5 mg proteina mesa) aktivniji ka proteinima kolagena i manje aktivan prema miofibrilarnim proteinima od papaina (0,19 mg/122,5 mg proteina) ili ficina (0,09 mg/122,5 mg proteina) i efikasan u poboljšanju tekstilne mekoće mesa [264], [265]. Takođe je predloženo da su efikasnost komercijalne kolagenaze (0,2 mg/ml), bromelaina (0,2 mg/ml), ficina (0,06 mg/ml) i papaina (1,0 mg/ml) na solubilizacije kolagena u sledećem redosledu: kolagenaza > ficin > bromelain > papain, dok je aktivnost ka miofibrilarnim proteinima: bromelain > ficin > papain > kolagenaza [266]. Međutim, nedavno je pokazano da hidroliza kolagena papainom (9 ppm), bromelainom (14,5 ppm) i ficinom (9 ppm) ima trend papain > ficin > bromelain. Jasno je da nema saglasnosti i teško je predložiti bilo kakve opšte trendove jer se koncentracije razlikuju među studijama. Važno je imati na umu da će efektivna koncentracija peptidaze zavisiti od sečenja mesa, temperature skladištenja i upotrebe drugih procesa za obradu.

Kolagenolitičke osobine ekstrakta lateksa smokve mogu poticati i od nedavno opisane kisele serin peptidaze, proteina od 45 kDa, i pI vrednosti 5,5 [261].



**Slika 2.12. Kristalne strukture ficina sa njihovim PDB kodovima: A (a) 4YYQ, B-I (b) 4YYR, B-II (c) 4YYS, C-I (d) 4YYU, C-II (e) 4YYV, D (f) 4YYW.**

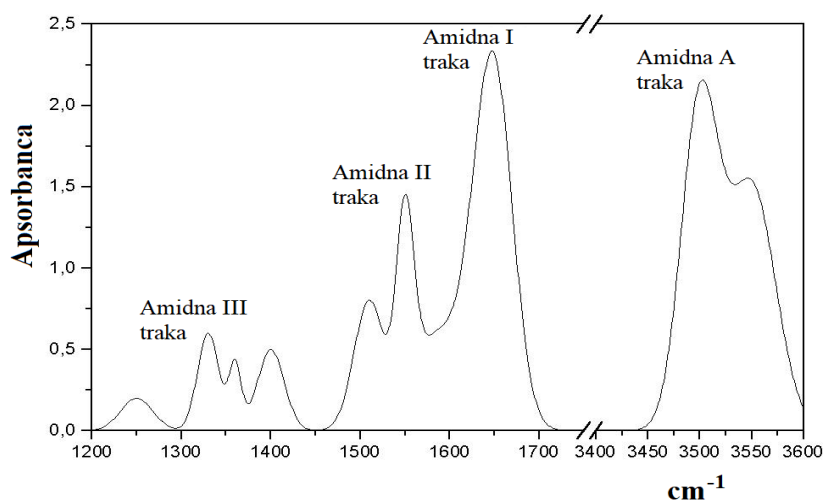
## 2.4. Spektroskopske tehnike za praćenje konformacije proteina

### 2.4.1. Infracrvena spektroskopija sa *Fourier*-ovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija je jedna od klasičnih metoda za određivanje strukture malih molekula zbog svoje osjetljivosti na hemijski sastav i arhitekturu molekula. Ovo čini infracrvenu spektroskopiju vrednim alatom za istraživanje strukture proteina, molekulskih mehanizma procesa uvijanja proteina, denaturacije i određivanja stabilnih intermedijernih stanja uvijanja proteina [267]–[272]. Prednosti infracrvene spektroskopije su veliki opseg primene (od malih rastvorljivih proteina do velikih membranskih proteina), visoka rezolucija, često kratko vreme merenja i mala potrebna količina uzorka.

Infracrveni spektrometri obično sadrže *Fourier*-ovu transformaciju gde se signali detektora rekombinuju i dolazi do konstruktivne ili destruktivne interferencije, a zatim se matematičkom operacijom koju izvodi računar, signal konvertuje u spektar. Tehnika FTIR spektroskopije zahteva male količine proteina i može se snimati u različitim okruženjima. Stoga, spektar visokog kvaliteta se može dobiti relativno lako bez problema osnovnog šuma, fluorescencije, rasejavanja svetlosti i problemima sa veličinom proteina. Apsorpcija vode može biti matematički oduzeta. Takođe, dostupne su i metode kojima se mogu odvojiti druge komponente smeše sa kojima apsorpcija u spektru proteina preklapa. Ove činjenice su omogućile da praktični biološki sistemi mogu biti predmet proučavanja pomoću FTIR spektroskopije.

Peptidna grupa daje do 9 karakterističnih traka, koje se nazivaju amidna A, B, I – VI traka ili region. Amidna A traka je sa više od 95% posledica istežajućih vibracija N-H veza. Ove vibracije ne zavise od polipeptidne kičme, ali su veoma osetljive na jačinu vodonične veze (između 3225 i 3280  $\text{cm}^{-1}$ ). Amidna I traka ima najintenzivniju apsorpciju u infracrvenim spektrima proteina. Primarno je izazvana istežajućim vibracijama C=O (70-85%) i C-N veze (10-20%). Njena frekvencija može se naći u rasponu od 1600 i 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Tačan položaj trake određen je konformacijom polipeptidne kičme i vodoničnog vezivanja. Amidna II traka se može naći u oblasti 1510 i 1580  $\text{cm}^{-1}$  i mnogo je složenija od amidne I trake. Potiče od savijajućih vibracija N-H veze (40-60%). Ostatak proizilazi iz vibracija istežanja C-N (18-40%) i C-C veza (oko 10%). Amidne III - V su veoma složene trake i zavise od detalja kao što su polja sile, priroda bočnih lanaca i vodoničnih veza. Zato su ove trake nisu upotrebljive u kontekstu procene promena sekundarnih struktura.



**Slika 2.13. Karakteristične trake IC spektra proteina. Preuzeto i prilagođeno iz Jena biblioteke [273]**

Pored klasičnih transmisionih metoda, tehnika prigušene totalne refleksije (od engleskog *attenuated total reflectance*, ATR) [274], [275] je izuzetno korisna za praćenje konformacije proteina. Ukratko, snop infracrvenog svetla prolazi kroz ATR kristal na takav način da se odbija od površine koja je u kontaktu sa uzorkom i posredstvom penetracionog talasa sa njim interferira i vraća se ka detektoru. Za uzorke proteina, obično se proteinski film priprema na površini kristala, često jednostavnim sušenjem u struji inertnog gasa. Prednost metode je u tome što se signali koji potiču od pufera i aditiva mogu ukloniti u toku matematičke obrade signala. Ovo čini manipulacije uzorcima relativno jednostavnim i čini metod veoma fleksibilnim.

#### 2.4.2. Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentna spektroskopija je veoma osetljiva metoda za karakterizaciju konformacionih prelaza proteina merenjem intenziteta emisije fluorescencije u funkciji denaturanta (temperatura, pH, aditivi i td.) i proteina. Tirozin (Tyr) i triptofan (Trp), imaju intrinzična svojstva fluorescencije sa kvantnim doprinosima dovoljno visokim za kvantitativne fluorescentne signale, s tom razlikom da se apsorpcioni i emisijski spektar Tyr donekle preklapaju. Pobuđuju se na talasnim dužinama od 280 nm, dok se Trp može pobuditi i talasnom dužinom od 295 nm. Aromatičnog karaktera, Trp i Tyr ostaci se najčešće nalaze u potpunosti ili delimično u hidrofobnom jezgru proteina, na dodiru dva proteinska domena ili podjedinica oligomernih proteina. Narušavanjem sekundarne, tercijarne ili kvaternarne strukture proteina, ovi bočni lanci postaju izloženi hidrofobnom okruženju rastvarača zajedno sa inflacijom kvantnih prinosa, što dovodi do promene intenziteta fluorescencije. U različitim konformacionim stanjima proteina (u rasponu između nativno uvijenog i razvijenog stanja) u zavisnosti od intenziteta denaturacije zavisi i globalni signal fluorescencije. Iz ovako dobijenog profila mogu se otkriti i karakterisati stabilna intermedijerna stanja i globalno uvijanje proteina [276]–[278]. Intrinzična fluorescencija triptofana se može koristiti za procenu interakcije proteina sa denurantima, surfaktantima ili drugim amfifilnim molekulima [279]. Fosforescencija triptofana se može koristiti i za određivanje konformacionih promena proteina u uslovima denaturacije na niskim temperaturama [148].

Aromatična hromofora 1-anilino-8-naftalen sulfonat (ANS) iako slabo fluorescentna u vodi, promenom intenziteta i položaja spektra vezivanjem za hidrofobne delove proteina može ukazati ne samo na promenu konformacije proteina [280], već i na postojanje stabilnih intermedijernih stanja [42]. Snažno vezivanje ANS-a u stanjima stopljenih globula proteina dovodi se u vezu sa većom izloženošću hidrofobnih ostataka molekulima vode u poređenju sa nativnim proteinom, i koristi se kao metoda izbora za karakterizaciju intermedijernih stanja u denaturaciji proteina [40], [280]–[282].

## 2.5. Problem detekcije *Listeria monocytogenes* u fermentisanim mesnim proizvodima

Bakterija *Listeria monocytogenes* je intracelularni patogen sa sposobnošću da kontaminira sirovu ili prerađenu hranu. Mikroskopska analiza kultura *L. monocytogenes* ukazale su na njihov štapičasti oblik i tendenciju formiranja kratkih lanaca. U razmazu, kulture *L. monocytogenes* se pojavljuju u kokoidnom obliku koji se ponekad može identifikovati kao streptokoke [283].

Predstavnici ove vrste mogu da kontaminiraju mleko i mlečne proizvode, posledično izazivajući listeriozu kod konzumenata. Druge namirnice povezane sa listeriozom [284], uključuju salatu od kupusa, sladoled i proizvode od mesa. Pošto je *L. monocytogenes* fakultativni anaerob, može da raste u anaerobnim uslovima sa izmenjenim metabolizmom ugljenih hidrata [285]. Fermentisani proizvodi od mesa smatraju se pogodnim okruženjem za rast i uspešnu reprodukciju *L. monocytogenes* zbog njihove pH vrednosti, sadržaja proteina i lipida i zbog nedostatka termičke obrade tokom procesa proizvodnje. Konzumacija hrane kontaminirane sa *L. monocytogenes* dovodi do listerioze, čak i u niskim dozama ( $10^2 - 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> ili mL<sup>-1</sup>). Listerioza je ozbiljna infekcija, posebno za ranjive grupe kao što su osobe sa oslabljenim imunitetom, trudnice, novorođenčad i odrasli stariji od 65 godina [286]–[288].

Adhezija biofilma *L. monocytogenes* na površinama koje se koriste u proizvodnji hrane predstavlja problem u prehrambenoj industriji i prouzrokuje kontaminaciju prehrambenih proizvoda. Različite studije o formiranju biofilma *L. monocytogenes* su pokazale da ovaj biofilm ima kapacitet da opstane u životnoj sredini nekoliko godina, a samim tim i opstanak patogena može biti povezan sa formiranjem biofilma jer su ćelije formirane unutar biofilma otpornije na različita sredstva za čišćenje i stresne uslove povezane sa prehrambenom industrijom [284].

Prisustvo *L. monocytogenes* u proizvodima mesa dovodi do povlačenja proizvoda sa tržišta, stvarajući značajno ekonomsko opterećenje za proizvođače. Odgovarajuća metodologija ne samo za kvalitativno otkrivanje već i kvantifikaciju (prebrojavanje) *L. monocytogenes* u fermentisanim proizvodima od mesa je od presudnog značaja. Kako su fermentisani proizvodi od mesa obično kontaminirani vrlo niskom koncentracijom patogena, manjom od  $10^2$  CFU g<sup>-1</sup>, tehnike koncentrovanja i prebrojavanja *L. monocytogenes*, direktnim brojanjem na pločama (ISO ENO 11290-1&2) su i dalje najčešće korišćena metoda [289]. Preciznost metode direktnog brojanja na pločama je relativno niska u slučajevima niskog nivoa kontaminacije. U nekim slučajevima ćelije *L. monocytogenes* prodiru u dublje slojeve proizvoda i zahtevaju intenzivniju homogenizaciju proizvoda, a upotreba proteolitičkih enzima za hidrolizu proteina u fermentisanim proizvodima od mesa može dovesti do povećanja oslobađanja *L. monocytogenes* koji su integrisani u dublje slojeve proizvoda i povećanja osetljivosti testa.

Efikasnost različitih fizičkih i fizičko-hemijskih metoda za oslobađanje mikroorganizama iz proizvoda od mesa i razvijanje jednostavne metode može biti postignuto tretmanom koji podrazumeva korišćenje kombinacije detergenata i enzima pre detekcije samog patogena. Serin peptidaze uske supstratne specifičnosti, kao što je tripsin, su korišćene u ove svrhe [10], [11], u visokim koncentracijama što dovodi do nekoherentnih rezultata. Takođe, istraživanja sugerišu da se mogu koristiti i cistein peptidaze, na primer papain, [290]–[292] imajući u vidu dostupnost papaina i njegovu široku upotrebnu raširenost u laboratorijskim i industrijskim okvirima, kao što su mekšanje mesa [293], disocijacija ćelija i tkiva i kao sredstvo za uklanjanje nečistoća [294], kao komponenta u kozmetici [295] i detergentima [296].

Nejonski surfaktanti se široko primenjuju u industriji prerade hrane za uklanjanje i sprečavanje rasta *L. monocytogenes* i sprečavanje formiranja biofilma mnogih bakterijskih vrsta, bio-razgradivi su, nisko toksični i isplativi [297]. Njihova emulzifikujuća svojstva u niskim koncentracijama ispod

kritične koncentracije za formiranje micela, takođe mogu sinergistički pospešiti efikasnost enzimске aktivnosti pri samoj homogenizaciji uzoraka i konsekventno pospešiti enumeraciju odnosno detekciju *L. monocytogenes*.

**Tabela 2.2. Pregled prethodnih upotreba kombinacija enzima i nejonskih surfaktanata opisanih u literaturi.**

Enzimi	(konc.)	Nejonski surfaktanti	(konc.)	Lit.
Tripsin	1.5 U/ug			
FoodPro (alkalna peptidaza)	0.6 U/ug	Tween 20	0,5%	[298]
Tripsin	0.25%	Tween 80	1,0%	[299]
Papain (EZ-enzyme; QA Life)	na	na	na	[291]
Kolagenaza	0,05 mg/mL	Tween 20, 40, 60, 80, Nonidet Triton X-100, 114, 405 Tergitol	0,05% - 2,5%	[11]
Tripsin	0,05 %			
Tripsin	2,0%		1,0%	
Papain	2,0%	Tween 80		[292]
Tripsin	20,0 %	Triton X-100	0,1%, 0,5%	[300]
Papain	na			
Bromelain	na	Tween 80 Triton WR-1339		[301]
Tripsin	na			

### 3. CILJEVI

Uslovi formulacije peptidaznih enzima s obzirom na sastav i koncentraciju kosmotropa u puferima, kao i prisustvo nejonskih surfaktanta su od primarne važnosti za očuvanje aktivnosti enzima na niskim temperaturama na kojima se formulacije skladište i/ili se izvode enzimske reakcije. Ispitivanje stabilnost primarnih struktura peptidaza i strukturnih promena nastalih usled destabilizacije native strukture enzima na niskim temperaturama su glavni cilj ove studije. Kvantifikacija katalitičke aktivnosti enzima tokom ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja sa posebnim akcentom na identifikaciju i karakterizaciju stabilnih intermedijera razvijanja proteina (stopljenih globula) može pružiti uvid u povezanost održanja katalitičke aktivnosti odabranih enzima sa njihovim konformacionim promenama.

Specifičnosti enzimskih formulacija prema prirodnim supstratima i mogućnosti korišćenja dobijenih preparata za povećanje osetljivosti detekcije i kvantifikacije mikroaerobnih patogenih bakterija pospešivanjem razgradnje tkiva fermentisanih prehrambenih proizvoda je takođe ispitana.

#### **1. Optimizacija sastava puferskog sistema sa nejonskim surfaktantima za peptidazne enzime u cilju očuvanja njihove strukture i aktivnosti enzima tokom skladištenja i upotrebe enzima na niskim temperaturama.**

Jedan od glavnih aspekata ove studije je ispitivanje podobnosti nejonskih surfaktanata za zaštitu proteina na niskim temperaturama. Kao model protein biće korišćen tripsin u niskim koncentracijama da bi se izbegla samostabilizacija u visokim koncentracijama. Takođe, biće ispitan i efekat nejonskih surfaktanata (Tween 20, 80, Triton X-100) na zaštitu proteina tokom procesa zamrzavanja-odmrzavanja u sinergiji sa izabranim puferskim sistemima.

#### **2. Karakterizacija strukturnih promena enzima, sa posebnim osvrtom na strukturu i aktivnost stopljene globule.**

Metodama infracrvene spektroskopije sa *Fourijer*-ovom transformacijom i fluorescentne spektroskopije ispitaće se uticaj ponovljenih ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja na preostalu aktivnost tripsina kao i perturbacije u strukturnoj uređenosti tripsina u odabranim puferskim sistemima sa nejonskim surfaktantima.

#### **3. Optimizacija peptidaznih formulacija u pogledu katalitičke aktivnosti i supstratne specifičnosti prema prirodnim proteinima.**

Supstratna specifičnost papaina i kod smeše peptidaza lateksa smokve može ukazati na potencijalne kandidate koji mogu zameniti peptidaze uske specifičnosti u mnogim oblastima industrije i biomedicine. Kao metode će se osim infracrvene spektroskopije sa *Fourijer*-ovom transformacijom ka kolagenskim supstratima primenjivati i elektroforetske dvodimenzionalne i zimografske tehnike.

#### **4. Povećanje osetljivosti detekcije patogena *Listeria monocytogenes* u mikrobiološkim testovima fermentisanih prehrambenih proizvoda usled primene optimizovanih enzimskih formulacija.**

Mogući doprinos enzimskih formulacija za poboljšanje izolovanja i detektovanja mikroorganizma *Listeria monocytogenes* u fermentisanim mesnim proizvodima biće ispitan klasičnim direktnim mikrobiološkim tehnikama za detekciju patogena.

Imajući u vidu raznovrsnost proteina prisutnih u fermentisanim proizvodima od mesa, nastojaće se da se definiše tačna formulacija enzimskih preparata u pogledu specifičnosti supstrata, koncentracije i prisustva nejonskih surfaktanata kako bi se povećala osetljivost metoda detekcije i kvantifikacije mikroaerofilnih bakterija *Listeria monocytogenes* u fermentisanim proizvodima od mesa.



## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Reagensi i rastvori

#### 4.1.1. Reagensi

Svi reagensi korišćeni tokom eksperimenata su bili analitičke, LC/MS ili elektroforetske čistoće. Detalji su dati u *Tabeli 4.1.* Reagensi su korišćeni bez daljeg prečišćavanja.

**Tabela 4.1. Lista korišćenih reagenasa.**

Naziv	Skraćenica	Proizvođač	Čistoća
8-Anilinaftalen-1-sulfonska kiselina	ANS		Analitička
N-benzoil-L-arginin-p-nitroanilid	BAPNA		Analitička
Tripsin (pankreasna govečeta)			LC/MS
Albumin (seruma govečeta) (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> )	BSA		Analitička
Kolagen tipa I (ahilove tetive govečeta)		Sigma – Aldrich Štajnhajm, Nemačka	Analitička
Jodoacetamid	IAA		Analitička
Fenilmetaneulfonil fluorid	PMSF		Analitička
Etilendiamintetrasirćetna kiselina (dinatrijumova so)	EDTA		Analitička
L-cistein	Cys (C)		Analitička
Amonijum-bikarbonat	AmBic		LC/MS
Coomassie brilliant blue R-250	CBB R-250	Serva, Hajdelberg, Nemačka	Analitička
Coomassie brilliant blue G-250	CBB G-250		Analitička
Ampholine® Amfoliti (u opsegu pH 3,5 - 10)		GE Healthcare, Upsala, Švedska	Analitička
Nebojeni proteinski markeri		Thermo Scientific Rokford, USA	Analitička
Ekstrakt papaje		Eterra, Srbija	Elektroforetska
Tween 20	T20		Analitička
Tween 80	T80		Analitička
Triton X-100	TX100		Analitička
Želatin (iz goveđe kože)			Elektroforetska
Bujon M17		Merck, Darmstad, Nemačka	Elektroforetska
Palcam Listeria agarna podloga			Elektroforetska

#### 4.1.2. Puferski rastvori

Za proveru uticaja različitih jona na inaktivaciju tripsina tokom ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, tripsin je rastvoren u seriji od 100 mM fosfatni ili bikarbonatni puferi (amonijum-, kalijum- ili natrijum-) pH 8,0 do krajnje koncentracije od 1 mg/mL.

Za ispitivanje uticaja molarnosti pufera na stabilnost tripsina nakon zamrzavanja i odmrzavanja, pripremljeni su rastvori pufera natrijum-fosfata, kao i kalijum-fosfata i amonijum-bikarbonata u koncentracijama od 10, 50 i 100 mM, pH 8,0 pri čemu je konačna koncentracija tripsina za sve rastvore bila 1 mg/mL.

Za ekstrakciju papaina korišćen je pufer koji je sadržavao 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl kao i 1 mM EDTA. Isti pufer korišćen je i za eseje aktivnosti, ali bez NaCl i EDTA.

Sastav svih ostalih rastvora naveden je u okviru metoda u kojima su korišćeni radi bolje preglednosti.

#### 4.1.3. Nejonske površinski aktivne supstance

U cilju ispitivanja uticaja nejonskih surfaktanata na stabilnosti tripsina pri zamrzavanju i odmrzavanju, pripremljeni su 100 mM kalijum-fosfatni i 100 mM amonijum-bikarbonatni puferi pH 8,0 sa koncentracijom tripsina od 1 mg/mL. Triton X-100, Tween 80 ili Tween 20 su korišćeni kao nejonske površinski aktivne supstance u konačnoj koncentraciji od 0,1 % (w/v).

Stabilnost peptidaza kao i njihova primena u mikrobiološkim testovima određivana je u 100 mM kalijum-fosfatnim puferima sa dodatkom 0,1 – 1 % (w/v) Triton-a X-100, Tween-a 80 ili Tween-a 20 u koncentracijama proteina od 1 ili 5 mg/ml.

#### 4.1.4. Enzimski preparati

Tripsin iz pankreasa govečeta (Sigma – Aldrich, Štajnhajm, Nemačka) korišćen je bez prečišćavanja tako što je, prema uputstvu proizvođača, najpre rastvoren u 1 mM HCl pH 3,0 u koncentraciji do 100 mg/ml, a zatim takav rastvor korišćen je za dalji rad.

Papain je ekstrahovan iz komercijalnog liofilizovanog ekstrakta papaje (Eterra, Srbija) sa odnosom mase preparata i zapremine pufera za ekstrakciju papaina 1:10. Smeša je najpre inkubirana 45 min u ledenom kupatilu uz mešanje, a zatim je odvojen supernatant centrifugiranjem 20 min na 5000 x g na +4°C. Pigmenti, neaktivni proteini i peptidni fragmenti udaljeni su iz supernatanta jonoizmenjivačkom hromatografijom na katjonskom izmenjivaču SP-Sephadex (sa negativno naelektrisanim sulfopropil grupama) u *bulk*-u, pri čemu je za bubrenje matriksa korišćen pufer za ekstrakciju papaina prema uputstvima proizvođača. Nakon vezivanja i uklanjanja nevezanih proteina, papain je eluiran puferom sa povećanom jonskom silom (500 mM NaCl) bez EDTA u tri frakcije zapremine kolone. Frakcije su spojene, koncentrovane na 30 mg/mL i ovakav rastvor je korišćen za dalji rad. Koncentracija proteina je bila kvantifikovana *Bradford*-ovom metodom korišćenjem BSA kao standarda.

Lateks smokve koji sadrži peptidaze sakupljan je zasecanjem plodova i/ili listova smokve (*Ficus carica*) na privatnoj plantaži u Baru, Crna Gora, sredinom avgusta i čuvan na -20°C. Peptidaze lateksa smokve ekstrahovane su iz lateksa smokve u odnosu mase nativnog lateksa i zapremine pufera (100 mM Tris pH 8,0) 1:10 tokom 30 minuta na +4°C pri čemu je uklanjanje nepolarnog materijala izvršeno sa 2 zapremine heksana prema Rašković et al [261]. Ekstrakti su centrifugirani 15 minuta na 4 000 x g na +4°C i dobijeni bistri supernatanti korišćeni su za dalji rad ili skladišteni na -20°C do upotrebe. Koncentracija proteina u supernatanu podešena je razblaživanjem na 10 mg/mL. Koncentracija proteina je bila kvantifikovana *Bradford*-ovom metodom korišćenjem BSA kao standarda.

## 4.2. Analitičke metode

### 4.2.1. Određivanje koncentracije proteina *Bradford*-ovom metodom

Za određivanje mikrogramske koncentracije proteina korišćena je *Bradford*-ova ili *Coomassie brilliant blue* metoda koja se zasniva na vezivanju boje *Coomassie brilliant blue Green 250* (CBB G-250) za proteine i merenju apsorbanije na 590 nm i 450 nm. Ova metoda omogućava brzu i jednostavnu kvantifikaciju proteina radi normalizacije biohemijskih merenja do 50 ng albumina goveđeg seruma (BSA). Smetnje koje obično unose detergentski u velikoj meri su smanjene ovim protokolom [302].

Za dobijanje 5x koncentrovanog rastvora, 100 mg boje CBB G-250 se najpre potpuno rastvori u 50 mL 90 % etanola mešanjem na magnetnoj mešalici. Smeši se zatim dodaje 100 mL 85 % fosforne kiseline i rastvor razblažuje dejonizovanom vodom do 200 mL tako što se etanolno-fosforni rastvor dodaje u vodu uz mešanje u malim porcijama. Ovako pripremljeni koncentrovani (štok) rastvor, čuva se na +4°C u mraku, i stabilan je više meseci. Radni *Bradford*-ov reagens koji se koristi za merenje, dobija se tako što se koncentrovani rastvor boje razblaži 5x dejonizovanom vodom i procedi kroz filter papir nekoliko puta, pri čemu treba voditi računa da se ne dodiruje filter papir. Ovako dobijen reagens je tamno-crvene boje i stabilan je nekoliko nedelja na sobnoj temperaturi, ako se čuva u tamnoj boci.

Konstruisanje standardne prave se vrši pomoću standardnih rastvora BSA, počev od najkoncentrovanijeg rastvora, koji se priprema rastvaranjem 10 mg BSA u 5 mL vode uz vorteksiranje. Njegovim serijskim razblaživanjem, kao što je predloženo u *Tabeli 4.2.* dobijaju se standardni rastvori. Koncentracije i zapremine standardnih rastvora se mogu dodatno optimizovati prema zahtevima merenja.

U zavisnosti od koncentracije proteina u rastvoru razlikuju se dve metode. Makrometodom se može odrediti približna koncentracija proteina u rasponu od 125 – 2000 µg/mL, a mikrometodom u rasponu od 12,5 – 200,0 µg/mL. Za kreiranje standardne prave u bunare mikrotitracione pločice nanosi se najpre po 5 µL standardnih rastvora u triplikatima za makrometod, odnosno 20 µL standarda za mikrometod. Zatim se uzorcima standarda dodaje po 200 µL radnog *Bradford*-ovog reagensa. Nakon inkubacije od 2 min meri se apsorbanija na 590 i 450 nm. Iz odnosa relativnih apsorbanija na 590 i 450 nm dobija se koeficijent sa kojim se u funkciji koncentracije standardnih rastvora proteina BSA, linearnom regresionom analizom, dobija jednačina prave za određivanje nepoznate koncentracije proteina.

Zapremine uzoraka nepoznate koncentracije i radnog *Bradford*-ovog reagensa su identične onima koje su korišćene pri kreiranju standardne prave, 5 i 200 µL za makro metod odnosno 20 i 200 µL za mikro metod, respektivno. Koncentracija proteina određuje se na osnovu jednačine prave i odnosa apsorbanija na 590 i 450 nm na prethodno opisan način.

**Tabela 4.2. Priprema različitih razblaženja BSA (Bradford-ov makro i mikrometod) za konstruisanje standardne prave.**

Razblaženja za standardnu krivu makro metod					Razblaženja za standardnu krivu mikro metod				
Polazni rastvori		dH <sub>2</sub> O	Finalna razblaženja		Polazni rastvori		dH <sub>2</sub> O	Finalna razblaženja	
c	V	V	c	V	c	V	V	c	V
[µg/mL]	[µL]	[µL]	[µg/mL]	[µL]	[µg/mL]	[µL]	[µL]	[µg/mL]	[µL]
2000	500	0	2000	500	200,0	500	0	200,0	500
2000	750	250	1500	750	200,0	750	250	150,0	750
2000	500	500	1000	500	200,0	500	500	100,0	500
2000	250	250	750	500	150,0	250	250	75,0	500
1000	500	500	500	500	100,0	500	500	50,0	500
500	500	500	250	500	50,0	500	500	25,0	500
250	500	500	125	1000	25,0	500	500	12,5	1000
0	0	500	0	500	0	0	500	0	500

#### 4.2.2. Elektroforetske tehnike

Elektroforetska određivanja izvedena su na sistemima za horizontalnu elektroforezu *Hoefler mighty small SE 245* (Hoefler, Holiston, SAD) i *Biostep Gel Electrophoresis Tank Vertical GV202* (Burkhartsdorf, Nemačka). Procedura diskontinualne elektroforeze izvođena je prema originalnoj *Laemmli*-jevoj metodologiji [303].

##### 4.2.2.1. Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Rastvori i puferi koji su potrebni za izvođenje SDS-PAGE su pripremani unapred. A to su:

**AA** – Monomerni rastvor sa 30 % (m/V) akrilamida i 2,7 % (m/V) bisakrilamida;

**Tris HCl 8,80** – Pufer razdvajajućeg gela sa 1,5 M Tris HCl-a na pH 8,80;

**Tris HCl 6,80** – Pufer koncentrujućeg gela sa 0,5 M Tris/HCl-a na pH 6,80;

**SDS** – Rastvor za denaturaciju sa 10 % (m/V) SDS-a;

**APS** – Rastvor za inicijaciju polimerizacije sa 10 % (m/V) amonijum-persulfata (APS);

***n*-butanol** – Rastvor vodom zasićenog *n*-butanola za nadslojavanje gela;

**5x PzU** – 5x koncentrovani pufer za pripremu uzoraka sa 0,25 M Tris HCL-a na pH 6,80, 50 % glicerola, 10 % (m/V) SDS-a i 0,1% (m/V) bromfenol plavog (ovaj pufer takođe sadrži i 25% (V/V) β-merkptoetanolu ukoliko se izvodi redukujuća SDS-PAGE);

**10x PzE** – 10x pufer za elektroforezu sa 0,25 M Tris-HCl-a pH 8,3, 1,92 M glicina, 1% SDS-a;

Rastvor za fiksiranje, bojenje, obezbojavanje i čuvanje gelova sa 5 – 50 % metanola, 7 – 10 % sirćetne kiseline;

Rastvor bojenje gelova sa 0,25% *Coomassie Brilliant Blue Red 250* (CBB R-250), 50 % metanola, 10 % sirćetne kiseline (za manje osetljivije bojenje može se koristiti i boja CBB G-250).

Uzorci za elektroforezu se pripremaju tako što se mešaju sa 5x koncentrovanim puferom za uzorke u odnosu 4 : 1, respektivno i inkubiraju na 90°C 10 min. Za uspešno bojenje gela konačna koncentracija proteina u uzorku koji je spreman za elektroforezu potrebno je da bude u opsegu od 0,1 do 10 mg/mL i može se optimizovati merenjem koncentracije *Bradford*-ovom metodom i razblaživanjem.

**Tabela 4.3. Sastav SDS/PAGE gelova pripremanih za elektroforezu na naznačenim sistemima.**

Sistem	<b>Hofer Dual Gel Caster Mighty Small SE 245 (mali sistem)</b>	
	12% gel za razdvajanje [ $\mu\text{L}$ ] (donji gel)	4% gel za koncentrovanje [ $\mu\text{L}$ ] (gornji gel)
AA	2 000,0	400,0
Tris-HCl pH 8,8	1 250,0	/
Tris-HCl pH 6,8	/	750,0
Voda	1 666,0	1 800,0
TEMED	2,5	1,5
SDS	50,0	30,0
APS	35,0	25,0
$\Sigma\text{V}$	$\sim 5\ 000,0$	$\sim 3\ 000,0$

Sistem	<b>Biostep Gel Electrophoresis Tank Vertical GV202 (veliki sistem)</b>	
	10% gel za razdvajanje [ $\mu\text{L}$ ] (donji gel)	4% gel za koncentrovanje [ $\mu\text{L}$ ] (gornji gel)
AA	4 800,0	800,0
Tris-HCl pH 8,8	3 000,0	/
Tris-HCl pH 6,8	/	1 500,0
Voda	4 000,0	3 600,0
TEMED	6,0	3,0
SDS	120,0	60,0
APS	60,0	30,0
$\Sigma\text{V}$	$\sim 12\ 000,0$	$\sim 6\ 000,0$

U Tabeli 4.3. prikazan je sastav najčešće korišćenih gelova za elektroforetska određivanja na pomenutim sistemima. Nakon što se staklene ploče fiksiraju u nosač zajedno sa distancerima (0,75 mm za mali sistem i 1 mm za veliki sistem), najpre se naliva sveže pripremljena i dezaerisana smeša za razdvajajući (donji) gel pri čemu se pred samo nalivanje dodaje inicijator polimerizacije (APS), a nakon dodavanja nadslojava rastvorom *n*-butanola. Nakon polimerizacije *n*-butanol se uklanja izlišnim ispiranjem sa dejonizovanom vodom, naliva se sveže pripremljen gel za koncentrovanje (gornji gel) i postavlja „češalj“ za formiranje bunara. Nakon što gornji gel polimerizuje, pažljivo se uklanja češalj, ploče se vade iz nosača i uranjaju u kadice sistema za elektroforezu u kom se nalazi 1x pufer za elektroforezu. Uzorci se nanose mikrošpicem ili automatskom pipetom u bunare, zavisno do koncentracije u zapremini od 15  $\mu\text{L}$  do 50  $\mu\text{L}$ . Sistem se zatim povezuje na jednosmerni napon pri čemu se 80 V koristi za koncentrovanje uzoraka u gornjem gelu i 100 do 180 V za razdvajanje uzoraka u donjem gelu. Neposredno pre nego što boja koja se nalazi u uzorcima, a potiče iz pufera za uzorke, napon se isključuje čime se zaustavlja elektroforeza. Pločice se vade iz sistema i iz njih oprezno oslobađa gel koji se ispira nekoliko puta dejonizovanom vodom i fiksira rastvorom za fiksiranje u trajanju od 15 min i boji rastvorom za bojenje gela 15 do 120 minuta zavisno od koncentracije proteina i korišćene boje (CBB R-250 je osetljivija od CBB G-250, ali je potrebno duže bojenje gela). Nakon bojenja gel se obezbojava rastvorom za obezbojavanje do nestanka pozadinske boje i čuva u 7 % rastvoru sirćetne kiseline.

U cilju određivanja molekulske mase proteinskih traka na elektroforetskim gelovima, korišćeni su komercijalni standardni molekulski markeri sa molekulskim masama od 14,4 do 116 kDa (Thermo Fisher Scientific, Rokford, IL, SAD).

#### 4.2.2.2. Zimogramska detekcija peptidolitičkih proteina

Gel za razdvajanje za zimografsku detekciju se priprema po protokolu za pripremu gela za SDS-PAGE, s tim što se umesto destilovane vode dodaje 0,3 % rastvor želatina u dejonizovanoj vodi u identičnim zapreminama. Ovako dobijeni gel će sadržati konačnu koncentraciju želatina od 0,1 %. U gel za koncentrovanje nije potrebno menjati sastojke gela i on se priprema identično kao u protokolu za SDS-PAGE.

Peptidaze (u konačnoj koncentraciji od 1 mg/mL) su inhibirane 30 minuta sa 5 mmol/L jodoacetamidom (IAA) ili 5 mmol/L fenilmetilsulfonil fluoridom (PMSF) ili 5 mmol/L etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (EDTA), zatim su su pripremani sa puferima za uzorke na već opisan način, ali na temperaturi od 60°C 30 min.

Nakon razdvajanja, gel je ispiran dejonizovanom vodom, a zatim je inkubiran u puferu koji je podešen na optimalnu pH vrednost aktivnosti peptidaza (100 mM Tris/HCl na pH 8,00; 100 mM natrijum-fosfatni pufer na pH 7,20; 20 mM L-cistein) u toku 12 h ili preko noći. Gel se zatim fiksira i obezbojava na način koji je već prethodno opisan pri čemu je detekcija traka, odnosno želatinolitička aktivnost, identifikovana kao prozirna traka na plavoj pozadini (negativno bojenje).

#### 4.2.2.3. Izoelektrično fokusiranje (IEF) i 2D zimogramska detekcija

Osim rastvora koji su već opisani u odeljku za izvođenje SDS-PAGE, za izoelektrično fokusiranje i 2D SDS-PAGE potrebni su sledeći rastvori:

**2x PzU** – 2x koncentrovani pufer za pripremu uzoraka sa 7,5 M ureom, 0,5 % (V/V) amfolita, 2 % (V/V) Triton X-100 i 0,1% (m/V) bromfenol plavog (opciono se može dodati i 1 % (V/V)  $\beta$ -merkaptotetanolu ukoliko se izvodi redukujuće IEF);

**10x PzE** – 10x pufer za elektroforezu sa 0,25 M Tris-HCl-a pH 8,3, 1,92 M glicina, 1% SDS-a;

Rastvor amfolita – Ampholine, pH opsega 3,5-10;

Rastvor katolita (gornji elektrolit) – 40 mM NaOH;

Rastvor anolita (donji elektrolit) – 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>;

Uzorci za elektroforezu se pripremaju tako što se mešaju sa 2x koncentrovanim puferom za uzorke u odnosu 1 : 1, pri čemu su uzorci lateksa inkubirani sa L-cisteinom u finalnoj koncentraciji od 52 mM u samom uzorku.

Gelovi za IEF pripremljeni su prema *Tabeli 4.4.* u vertikalnom sistemu *Hoeffer Dual Gel Caster Mighty small SE 245*, pri čemu je pri rastvor katolita razblažen 2x i apliciran u gornji deo kade, a rastvor anolita korišćen kao takav i u donjem delu kade za elektroforezu. Uslovi razdvajanja su 150 V, 50 mA, 100 W, 30 min za predfokusiranje amfolita i 200 V, 50 mA, 100 W, 150 min pri razdvajanju proteina po pI vrednosti.

**Tabela 4.4. Sastav gelova za IEF.**

Sistem	<i>Hoefler Dual Gel Caster Mighty Small SE 245 (mali sistem)</i>	
	5 % gel za IEF [ $\mu\text{L}$ ]	4% gel za koncentrovanje [ $\mu\text{L}$ ]
AA	1 200,0	400,0
Urea (g)	3,5	/
Amfoliti	350,0	/
Voda	2850,0	1 250,0
TEMED	12,0	2,0
APS	35,0	30,0
NaOH (40 mM)	/	1 350,0
$\Sigma\text{V}$	$\sim 7\ 000,0$	$\sim 3\ 000,0$

Za određivanje pI vrednosti gel se najpre izdela na trake (bez uzorka i sa uzorcima), a zatim se trake sa uzorcima inkubiraju u neredukujućem PzU-u 30 min i u redukujućem PzU-u 30 min. Prazne trake gela izdeltene su na manje trake dužine 1 cm i inkubirane u 10 mM kalijum-hloridu 30 min, nakon čega je u supernatantima merena pH vrednost. Na osnovu zavisnosti pH vrednosti i udaljenosti od anode formira se grafik i iz jednačine prave može se izračunati pI vrednost peptidaze koja pokazuje želatinolitičku aktivnost u 2D zimogramskoj detekcija peptidolitičkih proteina koja se izvodi na isti način kao što je prethodno opisano tako što se kao uzorci koriste trake sa IEF [304].

#### **4.2.2.4. Densitometrijska analiza elektroforetskih gelova**

Korišćenjem programa GelAnalyzer 19.16 [305] sa opcijom analize pojedinačnih traka gelovi su densitometrijski analizirani pri čemu su za upoređivanje intenziteta pojedinačnih traka uzorci nanošeni u triplikatu, a rezultati su prikazivani kao srednja vrednost intenziteta tako dobijenih triplikata traka.

### **4.3. Funkcionalni testovi stabilnosti i aktivnosti peptidaza**

#### **4.3.1. Tretiranje peptidaza niskim temperaturama**

U cilju određivanja uticaja pufera na aktivnost peptidaza u uslovima sniženih temperatura, tripsin je rastvoren u različitim formulacijama pufera opisanim u odeljku puferi rastvori, sa ili bez različitih nejonski površinski aktivnih jedinjenja u konačnoj koncentraciji od 1 mg/mL. Ovako pripremljeni rastvori su zamrzavani na  $-20^{\circ}\text{C}$  brzinom zamrzavanja od  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , nakon 1 h rapidno odmrzavani brzinom od  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , kako bi se smanjila destabilizacija tripsina [306], pri čemu su ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja ponavljani do 7 puta. Nakon svakog ciklusa uzimani su alikvoti koji su razblaženi u 100 mM Tris puferu pH 8.0 i merena retencija aktivnosti hidrolize supstrata BAPNA, pri čemu je početna aktivnost posmatrana kao 100% aktivnosti, dok su aktivnosti izmerene nakon svakog

ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja izražavane kao relativna preostala aktivnost. Svi uzorci su uzimani u triplikatu. U cilju sprečavanja inkubacije uzorka iznad 0°C na manje od 2 min po ciklusu, alikvoti su uzimani odmah nakon vizuelnog nestanka leda u uzorku. Pri zamrzavanju/odmrzavanju tripsina u natrijum-fosfatnom puferu pH 8,0 alikvoti su centrifugirani (10.000 g, 10 min, 4°C). Koncentracije rastvornih peptida u supernatantima određivana je *Bradford*-ovom metodom, koristeći BSA kao standard [302].

Statističke razlike u rezultatima analizirane su t-testom u OriginPro 8.0 softverskoj platformi.

#### 4.3.2. Hidroliza sintetičkog supstrata BAPNA

Sintetički supstrat BAPNA (*N*- $\alpha$ -benzoil-D,L-arginin-4-nitroanilid) korišćen je kao supstrat za ispitivanje specifične enzimske aktivnosti tripsina tretiranog u gore opisanim puferima (sa ili bez različitih nejonski površinski aktivnih jedinjenja) koristeći mikrotitar pločice sa 96 bunarčića (Sarstedt, Njuton, Severna Karolina, SAD) kako je prethodno opisano [261]. 50  $\mu$ L 100 puta razblaženom rastvoru tripsina dodavano je 100  $\mu$ L rastvora supstrata (1 mM BAPNA, do 5 % DMSO u 100 mM Tris puferu pH 8,0). Nakon inkubacije na 20°C u toku 45 min, reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 % sirćetne kiseline i merena je apsorbancija na 405 nm čitaču za mikrotitar pločice *LKB 5060-006* (LKB Instruments, Vienna, Austria). Svi alikvoti analizirani su u triplikatu. Zavisno od testa, relativna aktivnost tripsina smatrana je preostalom aktivnošću nakon svakog ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja pri čemu se aktivnost uzoraka koji nisu zamrzavani uzimala kao 100 %.

#### 4.3.3. Hidroliza BSA

Za određivanje peptidolitičke aktivnosti tripsina u 100 mM kalijum-fosfatnom puferu na pH 8,0 sa različitim nejonskim surfaktantima (Triton X-100, Tween 80 i Tween 20 u koncentraciji od 0,1 % (w/v)) koji je zamrzavan/odmrzavan na prethodno opisan način u 7 ciklusa, izvršena je hidroliza BSA. Triplikati od po 50  $\mu$ L 100 puta razblaženog tripsina su inkubirani sa 250  $\mu$ L rastvora supstrata (0,65% (v/v) rastvor BSA u 100 mM Tris pufer pH 8,0). Nakon 30 min inkubacije na 37°C, reakcija je prekinuta dodatkom 100  $\mu$ L 20 % (w/v) trihlorosirćetne kiseline (TCA) i proteinski talog je uklonjen centrifugiranjem 15 min na 12,000 x g. Apsorbancija rastvorljivih proizvoda u supernatantu merena je na 280 nm (*UV-2600*, Šimadzu, Kjoto, Japan). Relativna aktivnost tripsina u kalijum-fosfatnom puferu, koji nije zamrzavan/odmrzavan posmatrana je kao 100%.

#### 4.3.4. Hidroliza želatina

Peptidolitička aktivnost papaina i peptidaza lateksa smokve prema želatinu određivana je ninhidrinskom metodom kao što je prethodno opisano, uz neke modifikacije [261]. Želatin (Merck, Darmstad, Nemačka) rastvoren je u 50 mM Tris puferu pH 8,1 na 37°C tokom 15 minuta do konačne koncentracije od 20 mg/mL. 100  $\mu$ L rastvora želatina i 10  $\mu$ L rastvora uzoraka peptidaza sa odgovarajućim slepim probama su inkubirani na 37 ° C tokom 5 h uz mućkanje. Nakon dodavanja 110  $\mu$ L 20% (v/v) rastvora PEG 6000, smeša je inkubirana u trajanju od 1 h na 4 °C i centrifugirana na 12.000  $\times$  g tokom 30 minuta na 4 °C. 20  $\mu$ L supernatant pomešano je sa 200  $\mu$ L rastvora ninhidrina (2 % (m/V) ninhidrina, 0,15 % (m/V) kalaj-hlorida, 50 % (m/V) propilen-glikola u 50 mM citratnom puferu pH 5) i smeša je inkubirana na 100 °C tokom 10 min. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, reakciona smeša je razblažena sa 400  $\mu$ L 50% 1-propanola i merena je apsorbancija na 570 nm za uzorke i slepe probe koje sadrže ninhidrin bez supstrata i/ili bez peptidaza. Jedinica enzimske



aktivnosti želatina (Gelatin Digestion Unit - GDU) definisana je kao količina enzima koji oslobađa peptide iz želatina u ekvivalentnoj boji ninhidrina kao 1 mmol leucina u toku 5 h (kalibraciona prava konstruisana je glicinom u opsegu koncentracija 1 – 8  $\mu$ M). Odnos enzimske aktivnosti i ukupnog sadržaja proteina uzorka smatrao se specifičnom aktivnošću i izražavao u GDU/mg.

#### 4.3.5. Hidroliza kolagena

Za određivanje kolagenolitičke aktivnosti peptidaza, korišćen je kolagen tipa I iz Ahilove tetive govečeta (0,5 mg) koji je rehidriran sa 100 mL 100 mM Tris puferom pH 8,1 tokom 16 h. Zatim su uzorcima rehidriranog kolagena dodavane peptidaze do finalne koncentracija od 10  $\mu$ g/mL, pri čemu je nastavljeno sa digestijom tokom 5 h na 37°C. Reakciona smeša je osušena u vakuumu i analizirana pomoću infracrvene spektroskopije.

#### 4.3.6. Hidroliza kazeina

Hidroliza kazeina je izvedena kao što je prethodno opisano [249]. 100  $\mu$ L uzorka peptidaze inkubirano je 30 minuta na 37 °C sa 500  $\mu$ L 0,65 % (w/v) rastvora kazeina koji je sadržao 10 mM L-cisteina u 50 mM Tris pH 8,0 sa odgovarajućim slepim probama. Zatim je dodato 100  $\mu$ L 5% (v/v) TCA kako bi se zaustavila reakcija i rastvor je centrifugiran 15 min na 12,000 $\times$ g kako bi se uklonio proteinski precipitat. Apsorbancija supernatanta je merena na 280 nm (*uniSPEC 2*, Lab Logistics Group GmbH, Mekenhajm, Nemačka) za kvantifikaciju peptidnih proizvoda rastvornih u prisustvu TCA. Jedinica kazeinolitičke aktivnosti (U) definisana je kao količina enzima koja povećava apsorpciju na 280 nm po minutu digestije. Specifična aktivnost enzima je definisana kao broj arbitrarnih jedinica po miligramu proteina (U/mg).

#### 4.3.7. Autoliza

Za određivanje autolize korišćena je SDS PAGE tripsina čuvanog u 100 mM kalijum-fosfatnom puferu na pH 8,0 sa različitim nejonskim surfaktantima u koncentraciji od 0,1 % (Triton X-100, Tween 80 i Tween 20). Količine od 1 mg proteina bile su analizirane pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja SDS PAGE-om (*Bio-Rad*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) [303]. Bojenje elektroforetskih gelova izvedeno je sa CBB R-250 bojom (Serva). Gelovi su skenirani, a dobijene slike u boji su kvantitativno analizirane pomoću softvera *GelAnalyzer 2010a* sa opcijom jednopojasne analize. Svaki uzorak rađen je u triplikatu i intenzitet svake trake tretiran je kao procenat intenziteta kontrolne trake označene kao 100%.

## 4.4. Spektroskopske metode

### 4.4.1. Infracrvena spektroskopija sa *Fourier*-ovom transformacijom FTIR

Infracrvenom spektroskopijom sa *Fourier*-ovom transformacijom (FTIR) praćene su promene u sekundarnoj strukturi za dve vrste uzoraka: peptidaze (sa dodatkom 0,1% nejonskih surfaktanata, kao i promene nakon ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja) i kolagen (pre i nakon digestije sa peptidazama).

Da bi se utvrdile promene u sekundarnoj strukturi tripsina tokom denaturacije indukovane zamrzavanjem/odmrzavanjem, primenjena je FTIR spektroskopija sa oslabljenom ukupnom refleksijom (attenuated total reflectance - ATR) u rezoluciji od  $1\text{ cm}^{-1}$  (*Nicolet 6700 FTIR*, softver OMNIC verzija 7.0, Thermo Scientific), srednjem IR regionu od 400 do  $4000\text{ cm}^{-1}$  i DTGS KBr detektorom sa termoelektričnim hlađenjem. Uzorci tripsina ( $1,5\text{ }\mu\text{L}$ ,  $1\text{ mg/mL}$ ) su vorteksirani, postavljani na dijamantski kristal (Smart Orbit, Thermo Scientific), i odmah uparavani do tankog filma uz pomoć struje azota. Spektri uzoraka tripsina pre i nakon svakog ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja sakupljeni su u 64 snimka. Uzorci su pripremani u  $100\text{ mM}$  natrijum-fosfatnom i  $100\text{ mM}$  kalijum-fosfatom puferu pH 8,0 sa i bez nejonskih surfaktanata (Triton X-100, Tween 80 i Tween 20 u koncentraciji od 0,1%). Pozadinski spektri su sakupljeni pre i nakon svakog snimanja spektra uzoraka. OMNIC softver je korišćen za automatsku ATR korekciju i automatsku korekciju osnovne linije. Uzorci kolagena tretiranog peptidazama snimani su i snimci obrađivani na identičan način.

#### 4.4.1.1. Analiza spektara

Za kvantitativnu analizu FTIR spektara generisani su drugi izvodi u Amidnom I regionu korišćenjem OMNIC softvera sa *Savitzky-Golay* filterom od 7 taćaka trećeg polinomskog reda. Minimumi karakteristićni za odrećene sekundarne strukture tripsina dodeljivani su kao što je prethodno opisano [8]. Specifićne trake drugog izvoda spektara dodeljene su sekundarnim strukturama na osnovu literaturnih podataka pri ćemu se poloćaji traka razlikuju zavisno od snimanog materijala.

Kvalitativna analiza procentualnog sadržaja sekundarnih struktura peptidaza raćena je na osnovu *Fourier*-ove samodekonvolucije Amidnog I regiona primenom OMNIC softvera. Dekonvolucija spektara na pojedinaćne komponente izvedena je na osnovu *Lorentz*-ijanovih funkcija raspodele, sa širinom pika na polovini visine od  $13\text{ cm}^{-1}$  i faktorom povećanja rezolucije od 2,4 [307], [308]. Granićne frekvencije traka sa *Lorentz*-ijanskog oblika bili su sledeći:  $\beta$ -ploćica  $1697\text{ cm}^{-1}$ ,  $1630\text{ cm}^{-1}$ , i  $1623\text{ cm}^{-1}$ ;  $\alpha$ -heliks  $1659\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$ ; neurećene strukture  $1672\text{ cm}^{-1}$ ;  $\beta$ -okret  $1683\text{ cm}^{-1}$ .

Procentualna zastupljenosti sekundarnih struktura dobijena je iz odnosa površina pojedinaćnih *Lorentz*-ijanovih krivih dodeljenih odrećenim strukturama i površine svih pikova dobijenih dekonvolucijom.

Izloćenost tirozinskih ostataka aminokiselina rastvaraću praćena je kao promena vibracija tirozinskog prstena na frekvenciji od  $1517\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.4.1.2. Spektralna korelacija

Poređenjem drugih izvoda FTIR-a spektara ispitivana je strukturna sličnost uzoraka tripsina pre i nakon svakog ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja [309]. Koeficijent spektralne korelacije računat je pomoću jednačine (1).

$$r = \frac{\sum^n x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 y_i^2}} \quad (1)$$

gde  $x_i$  i  $y_i$  predstavljaju spektralnu apsorpciju iz referentnog spektra i spektra uzorka na  $i$ -toj frekvenciji. Spektralna korelacija rađena je amidni I region ( $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4.4.2. Fluorescentna spektroskopija

##### 4.4.2.1. Fluorescencija triptofana

Za analizu sekundarne strukture tripsina fluorescentnom spektroskopijom korišćeni su uzorci tripsina koji su zamrzavani/odmrzavani u 100 mM natrijum-fosfatnom puferu na pH 8,0 u koncentraciji od 25 mg/mL na 25°C koristeći spektrofluorimetar *FluoroMax-4 Jobin Yvon* (Horiba, Kyoto, Japan). Pobuđivanje je postizano svetlošću talasne dužine od 295 nm sa promerom ekscitacionog otvora od 8,5 nm. Emisija je praćena u opsegu od 300 do 450 nm sa emisionim otvorom promera 3,3 nm u kivetu širine 1 cm, pri čemu je brzina skeniranja bila 60 nm/min. Kriva denaturacije kreirana je sa vrednostima maksimalne emisije fluorescencije u zavisnosti od broja ciklusa zamrzavanja. Spektri su takođe korigovani za doprinos pozadinskog signala. Spektri tripsina upoređivani su prema promenama u centru spektralne mase ( $\nu$ ) pomoću jednačine (2):

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum \nu_i F_i}{\sum F_i} \quad (2)$$

gde je  $F_i$  fluorescencija emitovana na talasnom broju  $\nu_i$  [310].

##### 4.4.2.2. Fluorescencija ANS

8-anilino-1-naftalen sulfonat (ANS) korišćen je za snimanje emisionih spektara tako što je najpre rastvoren u koncentraciji od 8 mM u 100 mM Tris-HCl puferu pH 8,5, a zatim je svaki uzorak tripsina (u zapreminama od 10  $\mu\text{L}$  i u koncentraciji od 0,1 mg/mL) pomešan sa po 190  $\mu\text{L}$  rastvora ANS nakon čega je snimana fluorescencija. Talasne dužine ekscitacije i emisije postavljane su na 390 i 480 nm, respektivno. Za merenje fluorescencije korišćen je *Infinite m200 PRO* (Tecan, Menedorf, Švajcarska) sa mikrotitar pločicama sa 96 bunara [311].

#### 4.5. Mikrobiološke metode

Za enumeraciju bakterija, prisutnih u uzorcima hrane, *Listeria monocytogenes* ATCC19111 je inokulisana u fermentisani proizvod od mesa (Čajna kobasica, Zlatiborac, Srbija). Najpre su fermentisane kobasice (Čajna, Zlatiborac, Srbija) testirane na prisustvo *L. monocytogenes* korišćenjem metoda ISO 11290 deo 1:1998. U sledećem koraku, *L. monocytogenes* je kultivisana na 37°C tokom 24 sata u 10 mL bujona M17 (Merck Darmstadt, Nemačka) koji sadrži 0,5% glukoze. Prekonoćna kultura *L. monocytogenes* ( $4 \times 10^8$  cfu/mL) centrifugirana je na 5000×g, 10 min, Ependorf 5804r. Supernatant je odbačen dok je pelet resuspendovan u sterilnom fiziološkom rastvoru (0,85% NaCl), ovaj korak je ponovljena i ćelijski pelet je resuspendovan u isti sterilni fiziološki rastvor. Konačna suspenzija je serijski razblažena i dodata u fermentisani proizvod od mesa u finalnoj količini od  $10^4$  cfu/g *L. monocitogenes*.

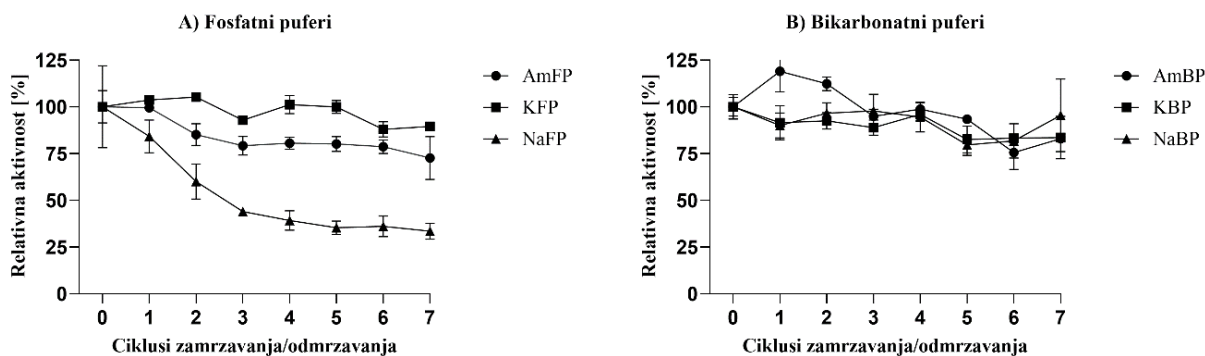
Rastvori tripsina, papaina i lateksa smokve pripremljeni su u 100 mM kalijum-fosfatnom puferu pH 8.0 u koncentracijama od 1 ili 5 mg/mL merenjem koncentracije rastvorljivih proteina po Bradford-ovom metodu.

Veštački kontaminirani fermentisani proizvodi od mesa sa kontrolnim uzorcima sušeni su 45 min i držani na +4 °C 24 h, kako bi se imitirali uslovi skladištenja. Uzorci su zatim u aseptičnim uslovima razblaženi u 45 mL sterilnog fiziološkog rastvora i homogenizovani u stomakeru 2 min. Nakon prebacivanja uzoraka u epruvete od 50 mL, naknadno centrifugiranje je izvedeno pri 4500×g tokom 10 min. Supernatant je odbačen i pelet resuspendovan u seriji od 45 mL, 100 mM kalijum-fosfatnim rastvorima koji su sadržali nejonske surfaktante sa odgovarajućim slepim uzorcima (samo pufer, ili Triton X-100 i Tween 20 u konačnoj koncentraciji od 0,01%) i papain ili peptidaze lateksa smokve (u konačnim koncentracijama proteina od 0,01 ili 0,05 mg/mL). Smeše su inkubirane na 37°C 1 h, centrifugirane, isprane i peleti resuspendovani u 45 mL sterilnog fiziološkog rastvora. Za mikrobiološku analizu pripremljena su serijska desetostruka razblaženja. Za enumeraciju *L. monocytogenes*, korišćena je selektivna Palcam *Listeria* agarna podloga (Merck Darmstadt, Nemačka). Kulture su inkubirane u triplikatima na 37 °C tokom 48 h. Statistička razlika rezultata urađen je t-testom u softverskom paketu OriginPro 8.0 pri čemu je p iznosila < 0,05.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Uticaj jonskog sastava puferских sistema na aktivnosti tripsina prema BAPNA supstratu nakon zamrzavanja/odmrzavanja

Kako bi se ispitao efekat anjona na aktivnost tripsina, korišćeni su fosfatni ili bikarbonatni puferi sa amonijum, kalijum ili natrijum katjonima. Relativna preostala aktivnost tripsina merena je sintetičkim supstratom BAPNA na pH 8,00 nakon svakog ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, a rezultati su prikazani na *Slici 5.1*. Konačne vrednosti preostale aktivnosti nakon 7 ciklusa za amonijum, kalijum i natrijum-fosfatne puferne iznosile su  $72,6 \pm 11,5\%$ ,  $89,5 \pm 1,6\%$  i  $33,5 \pm 4,3\%$ , respektivno. Za amonijum, kalijum i natrijum-bikarbonatne puferne vrednosti preostale aktivnosti tripsina su bile  $82,9 \pm 0,7\%$ ,  $83,6 \pm 11,3\%$  i  $95,5 \pm 19,4\%$ , redom. I u fosfatnim i bikarbonatnim puferima, različiti katjoni nisu doveli do značajnih razlika u aktivnosti nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, osim u slučaju natrijum-fosfatnog pufera (nakon 3 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, p-vrednosti su bile niže od  $p < 0,05$ ). Koncentracije pufera bile su 100 mM.



**Slika 5.1.** Uticaj ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja na preostalu aktivnost tripsina u fosfatnim (A) i bikarbonatnim (B) puferima na pH 8,0 sa BAPNA-om kao supstratom. Amonijum-fosfatni pufer (AmFP), kalijum-fosfatni pufer (KFP), natrijum-fosfatni pufer (NaFP), amonijum-bikarbonatni pufer (AmBP), kalijum-bikarbonatni pufer (KBP), natrijum-bikarbonatni pufer (NaBP).

### 5.2. Uticaj molarnosti pufera na aktivnost tripsina prema BAPNA supstratu tokom zamrzavanja/odmrzavanja

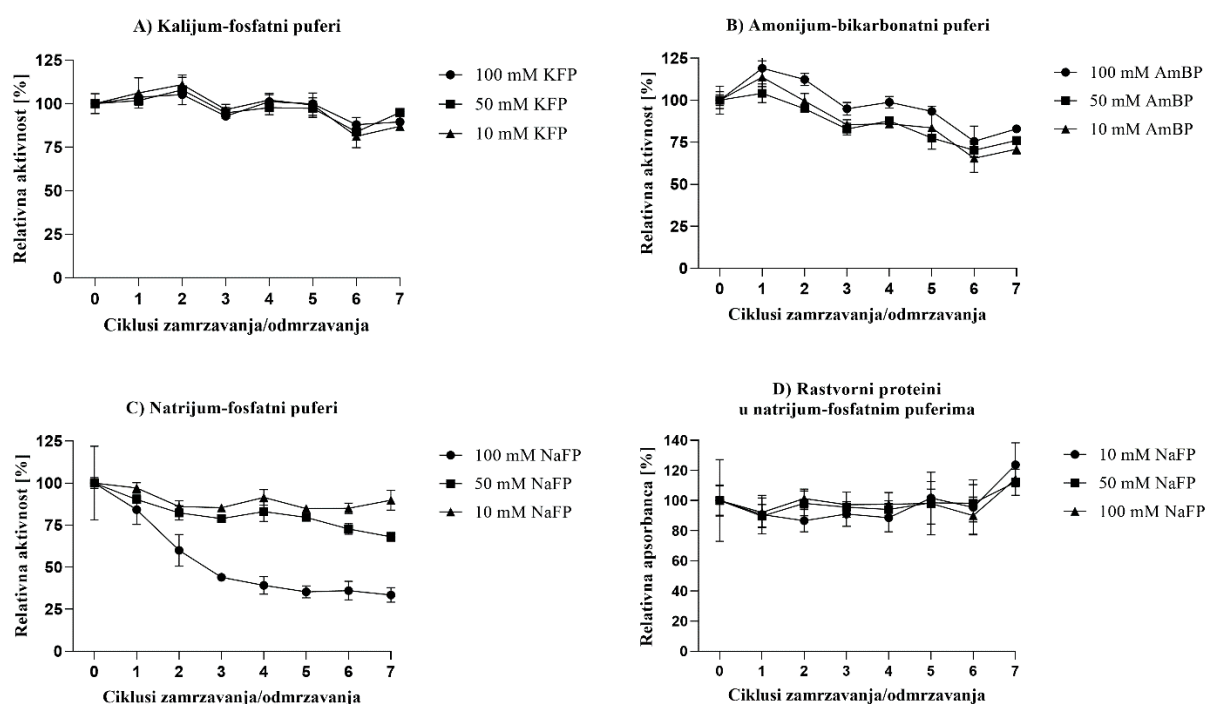
Za kalijum-fosfatne, amonijum-bikarbonatne i natrijum-fosfatne puferne ispitan je uticaj molarnosti pufera na aktivnost tripsina nakon ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Koncentracije pufera bile su 10, 50 i 100 mM na pH 8,0, a preostala aktivnost svih uzoraka merena je hidrolizom sintetičkog supstrata BAPNA na pH 8,00 (*Slika 5.2.*).

Uticaj molarnosti na aktivnost tripsina nakon ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja nije bio izražen u kalijum-fosfatnim puferima i iznosio je približno 90% početne aktivnosti (*Slika 5.2.A*). Aktivnost tripsina nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja u 100 mM amonijum-bikarbonatom puferu bila je

niža (82% početne aktivnosti) u odnosu na 10 mM pufer (70%), ali razlika nije statistički značajna ( $p > 0,05$ ) (Slika 5.2.B).

Kod natrijum-fosfatnih puferkih sistema primećen je gubitak aktivnosti tripsina nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja od  $89,9 \pm 5,8\%$ ,  $68,1 \pm 2,7\%$  i  $33,5 \pm 4,3\%$  u 10 mM, 50 mM i 100 mM natrijum-fosfatnim puferima pH 8,0, respektivno ( $p < 0,05$ ) (Slika 5.2.C), pri čemu je gubitak aktivnosti tripsina u 100 mM natrijum-fosfatnom puferu najizraženiji u prva tri ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, ali se u preostalim ciklusima ovaj trend menja i od 3. do 7. ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, preostala aktivnost se zadržava na 30% u odnosu na prvobitnu aktivnost.

Kako bi se proverio sadržaj rastvornih proteina nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, nakon svakog ciklusa meren je sadržaj proteina u rastvoru *Bradford*-ovom metodom i nisu primećene značajne statističke razlike između uzoraka (Slika 5.2.D).

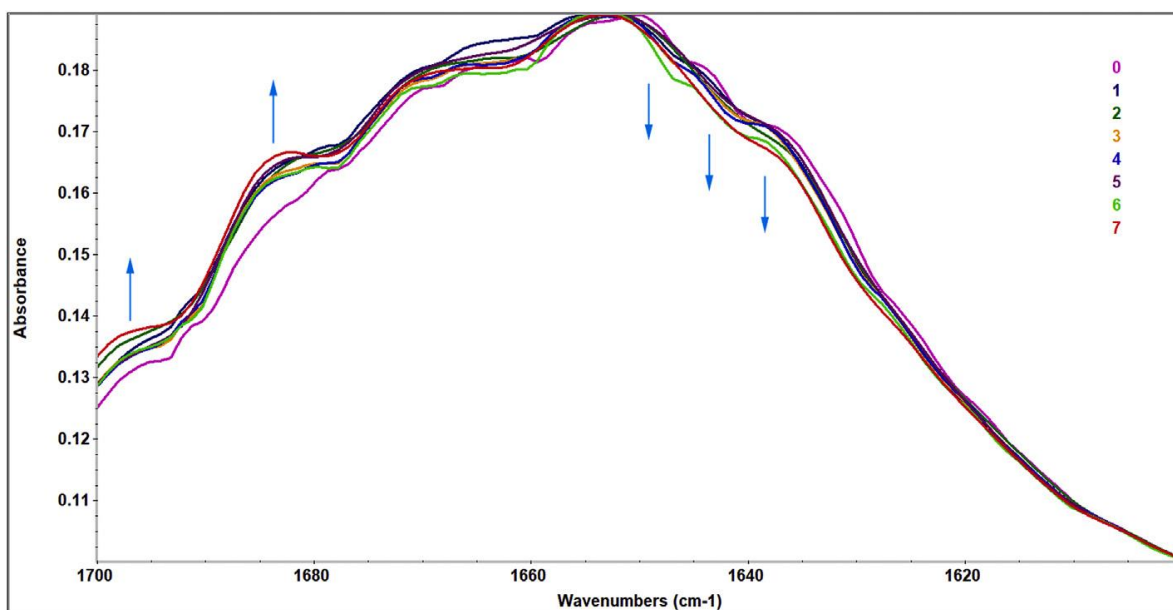


**Slika 5.2. Uticaj molarnosti pufera na preostalu aktivnost tripsina u kalijum-fosfatnim (KFP) (A), amonijum-bikarbonatnim (AmBP) (B) i natrijum-fosfatnim puferima mereno sintetičkim supstratom BAPNA, kao i preostala koncentracija rastvorenih proteina u natrijum-fosfatnim puferima pH 8,00 nakon 7 ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja merena *Bradford*-ovom metodom (D).**

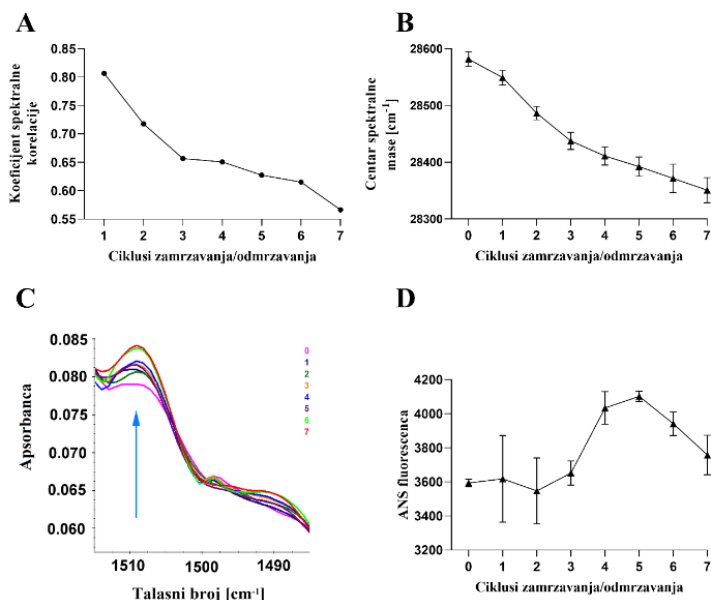
### 5.3. Strukturne promene tripsina u natrijum-fosfatnom puferu nakon zamrzavanja/odmrzavanja

Promena u sekundarnim strukturama proteina analizirane su ATR-FTIR spektroskopijom u amidnom I regionu u opsegu frekvencija  $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ . Snimljeni spektri uzoraka tripsina zamrzvanih/odmrzanih u 100 mM natrijum-fosfatnom puferu prikazani su na Slici 5.3.

Na osnovu snimljenih spektara za 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja primećeno je povećanje apsorbancije na frekvencijama  $1695\text{ cm}^{-1}$  i  $1684\text{ cm}^{-1}$  (plave strelice na *Slici 5.3.*), kao i smanjenje apsorpcije u oblasti  $1651\text{ cm}^{-1}$  do  $1637\text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 5.3.** FTIR spektri amidnog I regiona uzoraka tripsina, pre i nakon svakog od 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja u 100 mM natrijum fosfatnom pufera na pH 8,0.



**Slika 5.4.** Detekcija stopljene globule tripsina. Koeficijent spektralne korelacije za FTIR spektre (A), centar spektralne mase fluorescencije (B), vibracije tirozinskog prstena (C) i ANS intenzitet fluorescencije za uzorke tripsina (D), pre i nakon svakog od 7 ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja u 100 mM natrijum-fosfatnom puferu na pH 8.0.

Kvantitativna upoređivanja sličnosti sekundarnih struktura tripsina u 100 mM narijum-fosfatnom puferu na pH 8,00 tokom ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja izvršena su na osnovu koeficijenata spektralne korelacije drugog izvoda snimljenih ATR-FTIR spektara. Na *Slici 5.4.A* na osnovu dijagrama promene spektralne korelacije tokom 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja može se uočiti da najpre dolazi do znatnog smanjenja vrednosti koeficijenata do ciklusa 3, ali se ovaj trend usporava od ciklusa 3 – 6.

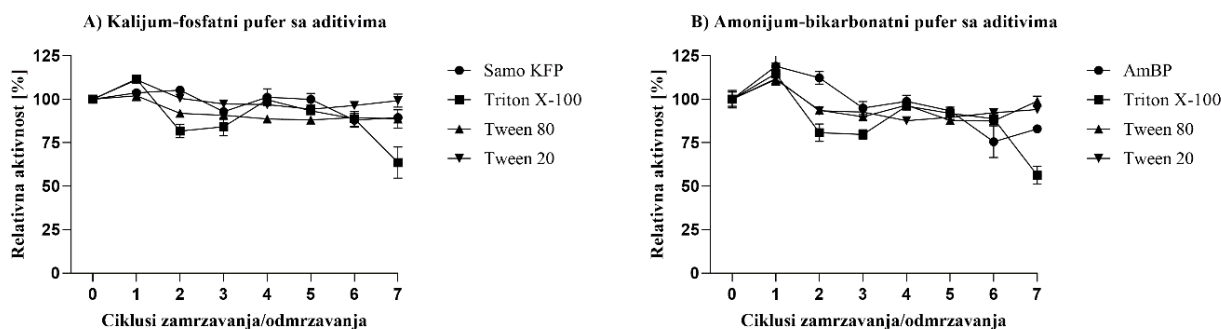
Daljom analizom trake na  $1517\text{ cm}^{-1}$  FTIR spektara, koja se može pripisati vibracijama tirozinskog prstena aminokiselinskih ostataka, praćena je izloženost ostataka tirozina rastvaraču i primećeno je povećanje intenziteta trake i pomeranje ka nižim frekvencijama (*Slika 5.4. C*).

Promene u sekundarnim strukturama su takođe ispitivane i metodama fluorescentne spektroskopije i to merenjem intenziteta ANS fluorescentne boje i kvantitativnom korelacionom analizom promene vrednosti centra spektralne mase tokom ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (*Slika 5.4. B i D*). Izračunate vrednosti za centre spektralnih masa (*Slika 5.4.B*) imaju sličan trend kao i koeficijenti spektralne korelacije ATR-FTIR spektara (*Slika 5.4.A*), dok je kod vrednosti fluorescencije ANS uočeno najpre povećanje apsorpcije nakon ciklusa 2, a zatim blago smanjenje nakon ciklusa 6 (*Slika 5.4. D*).

#### 5.4. Efekat nejonskih surfaktanata na aktivnost tripsina na sintetičkom supstratu BAPNA

Relativna preostala aktivnost tripsina nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja sa dodatkom nejonskih surfaktanata Tween 20, Tween 80 i Triton X 100, merena je sintetičkim supstratom BAPNA na pH 8,00 nakon svakog ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (*Slika 5.5*).

U slučaju 100 mM KFP, preostala aktivnost je bila  $99,2 \pm 3,8\%$  za Tween 20,  $88,7 \pm 5,3\%$  za Tween 80 i  $63,64 \pm 9,0\%$  za Triton X-100, a u 100 mM AmBP  $94,1 \pm 1,8\%$  za Tween 20,  $98,9 \pm 2,9\%$  za Tween 80 i  $56,3 \pm 5,2\%$  za Triton X-100 u poređenju sa  $89,5 \pm 1,6\%$  i  $82,9 \pm 0,7\%$  za odgovarajuće puferske sisteme bez surfaktanata ( $p > 0,05$  samo sa puferom).



**Slika 5.5.** Uticaj nejonskih surfaktanata na preostalu aktivnost tripsina tokom ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja u kalijum-fosfatnom (KFP) (A) i amonijum-bikarbonatnom puferu (AmBP) (B) na pH 8,0 sa BAPNA-om kao supstratom.



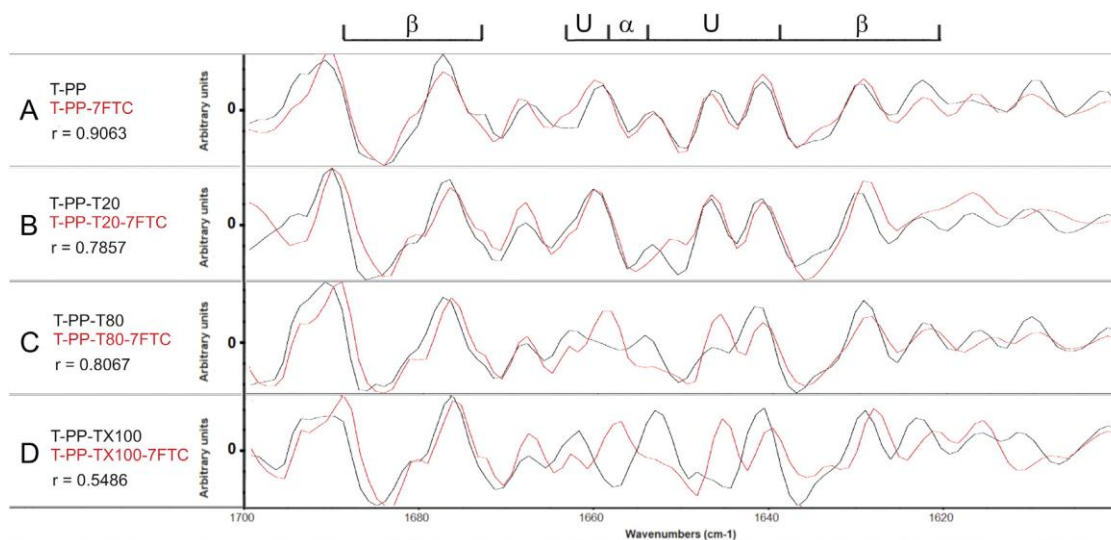
## 5.5. Efekat nejonskih surfaktanata na strukturu tripsina

FTIR spektri su snimljeni za uzorke tripsina koji su zamrzavani/odmrzavani u 100 mM KFP na pH 8,0 u prisustvu Tween 20, Tween 80 ili Triton X-100 u koncentracijama od 0,1% kako bi se dobio uvid u efekte nejonskih surfaktanata na strukturnom nivou. Na *Slici 5.6* prikazani su drugi izvodi FTIR spektara Amidnog I regiona, kao i izračunate vrednosti koeficijenata korelacija drugih izvoda spektara pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja.

Vrednosti koeficijenata korelacije su u slučaju čuvanja tripsina u kalijum-fosfatnom puferu i u kalijum-fosfatnom puferu sa dodatkom nejonskih surfaktanata Tween 20 i Tween 80 bliski maksimalnoj vrednosti od 1. Vrednost koeficijenta za uzorak tripsina samo u kalijum-fosfatnom puferu je 0,9063, za tripsin u kalijum-fosfatnom puferu sa dodatkom 0,1% Tween 20 - 0,7857 i za tripsin u kalijum-fosfatnom puferu sa dodatkom 0,1% Tween 80 - 0,8067. Za uzorak tripsina u kalijum-fosfatnom puferu sa dodatkom 0,1% Tritona X-100, koeficijent korelacije je nešto niži i iznosi 0,5486.

Za uzorak tripsina sa dodatkom Tween 20 u drugom izvodu Amidnog I regiona može se primetiti hipohromno pomeranje traka na  $1650\text{ cm}^{-1}$  i  $1630\text{ cm}^{-1}$  (*Slika 5.6.B*), dok se kod uzorka sa Tween 80 primećuje fokusiranje trake na  $1655\text{ cm}^{-1}$  sa pomerenim minimumom ka nižoj frekvenciji od  $1654\text{ cm}^{-1}$ , pojava trake na  $1622\text{ cm}^{-1}$  i blago batohromno pomeranje traka u regionu  $1651 - 1637\text{ cm}^{-1}$  (*Slika 5.6.C*).

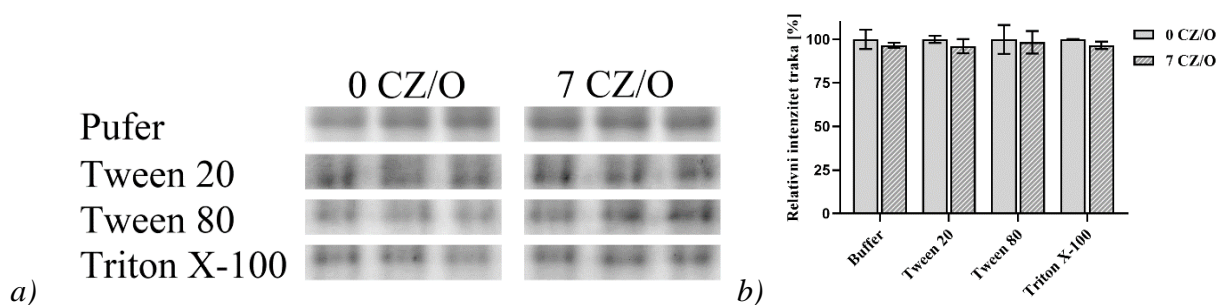
U slučaju uzorka sa dodatkom Tritona X-100 (*Slika 5.6.D*) došlo je do promena apsorbanci u regionu od  $1645 - 1670\text{ cm}^{-1}$ , očuvanja karakteristika svih minimuma oblasti  $1689 - 1673$  i  $1637 - 1620\text{ cm}^{-1}$  sa umerenim pomeranjem, smanjenja minimuma na  $1637\text{ cm}^{-1}$ , kao i nedostataka trake na  $1656\text{ cm}^{-1}$ , pojava dodatne trake na  $1661\text{ cm}^{-1}$  i promene u položaju i intenzitetu traka u regionu  $1651 - 1637\text{ cm}^{-1}$ . Nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, traka na  $1649\text{ cm}^{-1}$  je intenzivnija i pomerena na  $1648\text{ cm}^{-1}$ , dok je traka na  $1644\text{ cm}^{-1}$  redukovana i pomerena na  $1642\text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 5.6.** Drugi izvodi FTIR spektara uzoraka tripsina ( $d^2(\text{apsorbancija})/d(\text{talasni broj})^2$ ) u Amidnoj I oblasti pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (FTC) u 100 mM kalijum-fosfatnom puferu bez aditiva (PP) pH 8,0 (A) i sa surfaktantima: Tween 20 (B); Tween 80 (C); Triton X-100 (D). FTC, ciklusi zamrzavanja/odmrzavanja; PP, kalijum-fosfatni pufer; T20, Tween 20; T80, Tween 80 i TX100, Triton X-100.

## 5.6. Uticaj nejonskih surfaktanata na autolizu tripsina

Kako bi se utvrdio uticaj nejonskih surfaktanata na autolizu tripsina, urađen je SDS-PAGE profil uzoraka sa odgovarajućim aditivima pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja kao i semi-kvantitativna denzitometrijska analiza dobijenih elektroforegrama. Poređenjem intenziteta trake tripsina na 24 kDa, može se primetiti da ne dolazi do značajnije promene u intenzitetu trake tripsina nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja.

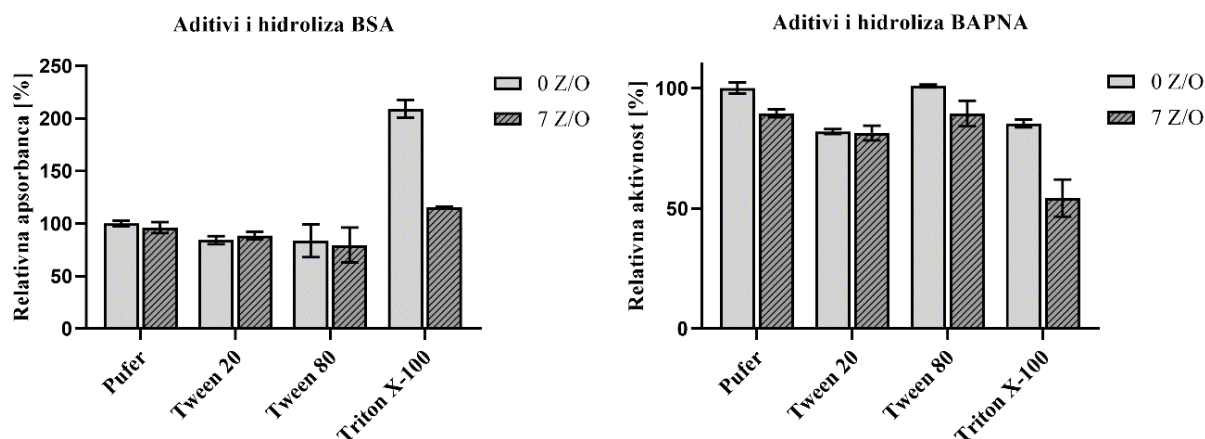


**Slika 5.7. SDS-PAGE profil gela uzorka tripsina čuvanih u kalijum-fosfatnom puferu sa različitim nejonskim surfaktantima pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (CZ/O) u triplicitetima (a) i SDS-PAGE denzitometrijski intenzitet traka za uzorke tripsina uskladištene u kalijum-fosfatnom puferu sa različitim nejonskim surfaktantima pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (CZ/O) (b). Uzorci koji nisu zamrzavani uzimani su kao 100 %.**

## 5.7. Uticaj nejonskih surfaktanata na dostupnost proteinskih supstrata

Da bi se utvrdilo da li su proteinski supstrati pristupačniji digestiji tripsinom u prisustvu surfaktanata, testirane su aktivnost uzoraka tripsina sa i bez nejonskih surfaktanata prema BSA kao proteinskom modelu supstrata i aktivnost prema BAPNA sintetičkom supstratu niske molekulske mase u kalijum-fosfatnom puferu (Slika 5.8.).

Kada su tokom hidrolize BSA tripsinom kao aditivi korišćeni Tween 20 i Tween 80 u koncentracijama od 0,1%, nije dolazilo do drastičnih promena u vrednosti apsorpcije za rastvorljive proizvode digestije BSA pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Može se primetiti i da su vrednosti apsorpcije slične za uzorke tripsina koji u bili u formulacijama kalijum-fosfatnog pufera i kalijum-fosfatnog pufera sa dodatkom Tweena 20 ili 80. U uzorku tripsina koji je sadržao 0,1% Tritona X-100, došlo je do povećanja relativne apsorpcije rastvorljivih proizvoda digestije BSA od  $209,1 \pm 8,6$  % u poređenju sa uzorkom samo u kalijum-fosfatnom puferu, kao i konsekvntno smanjenje apsorpcije nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Ovaj gubitak aktivnosti nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja se može primetiti i na model sistemu sa BAPNA-om kao supstratom, kada je korišćen Triton X-100 kao aditiv, dok je pad aktivnosti tripsina sa dodatkom Tween-a 20 ili 80 jako blag.



**Slika 5.8.** Uticaj nejonskih surfaktanata na relativnu apsorpciju rastvorljivih produkata BSA digestiranih tripsinom i rezidualne aktivnosti tripsina prema BAPNA-i pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (FTC) u kalijum-fosfatnom puferu na pH 8,0. Korišćeni supstrati su BSA (A) i BAPNA (B). Relativna apsorbanca ili aktivnost za uzorke koji nisu bili zamrznuti, a nemaju dodate aditive smatraju se za 100%.

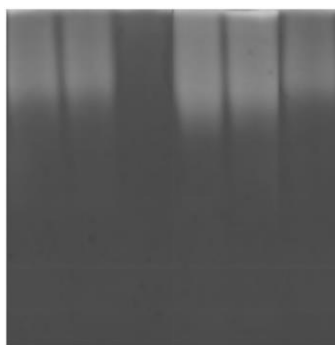
### 5.8. Supstratne specifičnosti papaina i ficina

Kako papain iz papaje i peptidaze lateksa smokve pokazuju kazeinolitičku i želatinolitičku aktivnost, ispitana je supstratna specifičnost ka kazeinu, odnosno želatinu kao supstratima sa dodatkom EDTA ili IAA. Rezultati koji su prikazani u *Tabeli 5.1.*, pokazuju nešto višu kazeinolitičku aktivnost peptidaza lateksa smokve u odnosu na papain. Sličan trend se nastavlja i dodatkom EDTA, dok je kazeinolitička aktivnost jako niska za eksperimente u kojima je dodat IAA.

Želatinolitička aktivnost peptidaza lateksa smokve je gotovo dvostruko veća u odnosu na papain, a slične vrednost se dobijaju dodatkom EDTA. Dok je želatinolitička aktivnost papaina smanjena dodatkom IAA, to nije slučaj za peptidaze lateksa smokve gde zadržano gotovo 60% aktivnosti. Ovaj trend se može videti na želatinskom zimogramu gde je uočljiv nedostatak želatinolitičke aktivnosti uzorka papaina kome je dodat IAA, dok su trake za peptidaze lateksa smokve dosta intenzivnije sa blago smanjenim intenzitetom uzorka sa IAA (*Slika 5.9.*).

**Tabela 5.1. Specifična aktivnost peptidaznih enzima papaina i peptidaza lateksa smokve prema kazeinu i želatinu kao supstratima u puferu ili sa inhibitorima (KFP – kalijum-fosfatni pufer, EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina, IAA –jodoacetamid).**

	Kazeinolitička aktivnost U/mg			Želatinolitička aktivnost, GDU/mg		
	Samo KFP	EDTA	IAA	Samo KFP	EDTA	IAA
Papain	3.49 ± 0.01	3.78 ± 0.06	0.2 ± 0.1	36 ± 2	39 ± 5	5 ± 3
Lateks smokve	3.90 ± 0.08	4.28 ± 0.05	0.3 ± 0.1	61 ± 5	65 ± 4	39 ± 7

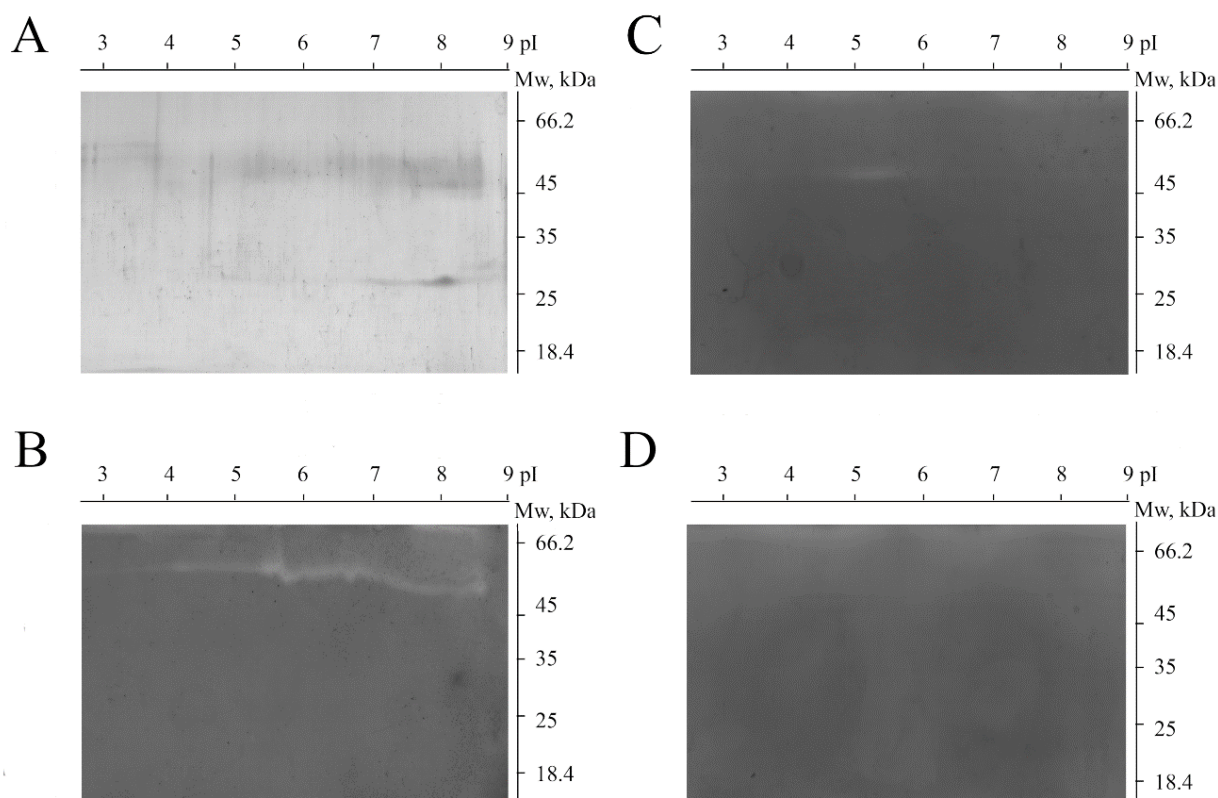


P PE PI F FE FI

**Slika 5.9. Želatinski zimogram papaina (P) i lateksa smokve (F) samo u puferu ili sa etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (E) i jodoacetamidom (I).**

### 5.9. Analiza sastava i želatinolitičke aktivnosti peptidaza lateksa smokve

Za analizu sastava peptidaza lateksa smokve i specifičnosti prema želatinu primenjene su 2D elektroforeza i zimografija (Slika 5.10. A-D). U 2D elektroforezi u kojoj je prva dimenzija bila izoelektrično fokusiranje, a druga SDS PAGE (Slika 5.10. A), može se uočiti raširena traka traka na ~50 kDa u opsegu vrednosti za pI od 5 – 9, a sličan trend ove trake se može uočiti i na želatinskom 2D zimogramu (Slika 5.10.B). Ukoliko se peptidaze lateksa smokve pre izoelektričnog fokusiranja inhibiraju IAA, nakon želatinske elektroforeze, traka na 50 kDa se sužava na opseg pI vrednosti između od 5 - 5,5 (Slika 5.10.C), i potpuno nestaje ukoliko se kao inhibitor peptidaza koristi PMSF (Slika 5.10.D).

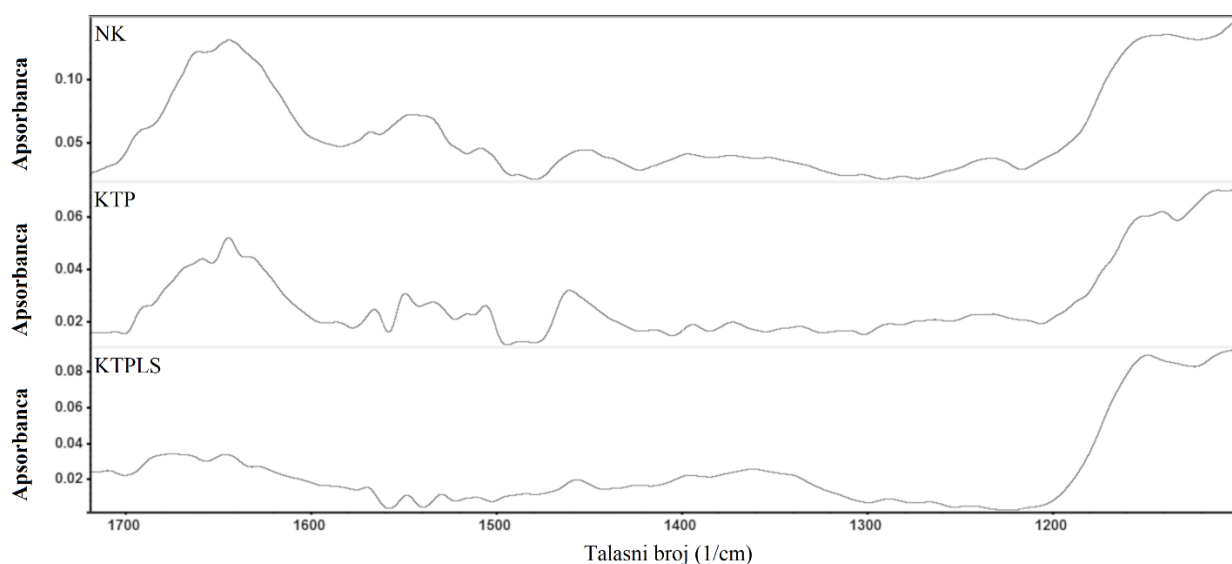


**Slika 5.10.** 2D SDS PAGE obojen CBB-R250 (A) i zimografski gel neinhibirane želatinolitičke aktivnosti lateksa smokve (B), inhibirane jodoacetamidom (IAA) (C) ili fenilmetilsulfonilfluoridom (PMSF) (D).

### 5.10. Kolagenolitička aktivnost papaina i peptidaze lateksa smokve

Kolagenolitička aktivnost papaina i peptidaza lateksa smokve karakterisane su snimanjem ATR – FTIR spektara kolagena. Poređenje spektara nativnog kolagena ahilove tetive govečeta sa onim koji je tretiran peptidazama prikazan je na *Slici 5.11*.

Dok se kod kolagena tretiranog papainom mogu primetiti sniženi intenziteti Amidnih traka (Amidni I region sa graničnim frekvencijama  $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ , Amidni II region  $1510 - 1580 \text{ cm}^{-1}$  i Amidni III region  $1200 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ ), kod kolagena koji je tretiran peptidazama lateksa smokve, ove trake su izuzetno niskog intenziteta.



**Slika 5.11. FTIR spektri netretiranog kolagena (NK) i kolagen tretiranog papainom (KTP) i peptidazama lateksa smokve (KTPLS).**

Detaljnijom analizom dobijenih spektara, kvantitativno su potvrđeni ovi rezultati na osnovu pomenutih specifičnih traka koje se mogu pripisati sekundarnim strukturama (*Tabela 5.2.*). Sadržaj  $\alpha$ -heliksa i trostrukog heliksa je blago niži za kolagen tretiran papainom, a izrazito niži za kolagen tretiran peptidazama lateksa smokve. Odnos spektralnih apsorbanci na  $A^{1235}/A^{1450}$ , koji ukazuje na sadržaj trostrukog heliksa je blago snižen za kolagen tretiran papainom i drastično nizak za kolagen tretiran peptidazama lateksa smokve. Vrednosti promene strukture nativnog kolagena bez helikoidalnih struktura, prikazane u *Tabeli 5.2.*, nisu značajne ukoliko se izraze u procentima i nisu uzimane u obzir za dalju analizu sadržaja sekundarnih struktura kolagena.

**Tabela 5.2. Prilagođene vrednosti za sekundarne strukture (%) nativnog kolagena i kolagena koji je tretiran papainom ili peptidazama lateksa smokve (Kolagen tretiran papainom – KTP, Kolagen tretiran peptidazama lateksa smokve– KTPLS, nd – nije detektovano).**

	$\alpha$ -heliks	Trostruki heliks	$\beta$ -pločica	$\beta$ -zavijutak	Neuređena struktura	Greška	$A^{1235}/A^{1450}$
Kolagen	18,0	21,2	24,4	15,1	21,3	0,3	0,93
KTP	14,7	17,8	32,1	18,0	17,4	0,6	0,85
KTPLS	1,1	nd	48,9	25,2	24,8	0,5	0,21

### 5.11. Uticaj nejonskih surfaktanata na stabilnost papaina i peptidaze lateksa smokve

Strukturne promene peptidaza utvrđene su ATR – FTIR spektroskopijom i to tako što je dekonvolucijom Amidnog I regiona snimljenih spektara karakterisan sadržaj sekundarnih struktura. Intenziteti značajnih traka za peptidaze u kalijum-fosfatnom puferu sa dodatkom nejonskih surfaktanata prikazane su u *Tabeli 5.3*. Sadržaj sekundarnih struktura pokazao je da nema značajnih promena u strukturi peptidaza papaina i peptidaza lateksa smokve bilo da su kao aditivi korišćeni nejonski detergentski Tween 20 ili Triton X-100.

Koeficijenti spektralne korelacije FTIR spektara su visoki i iznose između 0,7516 – 0,8809, a prikazani su u *Tabeli 5.4*.

**Tabela 5.3. Prilagođene vrednosti za sekundarne strukture (%) papaina i peptidaza lateksa smokve (PLS) sa ili bez nejonskih detergenata određenih ATR-FTIR spektroskopijom.**

	$\alpha$ -heliks	$\beta$ -pločica	$\beta$ -zavijutak	Neuređena struktura	Greška
Papain	26	30	8	36	2
Papain Tween 20	27	31	8	34	3
Papain Triton X-100	24	31	8	37	1
PLS	29	29	8	34	4
PSL Tween 20	27	30	7	36	2
PLS Triton X-100	24	30	9	37	2

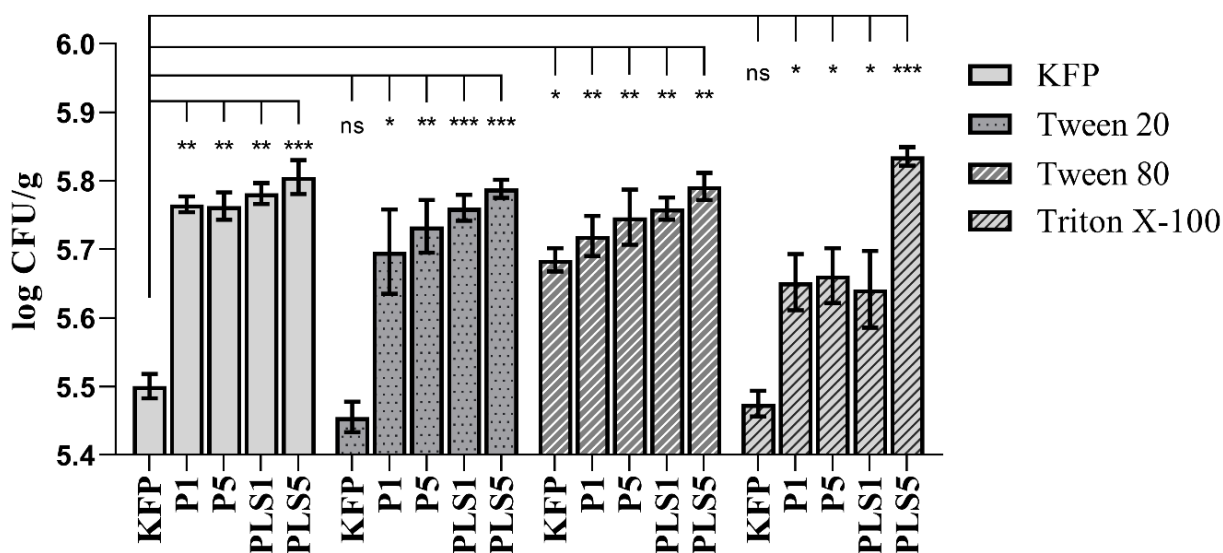
**Tabela 5.4. Koeficijenti spektralne korelacije za uzorke papaina i ficina u prisustvu 0,1% nejonskih surfaktanata.**

Peptidaze	Koeficijenti spektralne korelacije	
	Tween 20	Triton X
Papain	0,8642	0,8295
Peptidaze lateksa smokve	0,8809	0,7516

## 5.12. Detekcija mikroorganizma *Listeria monocytogenes*

Ekstrakcija i enumeracija mikroorganizma *L. monocytogenes* u uzorcima proizvoda od mesa izvedena je u prisustvu različitih koncentracije peptidaza tripsina, papaina i peptidaza lateksa smokve u dve finalne koncentracije od 0,01 mg/mL i 0,05 mg/mL sa dodatkom nejonskih surfaktanata Tween 20, Tween 80 ili Triton X-100 u finalnim koncentracijama od 0,1%. Formulacije tripsina su takođe podrazumevale tripsin koji je podvrgnut ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja. Rezultati su prikazani na Slikama 5.12. i 5.13.

U odnosu na kontrolne uzorke koji su sadržali samo kalijum-fosfatni pufer, odnosno kalijum-fosfatni pufer sa surfaktantima, primećen je porast u detekciji mikroorganizma *L. monocytogenes*. Za uzorke koji su sadržali samo pufer i papain ili peptidaze lateksa smokve, povećanje je bilo između 0,26 – 0,31 CFU/g, dok su za uzorke peptidaza sa dodatkom nejonskih surfaktanata Tween 20, Tween 80 i Triton X-100 povećanja su bila između 0,24 – 0,33 CFU/g, 0,26 – 0,34 CFU/g i 0,18 – 0,36 CFU/g respektivno. U Tabeli 5.5. prikazane su *p* vrednosti za pobrojanih bakterija za odgovarajuće formulacije papaina i peptidaza lateksa smokve.



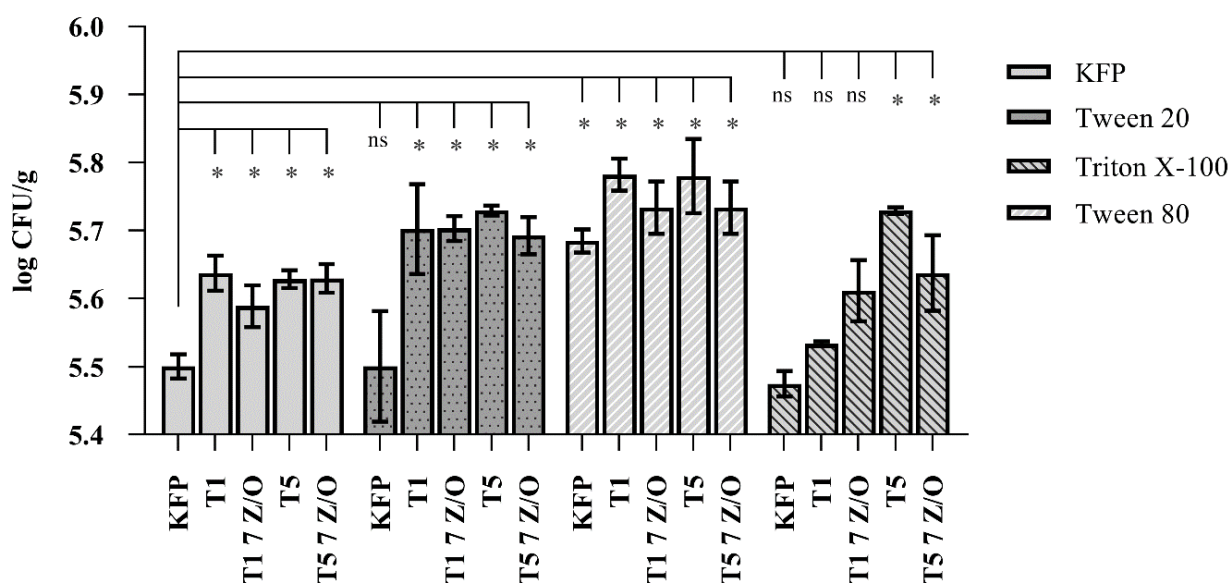
Slika 5.12. Uticaj papaina (P1 – 0,01 mg/mL; P5 – 0,05 mg/mL) ili peptidaza lateksa smokve (PLS1 – 0,01 mg/mL; PLS5 – 0,05 mg/mL) u kalijum-fosfatnom puferu (KFP) sa nejonskim surfaktantima, pri detekciji bakterija *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u uzorcima fermentisanih proizvoda od mesa. CFU/g - jedinica formirajućih kolonija po gramu, ns - nije značajno, \*, \*\* i \*\*\* - značajna razlika između uzoraka ( $p < 0,05$ , 0,01 i 0,001 respektivno).



**Tabela 5.5. p vrednosti pobrojanih bakterija *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u uzorcima mesnih proizvoda u zavisnosti od korišćenih peptidaza i nejonskih surfaktanata (vrednosti za koncentraciju peptidaza izražene su u mg/mL).**

	Pufer	Papain		Lateks smokve	
		0.01	0.05	0.01	0.05
Pufer	/	0.00108	0.00267	0.00377	0.00086
Tween 20	0.08677	0.04605	0.00902	0.00098	0.00065
Triton X-100	0.30672	0.04832	0.04488	0.04525	0.00023

Korišćenjem tripsina u kalijum-fosfatnom puferu došlo je do više od 25% povećanja broja jedinica koje formiraju kolonije (CFU) za obe korišćene koncentracije (0,01 i 0,05 mg/mL), bez značajnog gubitka aktivnosti nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Dodatak nejonskih surfaktanata kalijum-fosfatnom puferu nije doveo do značajnih promena CFU osim u slučaju Tween-a 80 kod koga je CFU povećan za 34 %. U formulacijama sa tripsinom, nejonski surfaktanti Tween 20 i 80 su doveli do povećanja od 35 do 40 %, dok se takav trend kod Tritona X-100 može primetiti samo u formulaciji u kojoj je se tripsin nalazi u koncentraciji od 5 mg/mL (Slika 5.13.).



**Slika 5.13. Uticaj rastvora tripsina (T1 – 0,01 mg/mL; T5 – 0,05 mg/mL) u kalijum-fosfatnom puferu (KFP) sa nejonskim surfaktantima, korišćenih pre (T1; T5) ili nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (T1 7 Z/O; T5 7 Z/O), pri detekciji bakterije *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u uzorcima fermentisanih kobasica. CFU/g - jedinice koje formiraju kolonije po gramu, ns - nije značajno, \* - značajna razlika između uzoraka (p<0,05).**

## 6. DISKUSIJA

Imajući u vidu da je tripsin stabilan na svojoj radnoj pH vrednosti, kao i prilikom denaturacije na niskim temperaturama [8], određeni su najbolji kandidati puferских sistema za zamrzavanje tripsina. Fosfatni i bikarbonatni puferски sistemi su izabrani za testiranje uticaja zamrzavanja/odmrzavanja na tripsin koji je stabilan u blago alkalnim uslovima, kako i fosfatni i bikarbonatni anjoni imaju kosmotropski stabilizujući efekat na proteine [312]. Preostala aktivnost tripsina zamrzanog i odmrzanog u 100 mM fosfatnim i bikarbonatnim puferima na pH 8,0 određivana je sa BAPNA kao supstratom, a rezultati su prikazani na *Slici 5.1*.

Poređenjem efekta anjona na oporavak aktivnosti tripsina nakon sedam ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja može se primetiti da bikarbonatni anjoni imaju blago stabilizujući efekat za razliku od anjona fosfata sa katjonima natrijuma ( $p$ -vrednost  $< 0,05$ ). Uočeni efekat anjona bikarbonata u poređenje sa fosfatnim anjonima je u saglasnosti sa *Hofmeister*-ovom serijom samo u slučaju natrijumovih soli [114], [313].

Stabilizujući efekat katjona je u skladu sa *Hofmeister*-ovom serijom [312] u fosfatnim puferima (*Slika 5.1.A*), dok takav efekat nije izražen u bikarbonatnim puferima (*Slika 5.1.B*). Međutim, gubitak aktivnosti tripsina koji je zamrzavan/odmrzavan u natrijum-fosfatnom puferu, ima efekat na zadržanje aktivnosti koje je suprotno *Hofmeister*-ovom efektu, pošto je primećeno pomeranje pH sa 8,0 na 4,9 tokom zamrzavanja. Ovo ukazuje da je za gubitak aktivnosti od oko 70% odgovorna promena pH vrednosti pre nego hidratacija katjona u natrijum-fosfatnom sistemu. Pikal-Cleland et al. [137], [314] su to otkrili da zamrzavanje natrijum-fosfatnog pufera dovodi do smanjenja pH vrednosti od 3 pH jedinice zbog selektivnog taloženja dinatrijum-fosfata. Gomez et al. [315] su pokazali da taloženje dinatrijuma-fosfata izazva naglo smanjenje pH vrednosti (od 2,2 - 3,2 pH jedinice) nakon početka kristalizacije leda, na temperaturama između 0,5°C i 4,0°C. Promena pH vrednosti u zavisnosti od koncentracije natrijum-fosfatnog pufera u opsegu 8 - 100 mM, koja je takođe ranije primećena [315], ukazuje da je potrebno istražiti efekat molarnosti pufera na očuvanje aktivnosti tripsina.

Natrijum-fosfatni (visoka promena pH vrednosti), amonijum-bikarbonatni (umerena promena pH vrednosti) i kalijum-fosfatni puferi (skromna promena pH vrednosti) [316] izabrani su za istraživanje uticaja molarnosti pufera na očuvanje aktivnosti tripsina. Ovaj efekat testiran je ponavljanjem ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja u prisustvu 10, 50 i 100 mM pufera na pH 8,0. Rezidualna aktivnost svih uzoraka određivana je korišćenjem BAPNA kao supstrata (*Slika 5.2*).

U kalijum-fosfatnim puferima uticaj molarnosti na aktivnost tripsina nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja nije bio izražen (90%; *Slika 5.2.A*), dok je u 100 mM i 10 mM amonijum-bikarbonatnom puferu bila niža u odnosu na početnu aktivnost (82% i 70%, respektivno; *Slika 5.2.B*), bez značajnije statističke razlike ( $p > 0,05$ ).

S druge strane, primećen je gubitak preostale aktivnosti tripsina kod natrijum-fosfatnih puferских sistema na pH 8,0 sa značajnijom statističkom razlikom ( $p < 0,05$ ; *Slika 5.2.C*). Prethodno je ukazano da skladištenje tripsina u 1 mM HCl, prema preporuci proizvođača, izaziva gubitak 2/3 aktivnosti nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja kao posledicu denaturacije proteina na niskim temperaturama [8]. Imajući u vidu smanjenje pH vrednosti u natrijumu-fosfatnom puferu tokom

zamrzavanja, bilo je potrebno proveriti da li je nizak pH kao dodatni stres dovodi do strukturnih promena u tripsinu pri denaturaciji na niskim temperaturama i mogućnosti agregacije polipeptidida.

Da bi se isključio mogući mehanizam adsorpcije proteina na istaložene soli, koncentracija rastvornog proteina merena je u supernatantima i nisu detektovane značajne promene (*Slika 5.2.D*).

Za objašnjenje gubitka aktivnosti tripsina usled njegove destabilizacije zamrzavanjem/odmrzavanjem u 100 mM natrijum-fosfatnom puferu na pH 8,0, primenjena je infracrvena spektroskopija sa *Furier*-ovom transformacijom (FTIR).

Analiza FTIR spektra u amidom I regionu, standardna je metoda za određivanje promena u sekundarnim strukturama proteina. Amidni I region, u opsegu frekvencija 1600 - 1700  $\text{cm}^{-1}$ , proizilazi iz C=O vibracionih istezanja peptidne veze i kao takav je region IR spektra koji najviše zavisi od konformacije proteina i koji se koristi za određivanje perturbacija sekundarne strukture proteina. Pokazano je da je amidni I region takođe efikasan za opisivanje strukturnih promena proteina koji su čuvani na hladno [8], [317].

Najistaknutije promene u sekundarnoj strukturi izazvane zamrzavanjem/odmrzavanjem dovode do povećane apsorpcije na frekvencijama 1695  $\text{cm}^{-1}$  i 1684  $\text{cm}^{-1}$  i mogu se pripisati kako  $\beta$ -pločicama specifičnim za agregaciju [318], tako i  $\beta$ -pločicama uopšte (*Slika 5.3*). Promene u ovim strukturama su takođe praćene smanjenjem apsorpcije u oblasti 1651  $\text{cm}^{-1}$  do 1637  $\text{cm}^{-1}$  i pripisane su neuređenim strukturama [8]. Spektralne razlike sugerisu da su neke native sekundarne strukture sklone agregaciji nakon zamrzavanja/odmrzavanja što je u skladu sa već primećenim promenama, uključujući gubitak  $\alpha$ -helikoidnih i neuređenih struktura u korist povećanja  $\beta$ -pločica [8], [317], [319]. Međutim, kako gubitak  $\alpha$ -heliksa nije primećen, masovno agregiranje proteina usled denaturacije se može isključiti. Sve uočene promene bile su skromne i indikativne za pH-indukovanu destabilizaciju nativnog tripsina.

Kako bi se uporedile sličnosti sekundarne strukture tripsina pre i nakon ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja u 100 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 8,0 upoređeni su koeficijenti korelacije drugog izvoda spektara. Promene u spektralnoj korelaciji zavisno od ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (*Slika 5.4.A*) pokazale su prisustvo intermedijernog stanja između ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja 3 i 6, što je u skladu sa nižim gubitkom aktivnosti koji je primećen nakon ciklusa 3 (*Slika 5.1.A*). Stopljena globula kao intermedijerno stanje pri denaturaciji proteina se obično formira na niskim pH vrednostima, i poseduje sličnost sa nativnom strukturom u pogledu zastupljenosti sekundarnih struktura i smanjenom aktivnošću u slučaju papaina [318].

Za detaljniju analizu prirode intermedijernog stanja, analizirana je izloženost ostataka triptofana rastvaraču fluorescentnom spektroskopijom. Kako su ostaci triptofana raspoređeni u celom molekulu, promena njihove fluorescencije može ukazati na globalne promene u strukturi tripsina nakon destabilizacije [320]. Intenzitet fluorescencije je blago smanjen nakon zamrzavanja/odmrzavanja, a maksimum emisije je batohromno pomeren, što sugerise da indolni prstenovi ostataka triptofana nisu potpuno izloženi rastvaraču. Isti trend je primećen za tripsin destabilizovan ureom na pH 2,8 [320]. Izračunati centar spektralne mase (*Slika 5.4.B*) menja se tokom ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja u istom trendu kao i koeficijenti spektralne korelacije IR spektara (*Slika 5.4.A*).

Daljom detaljnijom analizom FTIR spektra, istražena je izloženost ostataka tirozina rastvaraču praćenjem promena trake na 1517  $\text{cm}^{-1}$  koja se može pripisati vibracijama tirozinskog prstena. Pomeranje tirozinske trake ka nižim frekvencijama i povećana apsorpcija nakon

zamrzavanja/odmrzavanja sugeriraju da je tirozinski prsten postao izložen rastvaraču u zamrzavanjem izazvanom intermedijernom stanju (*Slika 5.4.C*). Sličan trend u izloženosti tirozina primećen je u slučaju toplotno denaturisanog mioglobina [321]. Takođe, povećanje hidrofobnosti površine intermedijernog stanja je detektovano povećanjem fluorescencije ANS-a u trećem ciklusu zamrzavanja/odmrzavanja koji ukazuje na prisustvo stopljene globule (*Slika 5.4.D*). Uočeno smanjenje fluorescencije ANS-a u ciklusima 6 - 7 može ukazivati na međumolekulsku asocijaciju koja je praćena smanjenom hidrofobnom izloženošću, što dovodi do formiranja agregata stopljenih globula. Međutim, agregacija je skromna, pošto je promena koncentracije rastvornih proteina niska (*Slika 5.2.D*).

Stopljena globula je primećena u slučaju denaturacije tripsina korišćenjem kombinacije uree, sniženog pH i povišenog pritiska. Prethodno je pokazano [320], [322] da pri denaturaciji ureom na pH 2,8 - 3,0,  $\beta$ -tripsin prolazi kroz tri intermedijerna stanja. Takođe, Ruan et al. [310], [323] pokazali su prisustvo intermedijera stopljene globule u denaturaciji tripsina pod uslovima povećanog pritiska pri kiselim i neutralnim pH vrednostima.

Prema rezultatima sažetim na *Slikama 5.1 – 5.4.*, zbog promene kiselosti u natrijum-fosfatnom puferkom sistemu na niskim temperaturama, pretpostavljeno je intermedijerno stanje stopljene globule tripsina usled destabilizacije izazvane zamrzavanjem. Ponavljani ciklusi zamrzavanja/odmrzavanja favorizuju ovo stanje sa povećanom površinskom hidrofobnošću kao i izloženošću tirozinskih i triptofanskih hidrofobnih prstenova rastvaraču. Ove strukturne perturbacije uzrokovale su da je polipeptidni lanac sklon formiranju  $\beta$ -pločica specifičnih za agregaciju i naknadnu denaturaciju na niskim temperaturama i agregaciju. Međutim, nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, može se primetiti samo skromna agregacija slično kao što je primećeno za tripsin čuvan na hladno u 1 mM HCl [8]. Kako umerene deformacije u geometriji aktivnog mesta mogu dovesti do smanjenja ili do potpunog nestanka enzimske aktivnosti [318], [324], prisustvo stopljene globule može objasniti značajan gubitak aktivnosti uočen u natrijum-fosfatnim puferima (*Slika 5.1.*). Gubitak aktivnosti nije primećen u prisustvu kalijum ili amonijum katjona, što dovodi do zaključka da natrijum-fosfatne pufere treba izbegavati u slučaju skladištenja proteina na niskim temperaturama.

Surfaktanti se prilikom upotrebe peptidaza koriste za razne primene, ali i dalje postoji potreba da se istraže mogući pozitivni ili negativni efekti na stabilnost tripsina prilikom zamrzavanja/odmrzavanja u njihovom prisustvu. U literaturi su surfaktanti predloženi kao stabilizatori denaturacije proteina [149], [194]. Štaviše, vezivanje surfaktanata može maskirati hidrofobne regione na površini proteina, sprečavajući agregaciju. Međutim, problem je kontroverzan jer surfaktanti, kao blagi deterdženti, mogu biti dodatni stresori za nativnu strukturu proteina koja je već destabilizovana procesima zamrzavanja/odmrzavanja. Kao supstrat za testiranje oporavka aktivnosti tripsina nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja korišćena je BAPNA u KFP i AmBP puferkim sistemima sa dodatkom nejonskih surfaktanata (*Slika 5.5.*). Prisustvo Tween-a 20 i Tween-a 80 vodilo je očuvanju aktivnosti enzima nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja i to  $99,2 \pm 3,8$  % i  $88,7 \pm 5,3$  % u KFP i  $94,1 \pm 1,8$  % i  $98,9 \pm 2,9$  % u AmBP, respektivno.

Zanimljivo je da je u prisustvu Triton-a X-100, aktivnost bila skromnih  $63,64 \pm 9,0$  % u NFP i  $56,3 \pm 5,2$  % u AmBP nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja ( $p < 0,05$  samo sa puferom). Kako su se AmBP i NFP pokazali kao uporedivi u održanju tripsinske aktivnosti (*Slika 5.5.*), i imajući u vidu da

se fosfatni puferi češće koriste u laboratorijama u kojima se rukuje sa biohemijskim uzorcima, nastavljeno je praćenje efekata surfaktanata na strukturne promene proteina i aktivnost u KFP.

FTIR spektri su snimljeni za uzorke tripsina koji su zamrzavani/odmrzavani u 100 mM NFP na pH 8,0 u prisustvu 0,1% Tween 20, Tween 80 i Triton X-100 kako bi se dobio uvid u efekte nejonskih surfaktanata na strukturnom nivou.

Drugi izvod (*Slika 5.6.A*) i originalni amidni I region FTIR spektara u KFP nisu pokazali značajne perturbacije u sekundarnoj strukturi tripsina koje bi mogle biti izazvane zamrzavanjem u odsustvu surfaktanata jer je koeficijent korelacije oko 0,9. FTIR spektri su pokazali da su dodavanjem 0,1% Tween 20 ili Tween 80 izazvane skromne intramolekulske promene u tripsinu što je takođe u skladu sa vrednostima koeficijenata spektralnih korelacija od oko 0,8 (*Slika 5.6.*). U slučaju Tween-a 20, najprominentnije promene nakon odmrzavanja bile su: hipohromno pomeranje traka na  $1650\text{ cm}^{-1}$ , pripisano neuređenim strukturama, i blago hiperhromno pomeranje trake  $\beta$ -pločice (*Slika 5.6.B*). U slučaju Tween-a 80, došlo je do fokusiranja trake na  $1655\text{ cm}^{-1}$  i to se može pripisati  $\alpha$ -heliksu, sa minimumom koji je pomeren ka nižoj frekvenciji ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ). Traka pripisana neuređenim strukturama pojavila se na  $1662\text{ cm}^{-1}$ , dok trake koje doprinose neuređenim strukturama u regionu  $1651 - 1637\text{ cm}^{-1}$  pokazuju blago batohromno pomeranje od oko  $1\text{ cm}^{-1}$  (*Slika 5.6.C*). Uprkos skromnim perturbacijama sekundarnih struktura tripsina, sudeći prema ukupnoj spektralnoj korelaciji, nejonski surfaktanti Tween 20/Tween 80 mogu se smatrati efikasnim isto kao i najčešće korišćeni krioprotektanti (kao što je glicerol) u zaštiti od stresora povezanih sa zamrzavanjem/odmrzavanjem tripsina. U slučaju glicerola, vrednost koeficijenta spektralne korelacije za tripsin nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja bila je 0,7452 [8].

Sa druge strane, Amidni I region promenio se u slučaju 0,1% Triton X-100 u PPB nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, što ogleda u promeni apsorpcije na frekvencijama oko  $1645 - 1670\text{ cm}^{-1}$  (Sl. S8). Pošto se i  $\alpha$ -heliks i trake koje pripadaju neuređenim strukturama preklapaju i doprinose spektralnim karakteristikama, analiza drugog izvoda spektara (*Slika 5.6.D*) pruža bolji uvid u strukturne promene. Pokazalo se da je ukupno očuvanje svih karakterističnih minimuma za  $\beta$ -pločice (oblasti  $1689 - 1673$  i  $1637 - 1620\text{ cm}^{-1}$ ). Primetno je umereno pomeranje svih traka u ovom regionu, ali su karakteristične trake prisutne, sa izuzetkom minimuma na  $1637\text{ cm}^{-1}$  koji je smanjen za uzorak koji je zamrzavan/odmrzavan. Najistaknutija razlika između spektara snimljenih sa Triton-om X-100 je nestanak traka  $\alpha$ -heliksa na  $1656\text{ cm}^{-1}$  i pojava dodatne trake na  $1661\text{ cm}^{-1}$  koja se može pripisati neuređenim strukturama. Takođe, trake u regionu  $1651 - 1637\text{ cm}^{-1}$ , koje doprinose neuređenim strukturama pokazale su promene u položaju i intenzitetu.

Ukupan koeficijent spektralne korelacije bio je oko 0,55 (Sl. 5.6.D), što ukazuje da je Triton X-100 doprineo destabilizaciji uvijenog stanja tripsina tokom zamrzavanja/odmrzavanja. Uprkos tome što se može smatrati da nema uticaja na strukturu tripsina, slično Tween-u 80 [325], pokazalo se da je Triton X-100 je snažniji denaturant od Tween 20/Tween 80 u primenjenim uslovima, a samim tim bi mogao dovesti do masovnije destabilizacije  $\alpha$ -helikoidnih struktura tripsina tokom zamrzavanja/odmrzavanja. Pokazano je da peptidaze mogu biti kinetički otporne na potpunu denaturaciju u prisustvu detergenata [235], ali očigledno, neka strukturna preuređivanja su se dogodila u slučaju tripsina što bi moglo objasniti delimični gubitak aktivnosti u prisustvu Tritona X-100 (*Slika 5.5.*).

Smatra se da su peptidaze otporne na denaturaciju indukovanu prisustvom nejonskih surfaktanata. Ali, kako IR spektri sugerišu da dolazi do blagih strukturnih promena u uzorcima tripsina koji su bili

zamrzavani/odmrzavani, posebno u slučaju Triton X-100, bilo je potrebno testirati da li surfaktanti takođe mogu da izazovu povećanje autolize tripsina.

Rezultati predstavljeni na *Slici 5.7.* pokazali su da nema značajnije autolize tripsina nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, bez obzira na prisustvo surfaktanta, što pokazuje da su glavni uzroci gubitka aktivnosti bile konformacione promene samog tripsina.

Pristupačnost proteinskih supstrata digestiji tripsinom u prisustvu surfaktanata, testirana je prema BSA kao proteinskom modelu supstrata i prema BAPNA kao sintetičkom supstratu niske molekulske težine (*Slika 5.8.*).

Dok Tween 20 i Tween 80 nisu uticali na relativnu apsorpciju rastvornih peptida iz BSA digestovanog tripsinom, u uzorku sa Triton X-100 koji nije zamrzavan/odmrzavan, povećana je relativna apsorpcija za  $209,1 \pm 8,6$  % u poređenju sa uzorkom u puferu bez aditiva (*Slika 5.8.A*). Nedostatak promene u aktivnosti prema BAPNA supstratu (*Slika 5.8.B*) može ukazati da je mehanizam liziranja BSA tripsinom podpomognut Triton-om X-100 putem destabilizacije strukture proteina BSA [326], što ga čini dostupnijim enzimu i lakše digestibilnijim. Uočeno smanjenje relativne apsorpcije rastvornih peptida iz BSA digestovanog tripsinom i aktivnosti prema BAPNA u prisustvu Tritona X-100 nakon 7 ciklusa zamrzavanja može se objasniti strukturnim promenama tripsina zbog prisustva Tritona X-100 tokom što se može videti i u prethodnoj analizi FTIR spektara (*Slika 5.6.D*).

Kao što je prikazano u *Tabeli 5.1.* i *Slici 5.9.*, papain pokazuje kazeinoličku i želatinoličku aktivnost koja je gotovo nepostojeća u prisustvu specifičnog inhibitora cistein peptidaza IAA. S druge strane, peptidaze lateksa smokve ispoljavaju nešto veću specifičnu aktivnost prema opštem proteolitičkom supstratu kazeinu nego papain, verovatno zbog prisustva ficinskih izoformi različitih specifičnosti koje doprinose ukupnoj aktivnosti. Kazeinolička aktivnost je gotovo nepostojeća u prisustvu specifičnog inhibitora cistein peptidaze IAA što ukazuje da su u smeši ficina samo cistein peptidaze imale opštu proteolitičku aktivnost. Takođe, lateks smokve je pokazao dvostruko veću želatinoličku aktivnost u poređenju sa papainom, a samo oko 40% aktivnosti je smanjeno prisustvom inhibitora cistein peptidaza što nagoveštava prisustvo kolagenoličkih serin peptidaza u lateksu smokve.

I kolagenolička i želatinolička aktivnost bile su veće za oko 10% u prisustvu EDTA, zbog eliminacije tragova metala koji mogu inhibirati enzime [261]. Ipak, želatinolička aktivnost je u prisustvu IAA bila smanjena što implicira da cisteinske peptidaze doprinose i hidrolizi želatina. Ovaj zaključak potkrepljuju i nedavno objavljeni podaci Nišimure i koautora koji su pokazali da cistein peptidaze - ficini, i serin peptidaze - kolagenaze lateksa smokve sinergistički doprinose digestiji želatina i kolagena [327].

Kako su ficini dominantni proteini lateksa smokve prisutni u složenoj mešavini izoformi sa istom molekulskom masom, njihove trake na 2D elektroforezi, koja je prikazana na *Slici 5.10.A*, nisu diskretne, već raširene u celom opsegu izoelektričnih tačaka od 5 do 9 što je u skladu sa prijavljenim frakcionisanjem izoformi ficina korišćenjem jonoizmenjivačke hromatografije [249], i transkriptomskom analizom [328]. Neinhibirani uzorci lateksa smokve (*Slika 5.10.B*) pokazuju prisustvo raznovrsnih proteina koji imaju želatinoličku aktivnost. Na osnovu mobilnosti u 2D elektroforezi (*Slika 2A*), može se pretpostaviti da ovi proteini predstavljaju različite izoforme ficina koje karakteriše širok raspon pI vrednosti. Međutim, nakon inhibicije cisteinskih peptidaza sa IAA (*Slika 2C*), aktivnost je izražena samo na pI oko 5 i može se pripisati serinskoj peptidazi odnosno

kolagenazi [261]. U prisustvu inhibitora serin i cistein peptidaza PMSF, došlo je do gubitka želatinolitičke aktivnosti, što ukazuje da samo serinske i cisteinske peptidaze doprinose aktivnosti (*Slika 2D*).

Iako su želatinolitička aktivnost papaina i peptidaza lateksa smokve, koji sadrže ficine i kolagenazu, testirane u enzimskim preparatima, takođe je testirana i kolagenolitička aktivnost koja zahteva pristup strukturi kolagena. Mnoge peptidaze mogu da katalizuju hidrolizu polipeptidne kičme globularne glave kolagena, ali samo prava kolagenaza može katalizovati hidrolizu polipeptidne kičme kolagena unutar trostrukog heliksa [329] i potencijalno učestvovati u remodelovanju vezivnog tkiva. Upravo se na osnovu složenosti kolagenskih struktura, i njihove strukturne analize, može dobiti uvid u efekat različitih peptidaza na mrežu kolagenskih vlakana prisutnih u tkivima pri čemu se iz hidrolitičke aktivnosti takva kvantifikacija vrlo teško može izvesti. Da bi se istražila kolagenolitička aktivnost smeše papaina i peptidaza lateksa smokve, korišćen je FTIR kako bi se proverilo da li ima bilo kakvih perturbacija u sekundarnoj strukturi kolagena nakon tretmana enzimima.

U spektru nativnog kolagena tipa I, mogu se uočiti odgovarajuće trake koje potiču od peptida [330]. U spektrima uzoraka inkubiranih u PBS-u, intenzivne FTIR trake na frekvencijama nižim od  $1100\text{ cm}^{-1}$  dodeljene su asimetričnim i simetričnim istežajućim vibracijama fosfata koji su prisutni u puferu [331]. U spektru kolagena koji je tretiran papainom, intenziteti specifičnih Amidnih I–III traka bili su nešto niži što ukazuje na delimičnu hidrolizu peptidnih veza u kolagena. Međutim, u slučaju uzorka kolagena tretiranog peptidazama lateksa smokve, Amidne trake I–III su bile gotovo nepostojeće (*Slika 5.11.*).

U FTIR spektroskopiji, za analizu sekundarne strukture proteina, uglavnom se koristi spektralni region Amid I trake, koji se gotovo u potpunosti pripisuje istežajućim vibracijama C=O iz peptidnih veza. Analiza Amidnih traka II i III, koje nastaju usled N–H savijajućih i C–N istežajućih vibracija [307], [317], složenija je od analize Amidne I trake. Ipak, odnos intenziteta Amidne III trake i trake na  $1450\text{ cm}^{-1}$ , može ukazati na sadržaj trostrukog heliksa kolagena [330]. Procena sadržaja trostrukog heliksa kolagena iz ovog odnosa i analiza sekundarne strukture na osnovu Amidnog I regiona, predstavljaju relativnu zastupljenost sekundarnih struktura u kontrolnim uzorcima kolagena i uzorcima kolagena koji su tretirani ili papainom ili peptidazama lateksa smokve (*Tabela 5.2.*).

Sadržaji sekundarnih struktura kolagena su bili slični onima koje su prijavljeni za kolagen tipa I [308]. Tretiranje nativnog kolagena papainom dovodi do skromnog gubitka trostrukog heliksa, zajedno sa gubitkom  $\alpha$ -helikoidnih i neuređenih struktura. Rezultati su u skladu sa rezultatima o potencijalnoj upotrebi papaina za ekstrakciju želatina, koji se ogledaju u visokim prinosima ekstrahovanog želatina sa skromnim gubitkom trostrukog heliksa [332].

Tretman kolagena peptidazama lateksa smokve doveo je do gotovo potpunog gubitka trostrukog heliksa i  $\alpha$ -helikoidnih struktura. Imajući u vidu sličnosti u supstratnoj specifičnosti papaina i ficina prema globularnim regionima proteinima, ovi rezultati ukazuju da bi kolagenaze lateksa smokve mogle biti glavni faktor koji doprinosi gubitku trostrukog heliksa u molekulu kolagena. Prethodna istraživanja pokazala su da je odnos intenziteta  $A^{1235}/A^{1450} \sim 1$  u slučaju nativnog kolagena, dok je kod želatina (denaturisanog kolagena) ovaj odnos 0,59, što ukazuje na delimični gubitak trostrukog heliksa [330]. Kontrola kolagena korišćena u ovoj studiji imala je strukturu trostrukog heliksa, dok je digestija peptidazama lateksa smokve dovela do izraženijeg gubitka strukture u poređenju sa termičkom denaturacijom (npr. želatin). Rezultati predstavljeni u *Tabeli 5.2.* pokazuju da kolagenaze

lateksa smokve mogu lizirati trostruki heliks kolagena i samim tim se mogu smatrati pravim kolagenazama.

Pošto potencijalna upotreba enzima za bilo koju primenu zahteva visoku stabilnost u reakcionim uslovima, prvo je potrebno ispitati efekte nejonskih surfaktanata na peptidaze. Potencijalna primena enzima za olakšanu razgradnju kompleksnih struktura mesnih proizvoda u prisustvu hidrolaza peptidaza za detekciju *Listeria monocytogenes* zahteva upotrebu detergenata koji će obezbediti pristup enzima supstratu. Kako je poznato da detergenti utiču na strukturu proteina, potrebno je testirati da li njihove koncentracije, koje su potrebne za razgradnju proizvoda od mesa, uzrokuju promene u strukturi enzima papaina i strukturama peptidaza lateksa smokve.

FT-IR spektroskopijom proteina papaina i peptidaza lateksa smokve u prisustvu detergenata Tween 20 i Triton X-100, analizirana je njihova sekundarna strukturira dekonvolucijom Amidnog I regiona, a rezultati su predstavljeni u *Tabeli 5.3*.

Utvrđeni sadržaj sekundarnih struktura ukazuje da nema značajnijih strukturnih promena papaina ili peptidaza lateksa smokve koje su indukovane prisustvom nejonskih surfaktanata (*Tabela 5.3.*) što implicira da su enzimi stabilni u njihovom prisustvu. Ovaj zaključak je potkrepljen visokim koeficijentom spektralne korelacije od oko 0,75 – 0,88 (*Tabela 5.4.*) i ukupnom sličnošću drugih izvoda spektara (dodatak *Slika 1*). Rezultat nije iznenađujuć imajući u vidu da papain otporan na denaturaciju izazvanu jonskim detergentima na temperaturama nižim od 60°C [317]. Ovi rezultati sugerišu da je korišćenje enzima u kombinaciji sa ovim detergentima pogodno za dalju analizu.

Reproducibilnost je jedno od najvažnijih karakteristika pri izboru metoda za detekciju bakterija iz prehrambenih proizvoda u cilju određivanja broja ćelija.

Istorijski gledano, peptidaze su korišćene u smeši sa nejonskim surfaktantima, u prilično visokim koncentracijama pri razgradnji tkiva i detekciji patogenih bakterija u uzorcima hrane [10], [11], [290]–[292], [298]–[301], [333], [334].

Danas se izbegava dodavanje proteolitičkih enzima i surfaktanata zbog njihovog potencijalno lošeg uticaja u visokim koncentracijama na održivost bakterijskih ćelija. Međutim, nedavno je ukazano da je upotreba tripsina i alkalnih peptidaza u PCR detekciji *Salmonella enterica*, preferencijalna [298].

U poređenju sa ranijim metodama, zbog široke supstratne specifičnosti papaina i peptidaza lateksa smokve, primenjene su sto puta niže koncentracije peptidaza za olakšavanje razgradnje tkiva proizvoda od mesa i oslobađanje ćelija bakterija, u cilju poboljšanja detekcije *L. monocytogenes*. Kako proteolitička aktivnost komercijalnih peptidaza može značajno da varira u preparatima različitih proizvođača i predstavlja se kao specifična aktivnost prema najčešćim supstratima, ovde je predstavljena prema specifičnoj aktivnosti (*Tabela 5.1.*), a ne po količini korišćenog komercijalnog proizvoda, radi postizanja uporedivih rezultata i bolje reproducibilnosti same metode.

Analiza kontrolnih uzoraka mesnih proizvoda nije pokazala prisustvo *L. monocytogenes*. Rezultati prikazani na *Slici 5.13.* impliciraju da su i papain i peptidaze lateksa smokve dovele do poboljšanja detekcije *L. monocytogenes* u kontaminiranim uzorcima. Statistička značajnost razlika između uzoraka koji su tretirani prema preporučenim uslovima bez peptidaza [289], [335] i uzoraka tretiranih sa enzimima otkriveni su u svim slučajevima. Ipak, najveći broj *L. monocytogenes* detektovan je u uzorcima tretiranim sa peptidazama lateksa smokve. Ovi rezultati su visoki verovatno zbog doprinosa



kolagenolitičke aktivnosti, imajući u vidu da ficini i papain imaju sličnu supstratnu specifičnost prema globularnim regionima proteina [336], [337].

Ekstrakcija mikroorganizama iz prehrambenih proizvoda koji su čvrstog agregatnog stanja zavisi od homogenizacije, pre svega *stomacher* metodom. Međutim, ova metoda bila je samo delimično uspešna, zbog složenih fizičko-hemijskih karakteristika adhezija bakterija [11].

Dok je povećanje log CFU/g za papain bilo  $0,26 \pm 0,01$ , za koncentracije od 0,01 i 0,05 mg/mL, u odnosu na uzorak koji je sadržao samo pufer bez enzima, povećanja za lateks smokve bila su  $0,28 \pm 0,01$  i  $0,31 \pm 0,01$ , za koncentracije od 0,01 i 0,05 mg/mL, respektivno. Dodavanje surfaktanata nije uticalo na detekciju *L. monocytogenes* za uzorke tretirane puferom ili enzimima. Zanimljivo, najviše ukupno povećanje detekcije dao je uzorak koji je tretiran lateksom smokve u koncentraciji od 0,05 mg/mL u kombinaciji sa 0,01% (v/v) Triton X-100 za  $0,36 \pm 0,01$  u poređenju sa uzorkom koji je sadržao samo pufer.

Korišćenjem tripsina u kalijum-fosfatnom puferu došlo je do više od 25% povećanja broja ćelija koje formiraju kolonije (CFU) za obe korišćene koncentracije (0,01 i 0,05 mg/mL), bez značajnog gubitka aktivnosti nakon 7 ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja. Sinergistički efekat tripsina i Tween-a 20 doveo je do još izraženijeg povećanja CFU u svim uzorcima tripsina od 35 do 40 %, dok je taj efekat izražen samo u višoj koncentraciji tripsina (0,05 mg/mL) u slučaju Triton X-100 verovatno zbog strukturnih rearanžiranja tripsina koji dovode do gubitka aktivnosti.

Dodavanje Tween 20 i Triton X-100 kalijum-fosfatnom puferu nije uticalo na broj CFU, dok je Tween 80 povećao CFU za više od 34%. Tween 80, koji ima duži alifatični lanac od druga dva korišćena nejonska surfaktanta, pokazao je značajan efekat sličan detergentu u solubilizaciji proteinskog supstrata fermentisanih proizvoda od mesa, slično kao što je prikazano za denaturisane proteine belanaca [338]. Tween 80 omogućavajući solubilizaciju supstrata sinergistički sa peptidaznom aktivnošću tripsina, povećava broj kolonija gotovo dva puta u poređenju sa sistemom koji je trenutno u upotrebi.

U ovom eksperimentu korišćene su niske koncentracije tripsina i niske koncentracije surfaktanta (0,01-0,05 mg proteina po mL ili 0,1-0,5 mg komercijalnog praha po mL i 0,01%, respektivno), za razliku od prethodno preporučenih (50-200 mg komercijalnog praha po mL ili 0,5-2,5%) [10], [11]. Zbog potencijalnog toksičnog efekta visoke koncentracije enzima i surfaktanata prema bakterijskim ćelijama koje su centralne u postupku ispitivanja, dodavanje peptidolitičkih enzima i surfaktanata se danas izbegava. Međutim, u novijoj literaturi postoje izveštaji o povoljnoj upotrebi tripsina u detekciji *Candida albicans* [299] i *Salmonella enterica* [298]. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju da se korišćenjem peptidaza u manjim koncentracijama poboljšava osetljivost detekcije *L. monocytogenes*.

## 7. ZAKLJUČAK

### 1. Optimizacija sastava puferskog sistema sa nejonskim surfaktantima za peptidazne enzime u cilju očuvanja strukture i aktivnosti enzima tokom skladištenja i upotrebe enzima na niskim temperaturama.

Ovom studijom je ukazano na podobnost nejonskih surfaktanata za zaštitu proteina od denaturacije izazvane fenomenima povezanim sa niskim temperaturama. Sa dodatkom odgovarajućih krioprotektivnih aditiva i odgovarajućim izborom puferskih sistema, rastvori tripsina pankreasa govečeta su stabilni tokom više ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Ova studija, ukazuje da je tripsinski rastvor odgovarajuće formulacije vrlo praktičan za laboratorijska istraživanja, i predstavlja pogodan model sistem za proučavanje stabilnosti proteina na niskim temperaturama.

### 2. Karakterizacija strukturnih promena enzima, sa posebnim osvrtom na strukturu i aktivnost stopljene globule.

Fosfatni i bikarbonatni puferi na pH 8,0 pogodni su za zamrzavanje/odmrzavanje tripsina za razliku od natrijum-fosfatnog pufera. Smanjenje pH vrednosti u natrijum-fosfatnom puferu (zbog selektivnog taloženja pufera soli) tokom zamrzavanja/odmrzavanja destabilizuje tripsin i dovodi do pojave intermedijera stopljene globule. Nejonski surfaktanti, Tween 20 i Tween 80 blago su uticali na strukturu tripsina nakon zamrzavanja/odmrzavanja, dok je Triton X-100 indukovao strukturne promene i destabilizaciju  $\alpha$ -helikoidnih struktura.

Optimizacije sastava pufera (molarost, puferske soli, koncentracija surfaktanata) za očuvanje strukture i aktivnost tripsina tokom ponavljajućih ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja omogućava njegovo uspešnije čuvanje uz ponovljena odmrzavanja i njegovu primenu u niskim koncentracijama.

### 3. Optimizacija peptidaznih formulacija u pogledu katalitičke aktivnosti i supstratne specifičnosti prema prirodnim proteinima.

Sve odabrane model peptidaze pokazuju visoku aktivnost prema opštim peptidolitičkim supstratima i dok je aktivnost prema želatinu i kolagenu pokazana za papain i ficin/kolagenaze lateksa smokve. Zbog prisustva kolagenaza u lateksu smokve, ovaj preparat katalizuje hidrolizu kolagena i unutar trostrukog heliksa kolagena, što ga potencijalno čini pogodnim za višestruke primene povezane sa remodelovanjem matriksa vezivnog tkiva.

### 4. Povećanje osetljivosti detekcije patogena *Listeria monocytogenes* u mikrobiološkim testovima fermentisanih prehrambenih proizvoda usled primene optimizovanih enzimskih formulacija.

Tripsin, papain i lateks smokve omogućili su efikasnu detekciju *L. monocytogenes* u kontaminiranim uzorcima sa povećanjem osetljivosti. U sinergiji sa nejonskim surfaktantima, tretman homogenata fermentisanih mesnih proizvoda papainom i smešom peptidaza lateksa smokve, dobijenih konvencionalnom *stomacher* metodom, oslobađao je pričvršćene bakterije. Zbog prisustva kolagenaza u lateksu smokve, ove peptidaze imaju veći doprinos u oslobađanju mikroorganizma *Listeria monocytogenes* iz mesnih proizvoda. Obezbeđivanjem čistijeg, koncentrisanijeg preparata, ovde opisani metod će u velikoj meri povećati osetljivost konvencionalnih direktnih metoda detekcije i prebrojavanja *L. monocytogenes* u fermentisanim mesnim proizvodima kao i bližu procenu pravog broja živih patogena u uzorcima hrane.

## 8. LITERATURA

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, "The Shape and Structure of Proteins," 2002, Accessed: Apr. 22, 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26830/>
- [2] Y. Harano and M. Kinoshita, "Large gain in translational entropy of water is a major driving force in protein folding," *Chem Phys Lett*, vol. 399, no. 4–6, pp. 342–348, Dec. 2004, doi: 10.1016/J.CPLETT.2004.09.140.
- [3] F. Hofmeister, "Zur Lehre von der Wirkung der Salze - Zweite Mittheilung," *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, vol. 24, no. 4–5, pp. 247–260, 1888, doi: 10.1007/BF01918191/METRICS.
- [4] Y. Zhang and P. S. Cremer, "Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 10, no. 6, pp. 658–663, Dec. 2006, doi: 10.1016/J.CBPA.2006.09.020.
- [5] W. Kunz, P. Lo Nostro, and B. W. Ninham, "The present state of affairs with Hofmeister effects," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 9, no. 1–2, pp. 1–18, Aug. 2004, doi: 10.1016/J.COCIS.2004.05.004.
- [6] Y. Marcus, "Individual ionic surface tension increments in aqueous solutions," *Langmuir*, vol. 29, no. 9, pp. 2881–2888, Mar. 2013, doi: 10.1021/LA3041659/ASSET/IMAGES/LA-2012-041659\_M012.GIF.
- [7] K. Kosswig, "Surfactants," *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Jun. 2000, doi: 10.1002/14356007.A25\_747.
- [8] B. Rašković, S. Vatić, B. Anđelković, V. Blagojević, and N. Polović, "Optimizing storage conditions to prevent cold denaturation of trypsin for sequencing and to prolong its shelf life," *Biochem Eng J*, vol. 105, pp. 168–176, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.bej.2015.09.018.
- [9] L. Krielgaard *et al.*, "Effect of tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XIII," *J Pharm Sci*, vol. 87, no. 12, pp. 1593–1603, Dec. 1998, doi: 10.1021/JS980126I.
- [10] J. J. Sheridan, I. Walls, and P. N. Levett, "Development of a Rapid Method for Enumeration of Bacteria in Pork Mince," *Irish Journal of Food Science and Technology*, vol. 14, no. 1, pp. 1–15, 1990, [Online]. Available: [www.jstor.org/stable/25558199](http://www.jstor.org/stable/25558199)
- [11] U. M. Rodrigues-Szulc, G. Ventoura, B. M. Mackey, and M. J. Payne, "Rapid physicochemical detachment, separation and concentration of bacteria from beef surfaces," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 80, no. 6, pp. 673–681, 1996, doi: 10.1111/J.1365-2672.1996.TB03273.X.
- [12] C. B. ANFINSEN, E. HABER, M. SELA, and F. H. WHITE, "The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 47, no. 9, pp. 1309–1314, Sep. 1961, doi: 10.1073/PNAS.47.9.1309/ASSET/D9AA8804-3797-4BF3-8045-576A3ACD0DE7/ASSETS/PNAS.47.9.1309.FP.PNG.
- [13] C. Levinthal, "Are there pathways for protein folding?," *Journal de Chimie Physique*, vol. 65, pp. 44–45, 1968, doi: 10.1051/JCP/1968650044.

- [14] R. Zwanzig, A. Szabo, and B. Bagchi, “Levinthal’s paradox,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, no. 1, pp. 20–22, Jan. 1992, doi: 10.1073/PNAS.89.1.20.
- [15] A. Ikai and C. Tanford, “Kinetic Evidence for Incorrectly Folded Intermediate States in the Refolding of Denatured Proteins,” *Nature* 1971 230:5289, vol. 230, no. 5289, pp. 100–102, 1971, doi: 10.1038/230100a0.
- [16] T. Y. Tsong, R. L. Baldwin, and E. L. Elson, “The sequential unfolding of ribonuclease A: detection of a fast initial phase in the kinetics of unfolding,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 68, no. 11, pp. 2712–2715, 1971, doi: 10.1073/PNAS.68.11.2712.
- [17] B. Cheng and S. X. Cui, “The Important Roles of Water in Protein Folding: an Approach by Single Molecule Force Spectroscopy,” *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*, vol. 36, no. 3, pp. 379–384, Mar. 2018, doi: 10.1007/S10118-018-2082-2/METRICS.
- [18] M. Kinoshita, “Roles of translational motion of water molecules in sustaining life,” *Frontiers in Bioscience-Landmark* 2009, 14(9), 3419-3454, vol. 14, no. 9, pp. 3419–3454, Jan. 2009, doi: 10.2741/3463.
- [19] P. M. Wiggins, “Hydrophobic hydration, hydrophobic forces and protein folding,” *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 238, no. 1–4, pp. 113–128, Apr. 1997, doi: 10.1016/S0378-4371(96)00431-1.
- [20] G. H. Zuo, J. Hu, and H. P. Fang, “Protein Folding under Mediation of Ordering Water: an Off-Lattice Gō-Like Model Study,” *Chinese Physics Letters*, vol. 24, no. 8, p. 2426, Aug. 2007, doi: 10.1088/0256-307X/24/8/074.
- [21] A. Fernández, “The principle of minimal epistemic distortion of the water matrix and its steering role in protein folding,” *J Chem Phys*, vol. 139, no. 8, p. 085101, Aug. 2013, doi: 10.1063/1.4818874.
- [22] A. Fernández, J. Kardos, and Y. Goto, “Protein folding: could hydrophobic collapse be coupled with hydrogen-bond formation?,” *FEBS Lett*, vol. 536, no. 1–3, pp. 187–192, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0014-5793(03)00056-5.
- [23] D. Voet and J. G. Voet, “Biochemistry, 4th Edition | Wiley,” *Wiley*, p. 1520, 2010, Accessed: Apr. 25, 2023. [Online]. Available: <https://www.wiley.com/en-us/Biochemistry%2C+4th+Edition-p-9780470570951>
- [24] B. G. Janković and N. Đ. Polović, “The protein folding problem,” *Biologia Serbica*, vol. 39, no. 1, Jul. 2017, doi: 10.5281/zenodo.827151.
- [25] R. B. Sessions, G. L. Thomas, and M. J. Parker, “Water as a Conformational Editor in Protein Folding,” *J Mol Biol*, vol. 343, no. 4, pp. 1125–1133, Oct. 2004, doi: 10.1016/J.JMB.2004.08.105.
- [26] S. B. Ozkan, G. A. Wu, J. D. Chodera, and K. A. Dill, “Protein folding by zipping and assembly,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 29, pp. 11987–11992, Jul. 2007, doi: 10.1073/PNAS.0703700104/SUPPL\_FILE/03700FIG5C.PDF.
- [27] S. Sen and H. P. Voorheis, “Protein folding: Understanding the role of water and the low Reynolds number environment as the peptide chain emerges from the ribosome and folds,” *J Theor Biol*, vol. 363, pp. 169–187, Dec. 2014, doi: 10.1016/J.JTBI.2014.07.025.

- [28] G. A. Papoian, J. Ulander, and P. G. Wolynes, “Role of water mediated interactions in protein-protein recognition landscapes,” *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 30, pp. 9170–9178, Jul. 2003, doi: 10.1021/JA034729U/SUPPL\_FILE/JA034729USI20030509\_093907.PDF.
- [29] G. A. Papoian, J. Ulander, M. P. Eastwood, Z. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes, “Water in protein structure prediction,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 10, pp. 3352–3357, Mar. 2004, doi: 10.1073/PNAS.0307851100.
- [30] W. Dzwolak and V. Smirnovas, “A conformational  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet transition accompanies racemic self-assembly of polylysine: an FT-IR spectroscopic study,” *Biophys Chem*, vol. 115, no. 1, pp. 49–54, May 2005, doi: 10.1016/J.BPC.2005.01.003.
- [31] A. K. Sieradzan, A. G. Lipska, and E. A. Lubecka, “Shielding effect in protein folding,” *J Mol Graph Model*, vol. 79, pp. 118–132, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.JMGM.2017.10.018.
- [32] O. I. Povarova, I. M. Kuznetsova, and K. K. Turoverov, “Different disturbances—one pathway of protein unfolding. Actin folding-unfolding and misfolding,” *Cell Biol Int*, vol. 31, no. 4, pp. 405–412, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.CELLBI.2007.01.025.
- [33] T. R. Jahn and S. E. Radford, “The Yin and Yang of protein folding,” *FEBS J*, vol. 272, no. 23, pp. 5962–5970, Dec. 2005, doi: 10.1111/J.1742-4658.2005.05021.X.
- [34] A. Rani and P. Venkatesu, “Changing relations between proteins and osmolytes: a choice of nature,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 20, no. 31, pp. 20315–20333, Aug. 2018, doi: 10.1039/C8CP02949K.
- [35] O. B. Ptitsyn, R. H. Pain, G. v. Semisotnov, E. Zerovnik, and O. I. Razgulyaev, “Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding,” *FEBS Lett*, vol. 262, no. 1, pp. 20–24, Mar. 1990, doi: 10.1016/0014-5793(90)80143-7.
- [36] A. L. Fink, K. A. Oberg, and S. Seshadri, “Discrete intermediates versus molten globule models for protein folding: characterization of partially folded intermediates of apomyoglobin,” *Fold Des*, vol. 3, no. 1, pp. 19–25, Feb. 1998, doi: 10.1016/S1359-0278(98)00005-4.
- [37] M. Oliveberg and A. R. Fersht, “Thermodynamics of transient conformations in the folding pathway of barnase: Reorganization of the folding intermediate at low pH,” *Biochemistry*, vol. 35, no. 8, pp. 2738–2749, Feb. 1996, doi: 10.1021/BI950967T/ASSET/IMAGES/LARGE/BI950967TF00012.JPEG.
- [38] V. N. Uversky and A. V. Finkelstein, “Life in Phases: Intra- and Inter- Molecular Phase Transitions in Protein Solutions,” *Biomolecules 2019, Vol. 9, Page 842*, vol. 9, no. 12, p. 842, Dec. 2019, doi: 10.3390/BIOM9120842.
- [39] S. S. Ray, S. K. Singh, and P. Balaram, “An electrospray ionization mass spectrometry investigation of 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate (ANS) binding to proteins,” *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 12, no. 4, pp. 428–438, 2001, doi: 10.1016/S1044-0305(01)00206-9.
- [40] V. N. Uversky, S. Winter, and G. Löber, “Use of fluorescence decay times of 8-ANS-protein complexes to study the conformational transitions in proteins which unfold through the molten globule state,” *Biophys Chem*, vol. 60, no. 3, pp. 79–88, Jun. 1996, doi: 10.1016/0301-4622(96)00009-9.

- [41] L. Shi, D. R. Palleros, and A. L. Fink, "Protein Conformational Changes Induced by 1,1'-Bis(4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid): Preferential Binding to the Molten Globule of DnaK," *Biochemistry*, vol. 33, no. 24, pp. 7536–7546, Jun. 1994, doi: 10.1021/BI00190A006/ASSET/BI00190A006.FP.PNG\_V03.
- [42] G. v. Semisotnov, N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas', and R. I. Gilmanshin, "Study of the 'molten globule' intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe," *Biopolymers*, vol. 31, no. 1, pp. 119–128, Jan. 1991, doi: 10.1002/BIP.360310111.
- [43] O. B. Ptitsyn, V. E. Bychkova, and V. N. Uversky, "Kinetic and equilibrium folding intermediates," *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 348, no. 1323, pp. 35–41, Apr. 1995, doi: 10.1098/RSTB.1995.0043.
- [44] R. L. Baldwin and G. D. Rose, "Molten globules, entropy-driven conformational change and protein folding," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 23, no. 1, pp. 4–10, Feb. 2013, doi: 10.1016/J.SBI.2012.11.004.
- [45] P. Polverino De Laureto, E. Frare, R. Gottardo, and A. Fontana, "Molten Globule of Bovine-Lactalbumin at Neutral pH Induced by Heat, Trifluoroethanol, and Oleic Acid: A Comparative Analysis by Circular Dichroism Spectroscopy and Limited Proteolysis," 2002, doi: 10.1002/prot.10234.
- [46] T. E. Creighton, "How important is the molten globule for correct protein folding?," *Trends Biochem Sci*, vol. 22, no. 1, pp. 6–10, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0968-0004(96)20030-1.
- [47] C. Redfield, "Using nuclear magnetic resonance spectroscopy to study molten globule states of proteins," *Methods*, vol. 34, no. 1, pp. 121–132, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.009.
- [48] V. E. Bychkova, G. v. Semisotnov, V. A. Balobanov, and A. v. Finkelstein, "The Molten Globule Concept: 45 Years Later," *Biochemistry (Moscow) 2018 83:1*, vol. 83, no. 1, pp. S33–S47, Feb. 2018, doi: 10.1134/S0006297918140043.
- [49] E. Judy and N. Kishore, "A look back at the molten globule state of proteins: thermodynamic aspects," *Biophysical Reviews 2019 11:3*, vol. 11, no. 3, pp. 365–375, May 2019, doi: 10.1007/S12551-019-00527-0.
- [50] K. S. Vassilenko and V. N. Uversky, "Native-like secondary structure of molten globules," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1594, no. 1, pp. 168–177, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0167-4838(01)00303-X.
- [51] O. B. Ptitsyn, "Molten Globule and Protein Folding," *Adv Protein Chem*, vol. 47, pp. 83–229, Jan. 1995, doi: 10.1016/S0065-3233(08)60546-X.
- [52] O. Tcherkasskaya and V. Uversky, "Polymeric Aspects of Protein Folding: a Brief Overview," *Protein Pept Lett*, vol. 10, no. 3, pp. 239–245, Mar. 2005, doi: 10.2174/0929866033478988.
- [53] M. Ohgushi and A. Wada, "Liquid-like state of side chains at the intermediate stage of protein denaturation," *Adv Biophys*, vol. 18, no. C, pp. 75–90, Jan. 1984, doi: 10.1016/0065-227X(84)90007-8.

- [54] K. Kuwajima, "The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 6, no. 2, pp. 87–103, Jan. 1989, doi: 10.1002/PROT.340060202.
- [55] Y. Goto, L. J. Calciano, and A. L. Fink, "Acid-induced folding of proteins.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, no. 2, pp. 573–577, Jan. 1990, doi: 10.1073/PNAS.87.2.573.
- [56] H. Christensen and R. H. Pain, "Molten globule intermediates and protein folding," *European Biophysics Journal*, vol. 19, no. 5, pp. 221–229, Mar. 1991, doi: 10.1007/BF00183530/METRICS.
- [57] D. T. Haynie and E. Freire, "Structural energetics of the molten globule state," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 16, no. 2, pp. 115–140, Jun. 1993, doi: 10.1002/PROT.340160202.
- [58] C. M. Dobson, "Protein Folding: Solid evidence for molten globules," *Current Biology*, vol. 4, no. 7, pp. 636–640, Jul. 1994, doi: 10.1016/S0960-9822(00)00141-X.
- [59] A. L. Fink, L. J. Calciano, Y. Goto, T. Kurotsu, and D. R. Falleros, "Classification of Acid Denaturation of Proteins: Intermediates and Unfolded States," *Biochemistry*, vol. 33, no. 41, pp. 12504–12511, Oct. 1994, doi: 10.1021/BI00207A018/ASSET/BI00207A018.FP.PNG\_V03.
- [60] O. B. Ptitsyn, "Structures of folding intermediates," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 5, no. 1, pp. 74–78, Feb. 1995, doi: 10.1016/0959-440X(95)80011-O.
- [61] M. Arai and K. Kuwajima, "Role of the molten globule state in protein folding," *Adv Protein Chem*, vol. 53, pp. 209–282, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0065-3233(00)53005-8.
- [62] V. N. Uversky, "Use of Fast Protein Size-Exclusion Liquid Chromatography To Study the Unfolding of Proteins Which Denature through the Molten Globule," *Biochemistry*, vol. 32, no. 48, pp. 13288–13298, 1993, doi: 10.1021/BI00211A042/ASSET/BI00211A042.FP.PNG\_V03.
- [63] D. Eliezer, K. Chiba, H. Tsuruta, S. Doniach, K. O. Hodgson, and H. Kihara, "Evidence of an associative intermediate on the myoglobin refolding pathway," *Biophys J*, vol. 65, no. 2, pp. 912–917, Aug. 1993, doi: 10.1016/S0006-3495(93)81124-X.
- [64] M. Kataoka, Y. Hagihara, K. Mihara, and Y. Goto, "Molten Globule of Cytochrome c Studied by Small Angle X-ray Scattering," *J Mol Biol*, vol. 229, no. 3, pp. 591–596, Feb. 1993, doi: 10.1006/JMBI.1993.1064.
- [65] G. v. Semisotnov *et al.*, "Protein Globularization During Folding. A Study by Synchrotron Small-angle X-ray Scattering," *J Mol Biol*, vol. 262, no. 4, pp. 559–574, Oct. 1996, doi: 10.1006/JMBI.1996.0535.
- [66] M. Kataoka, K. Kuwajima, F. Tokunaga, and Y. Goto, "Structural characterization of the molten globule of  $\alpha$ -lactalbumin by solution X-ray scattering," *Protein Science*, vol. 6, no. 2, pp. 422–430, Feb. 1997, doi: 10.1002/PRO.5560060219.
- [67] V. N. Uversky, A. S. Karnoup, D. J. Segel, S. Seshadri, S. Doniach, and A. L. Fink, "Anion-induced folding of Staphylococcal nuclease: characterization of multiple equilibrium partially

- folded intermediates,” *J Mol Biol*, vol. 278, no. 4, pp. 879–894, May 1998, doi: 10.1006/JMBI.1998.1741.
- [68] B. Jean, C. M. Dobson, P. A. Evans, and H. Claire, “Characterization of a Partly Folded Protein by NMR Methods: Studies on the Molten Globule State of Guinea Pig  $\alpha$ -Lactalbumin,” *Biochemistry*, vol. 28, no. 1, pp. 7–13, 1989, doi: 10.1021/BI00427A002/ASSET/BI00427A002.FP.PNG\_V03.
- [69] G. W. Bushnell, G. v. Louie, and G. D. Brayer, “High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c,” *J Mol Biol*, vol. 214, no. 2, pp. 585–595, Jul. 1990, doi: 10.1016/0022-2836(90)90200-6.
- [70] M. F. Jeng, S. W. Englander, G. A. Elöve, H. Roder, and A. J. Wand, “Structural Description of Acid-Denatured Cytochrome c by Hydrogen Exchange and 2D NMR,” *Biochemistry*, vol. 29, no. 46, pp. 10433–10437, Nov. 1990, doi: 10.1021/BI00498A001/ASSET/BI00498A001.FP.PNG\_V03.
- [71] C. L. Chyan, C. Wormald, C. M. Dobson, P. A. Evans, and J. Baum, “Structure and stability of the molten globule state of guinea-pig alpha-lactalbumin: a hydrogen exchange study,” *Biochemistry*, vol. 32, no. 21, pp. 5681–5691, 1993, doi: 10.1021/BI00072A025.
- [72] L. C. Wu, P. B. Laub, G. A. Elöve, J. Carey, and H. Roder, “A Noncovalent Peptide Complex as a Model for an Early Folding Intermediate of Cytochrome c,” *Biochemistry*, vol. 32, no. 38, pp. 10271–10276, 1993, doi: 10.1021/BI00089A050/ASSET/BI00089A050.FP.PNG\_V03.
- [73] J. R. Gillespie and D. Shortle, “Characterization of long-range structure in the denatured state of staphylococcal nuclease. I. paramagnetic relaxation enhancement by nitroxide spin labels,” *J Mol Biol*, vol. 268, no. 1, pp. 158–169, Apr. 1997, doi: 10.1006/JMBI.1997.0954.
- [74] J. R. Gillespie and D. Shortle, “Characterization of long-range structure in the denatured state of staphylococcal nuclease. II. distance restraints from paramagnetic relaxation and calculation of an ensemble of structures,” *J Mol Biol*, vol. 268, no. 1, pp. 170–184, Apr. 1997, doi: 10.1006/JMBI.1997.0953.
- [75] D. Eliezer, J. Yao, H. Jane Dyson, and P. E. Wright, “Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding,” *Nature Structural Biology* 1998 5:2, vol. 5, no. 2, pp. 148–155, Feb. 1998, doi: 10.1038/nsb0298-148.
- [76] H. S. Bose, R. M. Whittal, M. A. Baldwin, and W. L. Miller, “The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 13, pp. 7250–7255, Jun. 1999, doi: 10.1073/PNAS.96.13.7250/ASSET/65C52749-960B-4079-A623-459192EA8716/ASSETS/GRAPHIC/PQ1391633007.JPEG.
- [77] C. P. M. van Mierlo and E. Steensma, “Protein folding and stability investigated by fluorescence, circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: the flavodoxin story,” *J Biotechnol*, vol. 79, no. 3, pp. 281–298, May 2000, doi: 10.1016/S0168-1656(00)00244-3.
- [78] C. Bracken, “NMR spin relaxation methods for characterization of disorder and folding in proteins,” *J Mol Graph Model*, vol. 19, no. 1, pp. 3–12, Feb. 2001, doi: 10.1016/S1093-3263(00)00136-4.



- [79] N. Kayaman, E. Elif Gurel, B. M. Baysal, and F. E. Karasz, “Kinetics Of Coil-Globule Collapse in Poly(methyl methacrylate) in Dilute Solutions below 0 temperatures,” *Macromolecules*, vol. 32, no. 25, pp. 8399–8403, Dec. 1999, doi: 10.1021/MA991198E/ASSET/IMAGES/LARGE/MA991198EF00007.JPEG.
- [80] M. Podewitz, Y. Wang, P. K. Quoika, J. R. Loeffler, M. Schauerl, and K. R. Liedl, “Coil-Globule Transition Thermodynamics of Poly(N-isopropylacrylamide),” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 123, no. 41, pp. 8838–8847, Oct. 2019, doi: 10.1021/ACS.JPCB.9B06125/ASSET/IMAGES/LARGE/JP9B06125\_0005.JPEG.
- [81] G. E. Schulz and R. H. Schirmer, “Principles of Protein Structure,” 1979, pp. 32–36 doi: 10.1007/978-1-4612-6137-7.
- [82] V. N. Uversky and O. B. Ptitsyn, “All-or-none solvent-induced transitions between native, molten globule and unfolded states in globular proteins,” *Fold Des*, vol. 1, no. 2, pp. 117–122, Apr. 1996, doi: 10.1016/S1359-0278(96)00020-X.
- [83] C. Eichmann, S. Preissler, R. Riek, and E. Deuerling, “Cotranslational structure acquisition of nascent polypeptides monitored by NMR spectroscopy,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 20, pp. 9111–9116, May 2010, doi: 10.1073/PNAS.0914300107/SUPPL\_FILE/PNAS.0914300107\_SI.PDF.
- [84] Y. Han *et al.*, “Monitoring cotranslational protein folding in mammalian cells at codon resolution,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 31, pp. 12467–12472, Jul. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1208138109/SUPPL\_FILE/PNAS.201208138SI.PDF.
- [85] W. Holtkamp, G. Kokic, M. Jäger, J. Mittelstaet, A. A. Komar, and M. v. Rodnina, “Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time,” *Science (1979)*, vol. 350, no. 6264, pp. 1104–1107, Nov. 2015, doi: 10.1126/SCIENCE.AAD0344/SUPPL\_FILE/HOLTKAMP.SM.PDF.
- [86] J. M. Flanagan, M. Kataoka, D. Shortle, and D. M. Engelman, “Truncated staphylococcal nuclease is compact but disordered,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, no. 2, pp. 748–752, Jan. 1992, doi: 10.1073/PNAS.89.2.748.
- [87] N. Gō and H. Abe, “Noninteracting local-structure model of folding and unfolding transition in globular proteins. I. Formulation,” *Biopolymers*, vol. 20, no. 5, pp. 991–1011, May 1981, doi: 10.1002/BIP.1981.360200511.
- [88] P. E. Leopold, M. Montal, and J. N. Onuchic, “Protein folding funnels: A kinetic approach to the sequence-structure relationship,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, no. 18, pp. 8721–8725, 1992, doi: 10.1073/PNAS.89.18.8721.
- [89] P. G. Wolynes, J. N. Onuchic, and D. Thirumalai, “Navigating the folding routes,” *Science (1979)*, vol. 267, no. 5204, pp. 1619–1620, 1995, doi: 10.1126/SCIENCE.7886447/ASSET/A158EC82-41C7-4539-9821-B60875CD4B06/ASSETS/SCIENCE.7886447.FP.PNG.
- [90] J. N. Onuchic, H. Nymeyer, A. E. García, J. Chahine, and N. D. Socci, “The energy landscape theory of protein folding: Insights into folding mechanisms and scenarios,” *Adv Protein Chem*, vol. 53, pp. 87–152, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0065-3233(00)53003-4.

- [91] S. E. Jackson and A. R. Fersht, "Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition," *Biochemistry*, vol. 30, no. 43, pp. 10428–10435, Oct. 1991, doi: 10.1021/BI00107A010.
- [92] S. E. Jackson, "How do small single-domain proteins fold?," *Fold Des*, vol. 3, no. 4, pp. R81–R91, Aug. 1998, doi: 10.1016/S1359-0278(98)00033-9.
- [93] T. Okabe, S. Tsukamoto, K. Fujiwara, N. Shibayama, and M. Ikeguchi, "Delineation of solution burst-phase protein folding events by encapsulating the proteins in silica gels," *Biochemistry*, vol. 53, no. 23, pp. 3858–3866, Jun. 2014, doi: 10.1021/BI5003647/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2014-003647\_0006.JPEG.
- [94] E. R. Morris and M. S. Searle, "Overview of Protein Folding Mechanisms: Experimental and Theoretical Approaches to Probing Energy Landscapes," *Curr Protoc Protein Sci*, vol. 68, no. 1, pp. 28.2.1–28.2.22, Apr. 2012, doi: 10.1002/0471140864.PS2802S68.
- [95] K. Kamagata, Y. Sawano, M. Tanokura, and K. Kuwajima, "Multiple parallel-pathway folding of proline-free staphylococcal nuclease," *J Mol Biol*, vol. 332, no. 5, pp. 1143–1153, Oct. 2003, doi: 10.1016/j.jmb.2003.07.002.
- [96] W. Colón, G. A. Elöve, L. P. Wakem, F. Sherman, and H. Roder, "Side chain packing of the N- and C-terminal helices plays a critical role in the kinetics of cytochrome c folding," *Biochemistry*, vol. 35, no. 17, pp. 5538–5549, Apr. 1996, doi: 10.1021/BI960052U/ASSET/IMAGES/LARGE/BI960052UF00007.JPEG.
- [97] W. A. Houry, D. M. Rothwarf, and H. A. Scheraga, "Circular dichroism evidence for the presence of burst-phase intermediates on the conformational folding pathway of ribonuclease A," *Biochemistry*, vol. 35, no. 31, pp. 10125–10133, 1996, doi: 10.1021/BI960617M/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BI960617ME00005.GIF.
- [98] M. C. R. Shastry and H. Roder, "Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale," *Nature Structural Biology 1998 5:5*, vol. 5, no. 5, pp. 385–392, May 1998, doi: 10.1038/nsb0598-385.
- [99] E. Welker *et al.*, "Ultrarapid mixing experiments shed new light on the characteristics of the initial conformational ensemble during the folding of ribonuclease A," *Proceedings of the National Academy of Sciences ; Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 51, pp. 17681–17686, Dec. 2004, doi: 10.1073/PNAS.0407999101.
- [100] T. Kimura *et al.*, "Specifically Collapsed Intermediate in the Early Stage of the Folding of Ribonuclease A," *J Mol Biol*, vol. 350, no. 2, pp. 349–362, Jul. 2005, doi: 10.1016/J.JMB.2005.04.074.
- [101] U. Samuni, M. S. Navati, L. J. Juszczak, D. Dantsker, M. Yang, and J. M. Friedman, "Unfolding and refolding of Sol - Gel encapsulated carbonmonoxymyoglobin: An orchestrated spectroscopic study of intermediates and kinetics," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, no. 46, pp. 10802–10813, Nov. 2000, doi: 10.1021/JP000802G/ASSET/IMAGES/LARGE/JP000802GF00007.JPEG.
- [102] E. S. Peterson, E. F. Leonard, J. A. Foulke, M. C. Oliff, R. D. Salisbury, and D. Y. Kim, "Folding Myoglobin within a Sol-Gel Glass: Protein Folding Constrained to a Small Volume," *Biophys J*, vol. 95, no. 1, pp. 322–332, Jul. 2008, doi: 10.1529/BIOPHYSJ.106.097428.

- [103] N. Shibayama, “Slow motion analysis of protein folding intermediates within wet silica gels,” *Biochemistry*, vol. 47, no. 21, pp. 5784–5794, May 2008, doi: 10.1021/BI8003582/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2008-003582\_0004.JPEG.
- [104] N. Shibayama and M. de La Rosa, “Circular dichroism study on the early folding events of  $\beta$ -lactoglobulin entrapped in wet silica gels,” *FEBS Lett*, vol. 582, no. 17, pp. 2668–2672, Jul. 2008, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2008.06.047.
- [105] R. W. Woody, “Circular Dichroism of Protein-Folding Intermediates,” *Methods Enzymol*, vol. 380, pp. 242–285, Jan. 2004, doi: 10.1016/S0076-6879(04)80012-0.
- [106] M. Ohgushi and A. Wada, “‘Molten-globule state’: a compact form of globular proteins with mobile side-chains,” *FEBS Lett*, vol. 164, no. 1, pp. 21–24, Nov. 1983, doi: 10.1016/0014-5793(83)80010-6.
- [107] S. Nakamura, Y. Seki, E. Katoh, and S. I. Kidokoro, “Thermodynamic and structural properties of the acid molten globule state of horse cytochrome c,” *Biochemistry*, vol. 50, no. 15, pp. 3116–3126, Apr. 2011, doi: 10.1021/BI101806B/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2010-01806B\_0013.JPEG.
- [108] W. Colón and H. Roder, “Kinetic intermediates in the formation of the cytochrome c molten globule,” *Nature Structural Biology* 1996 3:12, vol. 3, no. 12, pp. 1019–1025, Dec. 1996, doi: 10.1038/nsb1296-1019.
- [109] C. B. Anfinsen, “Principles that govern the folding of protein chains,” *Science*, vol. 181, no. 4096, pp. 223–230, 1973, doi: 10.1126/SCIENCE.181.4096.223.
- [110] M. Davidovic, C. Mattea, J. Qvist, and B. Halle, “Protein Cold Denaturation as Seen From the Solvent,” *J Am Chem Soc*, vol. 131, no. 3, pp. 1025–1036, Jan. 2009, doi: 10.1021/ja8056419.
- [111] C. L. Dias, T. Ala-Nissila, J. Wong-ekkabut, I. Vattulainen, M. Grant, and M. Karttunen, “The hydrophobic effect and its role in cold denaturation,” *Cryobiology*, vol. 60, no. 1, pp. 91–99, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.07.005.
- [112] D. Sanfelice and P. A. Temussi, “Cold denaturation as a tool to measure protein stability,” *Biophys Chem*, vol. 208, pp. 4–8, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.bpc.2015.05.007.
- [113] P. Ball and J. E. Hallsworth, “Water structure and chaotropicity: their uses, abuses and biological implications,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 17, no. 13, pp. 8297–8305, Mar. 2015, doi: 10.1039/C4CP04564E.
- [114] Y. Marcus, “Effect of Ions on the Structure of Water: Structure Making and Breaking,” *Chem Rev*, vol. 109, no. 3, pp. 1346–1370, Mar. 2009, doi: 10.1021/cr8003828.
- [115] K. D. Collins and M. W. Washabaugh, “The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces,” *Q Rev Biophys*, vol. 18, no. 4, pp. 323–422, 1985, doi: 10.1017/S0033583500005369.
- [116] P. M. Wiggins, “High and low density water in gels,” *Prog Polym Sci*, vol. 20, no. 6, pp. 1121–1163, Jan. 1995, doi: 10.1016/0079-6700(95)00015-8.
- [117] N. Kitadai, T. Sawai, R. Tonoue, S. Nakashima, M. Katsura, and K. Fukushi, “Effects of ions on the oh stretching band of water as revealed by atr-ir spectroscopy,” *J Solution Chem*, vol. 43, no. 6, pp. 1055–1077, Jun. 2014, doi: 10.1007/S10953-014-0193-0/TABLES/3.

- [118] Y. Marcus, “Ion Properties,” *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*, pp. 1101–1106, 2014, doi: 10.1007/978-1-4419-6996-5\_15.
- [119] H. Donald, B. Jenkins, and Y. Marcus, “Viscosity S-Coefficients of Ions in Solution,” *Chem Rev*, vol. 95, no. 8, pp. 2695–2724, 1995, doi: 10.1021/CR00040A004/ASSET/CR00040A004.FP.PNG\_V03.
- [120] C. G. Salzmann, “Advances in the experimental exploration of water’s phase diagram,” *J Chem Phys*, vol. 150, no. 6, p. 060901, Feb. 2019, doi: 10.1063/1.5085163.
- [121] T. Bartels-Rausch *et al.*, “Ice structures, patterns, and processes: A view across the icefields,” *Rev Mod Phys*, vol. 84, no. 2, pp. 885–944, May 2012, doi: 10.1103/REVMODPHYS.84.885/FIGURES/25/MEDIUM.
- [122] E. A. Engel, A. Anelli, M. Ceriotti, C. J. Pickard, and R. J. Needs, “Mapping uncharted territory in ice from zeolite networks to ice structures,” *Nature Communications 2018 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04618-6.
- [123] N. H. Fletcher, “Structure and energy of ordinary ice,” *The Chemical Physics of Ice*, pp. 23–48, Jun. 1970, doi: 10.1017/CBO9780511735639.004.
- [124] A. L. Devries and Y. Lin, “Structure of a peptide antifreeze and mechanism of adsorption to ice,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, vol. 495, no. 2, pp. 388–392, Dec. 1977, doi: 10.1016/0005-2795(77)90395-6.
- [125] I. Kohl, E. Mayer, and A. Hallbrucker, “The glassy water–cubic ice system: a comparative study by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 2, no. 8, pp. 1579–1586, Jan. 2000, doi: 10.1039/A908688I.
- [126] K. W. Keller, “I. Sunagawa (Ed.) Morphology of crystals. Part A. Terra Scientific Publ. Co., Tokyo and D. Reidel Publ. Co., Dordrecht 1987, pp. XXI + 365, 188 figs., 4 tables. Price Dfl. 220.00. ISBN 90-277-2507-1,” *Crystal Research and Technology*, vol. 24, no. 1, pp. 20–20, Jan. 1989, doi: 10.1002/CRAT.2170240104.
- [127] P. Thanatuksorn, K. Kajiwara, N. Murase, and F. Franks, “Freeze–thaw behaviour of aqueous glucose solutions—the crystallisation of cubic ice,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 10, no. 35, pp. 5452–5458, Aug. 2008, doi: 10.1039/B802042F.
- [128] L. Lupi *et al.*, “Role of stacking disorder in ice nucleation,” *Nature 2017 551:7679*, vol. 551, no. 7679, pp. 218–222, Nov. 2017, doi: 10.1038/nature24279.
- [129] D. Beaglehole and D. Nason, “Transition layer on the surface on ice,” *Surf Sci*, vol. 96, no. 1–3, pp. 357–363, Jun. 1980, doi: 10.1016/0039-6028(80)90313-1.
- [130] N. H. Fletcher, “Surface structure of water and ice,” <https://doi.org/10.1080/14786436808227758>, vol. 18, no. 156, pp. 1287–1300, 2006, doi: 10.1080/14786436808227758.
- [131] O. A. Karim and A. D. J. Haymet, “The ice/water interface,” *Chem Phys Lett*, vol. 138, no. 6, pp. 531–534, Aug. 1987, doi: 10.1016/0009-2614(87)80118-5.
- [132] J. G. Dash, A. W. Rempel, and J. S. Wettlaufer, “The physics of premelted ice and its geophysical consequences,” *Rev Mod Phys*, vol. 78, no. 3, pp. 695–741, Jul. 2006, doi: 10.1103/REVMODPHYS.78.695/FIGURES/13/MEDIUM.

- [133] M. Matsumoto, S. Saito, and I. Ohmine, "Molecular dynamics simulation of the ice nucleation and growth process leading to water freezing," *Nature* 2002 416:6879, vol. 416, no. 6879, pp. 409–413, Mar. 2002, doi: 10.1038/416409a.
- [134] M. Tan, J. Mei, and J. Xie, "The Formation and Control of Ice Crystal and Its Impact on the Quality of Frozen Aquatic Products: A Review," *Crystals* 2021, Vol. 11, Page 68, vol. 11, no. 1, p. 68, Jan. 2021, doi: 10.3390/CRYST11010068.
- [135] B. S. Bhatnagar, R. H. Bogner, and M. J. Pikal, "Protein Stability During Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization," <http://dx.doi.org/10.1080/10837450701481157>, vol. 12, no. 5, pp. 505–523, Sep. 2008, doi: 10.1080/10837450701481157.
- [136] J. R. Authelin *et al.*, "Freezing of Biologicals Revisited: Scale, Stability, Excipients, and Degradation Stresses," *J Pharm Sci*, vol. 109, no. 1, pp. 44–61, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.XPHS.2019.10.062.
- [137] K. A. Pikal-Cleland, N. Rodríguez-Hornedo, G. L. Amidon, and J. F. Carpenter, "Protein Denaturation during Freezing and Thawing in Phosphate Buffer Systems: Monomeric and Tetrameric  $\beta$ -Galactosidase," *Arch Biochem Biophys*, vol. 384, no. 2, pp. 398–406, Dec. 2000, doi: 10.1006/ABBI.2000.2088.
- [138] M. C. Heller, J. F. Carpenter, and T. W. Randolph, "Effects of Phase Separating Systems on Lyophilized Hemoglobin," *J Pharm Sci*, vol. 85, no. 12, pp. 1358–1362, Dec. 1996, doi: 10.1021/JS960019T.
- [139] N. Takenaka and H. Bandow, "Chemical kinetics of reactions in the unfrozen solution of ice," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 111, no. 36, pp. 8780–8786, Sep. 2007, doi: 10.1021/JP0738356/ASSET/IMAGES/LARGE/JP0738356F00007.JPEG.
- [140] K. Anzo, M. Harada, and T. Okada, "Enhanced kinetics of pseudo first-order hydrolysis in liquid phase coexistent with ice," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 117, no. 41, pp. 10619–10625, Oct. 2013, doi: 10.1021/JP409126P/SUPPL\_FILE/JP409126P\_SI\_001.PDF.
- [141] E. Shalaev *et al.*, "Freezing of Aqueous Solutions and Chemical Stability of Amorphous Pharmaceuticals: Water Clusters Hypothesis," *J Pharm Sci*, vol. 108, no. 1, pp. 36–49, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.XPHS.2018.07.018.
- [142] K. A. Dill, D. O. V. Alonso, and K. Hutchinson, "Thermal Stabilities of Globular Proteins," *Biochemistry*, vol. 28, no. 13, pp. 5439–5449, Jun. 1989, doi: 10.1021/BI00439A019/ASSET/BI00439A019.FP.PNG\_V03.
- [143] P. L. Privalov, "Cold denaturation of proteins," *Crit Rev Biochem Mol Biol*, vol. 25, no. 4, pp. 281–306, 1990, doi: 10.3109/10409239009090612.
- [144] F. Franks, "Protein Destabilization at Low Temperatures," *Adv Protein Chem*, vol. 46, no. C, pp. 105–139, Jan. 1995, doi: 10.1016/S0065-3233(08)60333-2.
- [145] G. Graziano, F. Catanzano, A. Riccio, and G. Barone, "A reassessment of the molecular origin of cold denaturation," *J Biochem*, vol. 122, no. 2, pp. 395–401, 1997, doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A021766.

- [146] C. F. Lopez, R. K. Darst, and P. J. Rossky, "Mechanistic elements of protein cold denaturation," *J Phys Chem B*, vol. 112, no. 19, pp. 5961–5967, May 2008, doi: 10.1021/JP075928T.
- [147] S. Matysiak, P. G. Debenedetti, and P. J. Rossky, "Role of hydrophobic hydration in protein stability: a 3D water-explicit protein model exhibiting cold and heat denaturation," *J Phys Chem B*, vol. 116, no. 28, pp. 8095–8104, Jul. 2012, doi: 10.1021/JP3039175.
- [148] G. B. Strambini and E. Gabellieri, "Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding," *Biophys J*, vol. 70, no. 2, p. 971, 1996, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79640-6.
- [149] B. S. Chang, B. S. Kendrick, and J. F. Carpenter, "Surface-Induced Denaturation of Proteins during Freezing and its Inhibition by Surfactants," *J Pharm Sci*, vol. 85, no. 12, pp. 1325–1330, Dec. 1996, doi: 10.1021/JS960080Y.
- [150] S. Jiang and S. L. Nail, "Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying," *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 45, no. 3, pp. 249–257, May 1998, doi: 10.1016/S0939-6411(98)00007-1.
- [151] B. M. Eckhardt, J. Q. Oeswein, and T. A. Bewley, "Effect of freezing on aggregation of human growth hormone," *Pharm Res*, vol. 8, no. 11, pp. 1360–1364, 1991, doi: 10.1023/A:1015888704365.
- [152] J. M. Sarciaux, S. Mansour, M. J. Hageman, and S. L. Nail, "Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying," *J Pharm Sci*, vol. 88, no. 12, pp. 1354–1361, 1999, doi: 10.1021/JS980383N.
- [153] G. B. Strambini and M. Gonnelli, "Protein stability in ice," *Biophys J*, vol. 92, no. 6, pp. 2131–2138, 2007, doi: 10.1529/BIOPHYSJ.106.099531.
- [154] B. S. Bhatnagar, M. J. Pikal, and R. H. Bogner, "Study of the individual contributions of ice formation and freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing," *J Pharm Sci*, vol. 97, no. 2, pp. 798–814, 2008, doi: 10.1002/JPS.21017.
- [155] J. J. Schwegman, J. F. Carpenter, and S. L. Nail, "Evidence of partial unfolding of proteins at the ice/freeze-concentrate interface by infrared microscopy," *J Pharm Sci*, vol. 98, no. 9, pp. 3239–3246, 2009, doi: 10.1002/JPS.21843.
- [156] J. H. Gu *et al.*, "Beyond glass transitions: studying the highly viscous and elastic behavior of frozen protein formulations using low temperature rheology and its potential implications on protein stability," *Pharm Res*, vol. 30, no. 2, pp. 387–401, Feb. 2013, doi: 10.1007/S11095-012-0879-1.
- [157] A. Regand and H. D. Goff, "Effect of biopolymers on structure and ice recrystallization in dynamically frozen ice cream model systems," *J Dairy Sci*, vol. 85, no. 11, pp. 2722–2732, 2002, doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(02)74359-2.
- [158] A. Twomey, R. Less, K. Kurata, H. Takamatsu, and A. Aksan, "In situ spectroscopic quantification of protein-ice interactions," *J Phys Chem B*, vol. 117, no. 26, pp. 7889–7897, Jul. 2013, doi: 10.1021/JP403267X.
- [159] A. Twomey, K. Kurata, Y. Nagare, H. Takamatsu, and A. Aksan, "Microheterogeneity in frozen protein solutions," *Int J Pharm*, vol. 487, no. 1–2, pp. 91–100, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2015.04.032.

- [160] S. D. Webb, S. L. Golledge, J. L. Cleland, J. F. Carpenter, and T. W. Randolph, "Surface adsorption of recombinant human interferon-gamma in lyophilized and spray-lyophilized formulations," *J Pharm Sci*, vol. 91, no. 6, pp. 1474–1487, 2002, doi: 10.1002/JPS.10135.
- [161] S. D. Webb, J. L. Cleland, J. F. Carpenter, and T. W. Randolph, "Effects of annealing lyophilized and spray-lyophilized formulations of recombinant human interferon-gamma," *J Pharm Sci*, vol. 92, no. 4, pp. 715–729, Apr. 2003, doi: 10.1002/JPS.10334.
- [162] I. D. Kuntz, T. S. Brassfield, G. D. Law, and G. v. Purcell, "Hydration of macromolecules," *Science*, vol. 163, no. 3873, pp. 1329–1331, 1969, doi: 10.1126/SCIENCE.163.3873.1329.
- [163] M. G. Usha and R. J. Wittebort, "Orientational ordering and dynamics of the hydrate and exchangeable hydrogen atoms in crystalline crambin," *J Mol Biol*, vol. 208, no. 4, pp. 669–678, Aug. 1989, doi: 10.1016/0022-2836(89)90157-5.
- [164] A. B. Siemer, K. Y. Huang, and A. E. McDermott, "Protein-ice interaction of an antifreeze protein observed with solid-state NMR," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 41, pp. 17580–17585, Oct. 2010, doi: 10.1073/PNAS.1009369107.
- [165] K. Tompa, P. Bánki, M. Bokor, P. Kamasa, G. Lasanda, and P. Tompa, "Interfacial water at protein surfaces: wide-line NMR and DSC characterization of hydration in ubiquitin solutions," *Biophys J*, vol. 96, no. 7, pp. 2789–2798, 2009, doi: 10.1016/J.BPJ.2008.11.038.
- [166] B. Zakharov *et al.*, "Ice Recrystallization in a Solution of a Cryoprotector and Its Inhibition by a Protein: Synchrotron X-Ray Diffraction Study," *J Pharm Sci*, vol. 105, no. 7, pp. 2129–2138, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.XPHS.2016.04.020.
- [167] B. Bhatnagar *et al.*, "Protein/Ice Interaction: High-Resolution Synchrotron X-ray Diffraction Differentiates Pharmaceutical Proteins from Lysozyme," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 123, no. 27, pp. 5690–5699, Jun. 2019, doi: 10.1021/ACS.JPCB.9B02443/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2019-02443Z\_0005.JPEG.
- [168] C. F. Macrae *et al.*, "Mercury: visualization and analysis of crystal structures," *urn:issn:0021-8898*, vol. 39, no. 3, pp. 453–457, May 2006, doi: 10.1107/S002188980600731X.
- [169] C. Körber, "Phenomena at the advancing ice-liquid interface: solutes, particles and biological cells," *Q Rev Biophys*, vol. 21, no. 2, pp. 229–298, 1988, doi: 10.1017/S0033583500004303.
- [170] J. E. Curtis *et al.*, "Small-angle neutron scattering study of protein crowding in liquid and solid phases: Lysozyme in aqueous solution, frozen solution, and carbohydrate powders," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 116, no. 32, pp. 9653–9667, Aug. 2012, doi: 10.1021/JP304772D/SUPPL\_FILE/JP304772D\_SI\_002.PDF.
- [171] N. Takenaka, A. Ueda, T. Daimon, H. Bandow, T. Dohmaru, and Y. Maeda, "Acceleration mechanism of chemical reaction by freezing: The reaction of nitrous acid with dissolved oxygen," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, no. 32, pp. 13874–13884, Aug. 1996, doi: 10.1021/JP9525806/ASSET/IMAGES/LARGE/JP9525806F00013.JPEG.
- [172] N. Takenaka, A. Ueda, and Y. Maeda, "Acceleration of the rate of nitrite oxidation by freezing in aqueous solution," *Natur*, vol. 358, no. 6389, pp. 736–738, 1992, doi: 10.1038/358736A0.
- [173] S. Kunugi and N. Tanaka, "Cold denaturation of proteins under high pressure," *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1595, no. 1–2, pp. 329–344, Mar. 2002, doi: 10.1016/S0167-4838(01)00354-5.

- [174] W. Doster and J. Friedrich, “Pressure-Temperature Phase Diagrams of Proteins,” *Protein Science Encyclopedia*, pp. 99–126, Mar. 2008, doi: 10.1002/9783527610754.SF05.
- [175] A. Arsiccio, J. McCarty, R. Pisano, and J. E. Shea, “Heightened Cold-Denaturation of Proteins at the Ice-Water Interface,” *J Am Chem Soc*, vol. 142, no. 12, pp. 5722–5730, Mar. 2020, doi: 10.1021/JACS.9B13454.
- [176] A. Arsiccio and R. Pisano, “The Ice-Water Interface and Protein Stability: A Review,” *J Pharm Sci*, vol. 109, no. 7, pp. 2116–2130, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.XPHS.2020.03.022.
- [177] B. E. Rapp, “Microfluidics: Modeling, mechanics and mathematics,” *Microfluidics: Modeling, Mechanics and Mathematics*, pp. 1–766, Dec. 2016, doi: 10.1016/C2012-0-02230-2.
- [178] “critical micelle concentration,” *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Sep. 2008, doi: 10.1351/GOLDBOOK.C01395.
- [179] F. O. Ayorinde, S. v Gelain, J. H. Johnson, and L. W. Wan, “Analysis of some commercial polysorbate formulations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”, doi: 10.1002/1097-0231.
- [180] H. D. Goff, “Colloidal aspects of ice cream—A review,” *Int Dairy J*, vol. 7, no. 6–7, pp. 363–373, Jun. 1997, doi: 10.1016/S0958-6946(97)00040-X.
- [181] L. M. Nair, N. V. Stephens, S. Vincent, N. Raghavan, and P. J. Sand, “Determination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection,” *J Chromatogr A*, vol. 1012, no. 1, pp. 81–86, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0021-9673(03)01105-1.
- [182] T. Ieven, T. Van Weyenbergh, M. Vandebotermiet, D. Devolder, C. Breynaert, and R. Schrijvers, “Tolerability of polysorbate 80-containing COVID-19 vaccines in confirmed polyethylene glycol-allergic patients,” *J Allergy Clin Immunol Pract*, vol. 9, no. 12, p. 4470, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.JAIP.2021.09.039.
- [183] L. Ramnath, B. Sithole, and R. Govinden, “Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry,” *Biotechnology Reports*, vol. 15, pp. 114–124, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.BTRE.2017.07.004.
- [184] D. Koley and A. J. Bard, “Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM),” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 39, pp. 16783–16787, Sep. 2010, doi: 10.1073/PNAS.1011614107/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [185] P. L. Roberts, “Virus inactivation by solvent/detergent treatment using Triton X-100 in a high purity factor VIII,” *Biologicals*, vol. 36, no. 5, pp. 330–335, Sep. 2008, doi: 10.1016/J.BIOLOGICALS.2008.06.002.
- [186] P. M. Rodi, M. D. Bocco Gianello, M. C. Corregido, and A. M. Gennaro, “Comparative study of the interaction of CHAPS and Triton X-100 with the erythrocyte membrane,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1838, no. 3, pp. 859–866, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2013.11.006.
- [187] S. J. Assinder and A. Upshall, “Paramorphogenic and genotoxic activity of Triton X-100 and sodium dodecyl sulphate in *Aspergillus nidulans*,” *Mutat Res*, vol. 142, no. 4, pp. 179–181, 1985, doi: 10.1016/0165-7992(85)90019-3.



- [188] S. Shahraki *et al.*, “Decellularization with triton X-100 provides a suitable model for human kidney bioengineering using human mesenchymal stem cells,” *Life Sci*, vol. 295, p. 120167, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.LFS.2021.120167.
- [189] B. Lina, M. A. Fletcher, M. Valette, P. Saliou, and M. Aymard, “A TritonX-100-split virion influenza vaccine is safe and fulfills the committee for proprietary medicinal products (CPMP) recommendations for the European Community for Immunogenicity, in Children, Adults and the Elderly,” *Biologicals*, vol. 28, no. 2, pp. 95–103, 2000, doi: 10.1006/BIOL.2000.0245.
- [190] N. B. Bam, T. W. Randolph, and J. L. Cleland, “Stability of Protein Formulations: Investigation of Surfactant Effects by a Novel EPR Spectroscopic Technique,” *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 12, no. 1, pp. 2–11, 1995, doi: 10.1023/A:1016286600229/METRICS.
- [191] M. Katakam, L. N. Bell, and A. K. Banga, “Effect of Surfactants on the Physical Stability of Recombinant Human Growth Hormone,” *J Pharm Sci*, vol. 84, no. 6, pp. 713–716, Jun. 1995, doi: 10.1002/JPS.2600840609.
- [192] N. B. Bam, “Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions,” *J Pharm Sci*, vol. 87, no. 12, pp. 1554–1559, Dec. 1998, doi: 10.1021/JS980175V.
- [193] A. Hillgren, H. Evertsson, and M. Aldén, “Interaction between lactate dehydrogenase and Tween 80 in aqueous solution,” *Pharm Res*, vol. 19, no. 4, pp. 504–510, 2002, doi: 10.1023/A:1015156031381/METRICS.
- [194] A. Hillgren, J. Lindgren, and M. Aldén, “Protection mechanism of Tween 80 during freeze–thawing of a model protein, LDH,” *Int J Pharm*, vol. 237, no. 1–2, pp. 57–69, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0378-5173(02)00021-2.
- [195] B. A. Kerwin, M. C. Heller, S. H. Levin, and T. W. Randolph, “Effects of Tween 80 and Sucrose on Acute Short-Term Stability and Long-Term Storage at – 20 C of a Recombinant Hemoglobin,” *J Pharm Sci*, vol. 87, no. 9, pp. 1062–1068, Sep. 1998, doi: 10.1021/JS980140V.
- [196] J. F. Carpenter, M. J. Pikal, B. S. Chang, and T. W. Randolph, “Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice,” *Pharm Res*, vol. 14, no. 8, pp. 969–975, 1997, doi: 10.1023/A:1012180707283/METRICS.
- [197] E. Fischer and E. Abderhalden, “Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente,” *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899–1906)*, pp. 717–727, 1906, doi: 10.1007/978-3-642-99499-9\_54.
- [198] H. Neurath and R. Zwillig, “Willy Kühne und die Anfänge der Enzymologie,” *Semper Apertus Sechshundert Jahre Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg 1386–1986*, pp. 915–928, 1985, doi: 10.1007/978-3-642-70477-2\_32.
- [199] J. H. Northrop and M. Kunitz, “Isolation of protein crystals possessing tryptic activity,” *Science (1979)*, vol. 73, no. 1888, pp. 262–263, Mar. 1931, doi: 10.1126/SCIENCE.73.1888.262/ASSET/054758E6-EFA6-4980-9968-854D91944218/ASSETS/SCIENCE.73.1888.262.FP.PNG.
- [200] J. J. Perona and C. S. Craik, “Structural basis of substrate specificity in the serine proteases,” *Protein Science*, vol. 4, no. 3, pp. 337–360, Mar. 1995, doi: 10.1002/PRO.5560040301.

- [201] E. R. Bittar, F. R. Caldeira, A. M. C. Santos, A. R. Günther, E. Rogana, and M. M. Santoro, "Characterization of  $\beta$ -trypsin at acid pH by differential scanning calorimetry," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 36, no. 12, pp. 1621–1627, 2003, doi: 10.1590/S0100-879X2003001200003.
- [202] C. S. Craik *et al.*, "Redesigning Trypsin: Alteration of Substrate Specificity," *Science (1979)*, vol. 228, no. 4697, pp. 291–297, 1985, doi: 10.1126/SCIENCE.3838593.
- [203] D. R. Corey, M. E. McGrath, J. R. Vásquez, R. J. Fletterick, and C. S. Craik, "An Alternate Geometry for the Catalytic Triad of Serine Proteases," *J Am Chem Soc*, vol. 114, no. 12, pp. 4905–4907, Jun. 1992, doi: 10.1021/JA00038A067/ASSET/JA00038A067.FP.PNG\_V03.
- [204] V. Schellenberger, W. J. Rutter, and C. W. Turck, "Role of the S' Subsites in Serine Protease Catalysis. Active-Site Mapping of Rat Chymotrypsin, Rat Trypsin,  $\alpha$ -Lytic Protease, and Cercarial Protease from *Schistosoma mansoni*," *Biochemistry*, vol. 33, no. 14, pp. 4251–4257, Apr. 1994, doi: 10.1021/BI00180A020/ASSET/BI00180A020.FP.PNG\_V03.
- [205] J. L. Harris, B. J. Backes, F. Leonetti, S. Mahrus, J. A. Ellman, and C. S. Craik, "Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 14, pp. 7754–7759, Jul. 2000, doi: 10.1073/PNAS.140132697/ASSET/7BBB3DF0-E202-434C-A9EE-11D7AF262291/ASSETS/GRAPHIC/PQ1401326003.JPEG.
- [206] T. Baird, B. Wang, M. Lodder, S. M. Hecht, and C. S. Craik, "Generation of Active Trypsin by Chemical Cleavage," *Tetrahedron*, vol. 56, no. 48, pp. 9477–9485, Nov. 2000, doi: 10.1016/S0040-4020(00)00832-2.
- [207] L. Hedstrom, S. Farr-Jones, C. A. Kettner, and W. J. Rutter, "Converting Trypsin to Chymotrypsin: Ground-State Binding Does Not Determine Substrate Specificity," *Biochemistry*, vol. 33, no. 29, pp. 8764–8769, Jul. 1994, doi: 10.1021/BI00195A018/ASSET/BI00195A018.FP.PNG\_V03.
- [208] M. Zimmerman, B. Ashe, E. C. Yurewicz, and G. Patel, "Sensitive assays for trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates," *Anal Biochem*, vol. 78, no. 1, pp. 47–51, Mar. 1977, doi: 10.1016/0003-2697(77)90006-9.
- [209] W. Bode, P. Schwager, and R. Huber, "The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding: The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution," *J Mol Biol*, vol. 118, no. 1, pp. 99–112, Jan. 1978, doi: 10.1016/0022-2836(78)90246-2.
- [210] H. Fehllhammer, W. Bode, and R. Huber, "Crystal structure of bovine trypsinogen at 1.8 Å resolution: II. Crystallographic refinement, refined crystal structure and comparison with bovine trypsin," *J Mol Biol*, vol. 111, no. 4, pp. 415–438, Apr. 1977, doi: 10.1016/S0022-2836(77)80062-4.
- [211] R. Huber *et al.*, "Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor: II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution," *J Mol Biol*, vol. 89, no. 1, pp. 73–101, Oct. 1974, doi: 10.1016/0022-2836(74)90163-6.

- [212] R. M. Stroud, L. M. Kay, and R. E. Dickerson, “The structure of bovine trypsin : Electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2.7 Å resolution,” *J Mol Biol*, vol. 83, no. 2, pp. 185–208, Feb. 1974, doi: 10.1016/0022-2836(74)90387-8.
- [213] L. T. J. Delbaere, W. L. B. Hutcheon, M. N. G. James, and W. E. Thiessen, “Tertiary structural differences between microbial serine proteases and pancreatic serine enzymes,” *Nature* 1975 257:5529, vol. 257, no. 5529, pp. 758–763, 1975, doi: 10.1038/257758a0.
- [214] A. A. Kossiakoff and S. A. Spencer, “Direct Determination of the Protonation States of Aspartic Acid-102 and Histidine-57 in the Tetrahedral Intermediate of the Serine Proteases: Neutron Structure of Trypsin,” *Biochemistry*, vol. 20, no. 22, pp. 6462–6474, 1981, doi: 10.1021/BI00525A027/ASSET/BI00525A027.FP.PNG\_V03.
- [215] E. Tsilikounas, T. Rao, W. G. Gutheil, and W. W. Bachovchin, “<sup>15</sup>N and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the catalytic histidine in chloromethyl ketone-inhibited complexes of serine proteases,” *Biochemistry*, vol. 35, no. 7, pp. 2437–2444, Feb. 1996, doi: 10.1021/BI9513968/ASSET/IMAGES/LARGE/BI9513968H00002.JPEG.
- [216] C. S. Craik, S. Roczniak, C. Largman, and W. J. Rutter, “The Catalytic Role of the Active Site Aspartic Acid in Serine Proteases,” *Science (1979)*, vol. 237, no. 4817, pp. 909–913, 1987, doi: 10.1126/SCIENCE.3303334.
- [217] T. T. Baird, W. D. Wright, and C. S. Craik, “Conversion of trypsin to a functional threonine protease,” *Protein Science*, vol. 15, no. 6, pp. 1229–1238, Jun. 2006, doi: 10.1110/PS.062179006.
- [218] L. Gráf *et al.*, “Electrostatic complementarity within the substrate-binding pocket of trypsin.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 85, no. 14, pp. 4961–4965, Jul. 1988, doi: 10.1073/PNAS.85.14.4961.
- [219] S. Roczniak, C. S. Craik, W. J. Rutter, L. Graf, A. Patthy, and R. J. Fletterick, “Selective Alteration of Substrate Specificity by Replacement of Aspartic Acid-189 with Lysine in the Binding Pocket of Trypsin†,” *Biochemistry*, vol. 26, no. 9, pp. 2616–2623, 1987, doi: 10.1021/BI00383A031/ASSET/BI00383A031.FP.PNG\_V03.
- [220] W. Bode and P. Schwager, “The refined crystal structure of bovine β-trypsin at 1.8 Å resolution: II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0,” *J Mol Biol*, vol. 98, no. 4, pp. 693–717, Nov. 1975, doi: 10.1016/S0022-2836(75)80005-2.
- [221] “Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, vol. 492, no. 2, pp. 316–321, Jun. 1977, doi: 10.1016/0005-2795(77)90082-4.
- [222] R. Ménard *et al.*, “A Protein Engineering Study of the Role of Aspartate 158 in the Catalytic Mechanism of Papain,” *Biochemistry*, vol. 29, no. 28, pp. 6706–6713, Jan. 1990, doi: 10.1021/BI00480A021/ASSET/BI00480A021.FP.PNG\_V03.
- [223] R. E. J. Mitchel, I. M. Chaiken, and E. L. Smith, “The Complete Amino Acid Sequence of Papain: ADDITIONS AND CORRECTIONS,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 245, no. 14, pp. 3485–3492, Jul. 1970, doi: 10.1016/S0021-9258(18)62954-0.
- [224] M. R. Alecio, M. L. Dann, and G. Lowe, “The specificity of the S1’ subsite of papain,” *Biochem J*, vol. 141, no. 2, pp. 495–501, 1974, doi: 10.1042/BJ1410495.

- [225] H. Tsuge *et al.*, “Inhibition mechanism of cathepsin L-specific inhibitors based on the crystal structure of papain-CLIK148 complex,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 266, no. 2, pp. 411–416, Dec. 1999, doi: 10.1006/BBRC.1999.1830.
- [226] L. W. Cohen, V. M. Coghlan, and L. C. Dihel, “Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA,” *Gene*, vol. 48, no. 2–3, pp. 219–227, 1986, doi: 10.1016/0378-1119(86)90080-6.
- [227] F. Edwin and M. v. Jagannadham, “Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1479, no. 1–2, pp. 69–82, Jun. 2000, doi: 10.1016/S0167-4838(00)00062-5.
- [228] S. Ghosh, “Physicochemical and conformational studies of papain/sodium dodecyl sulfate system in aqueous medium,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 264, no. 1–3, pp. 6–16, Aug. 2005, doi: 10.1016/J.COLSURFA.2005.02.032.
- [229] I. G. Kamphuis, K. H. Kalk, M. B. A. Swarte, and J. Drenth, “Structure of papain refined at 1.65 Å resolution,” *J Mol Biol*, vol. 179, no. 2, pp. 233–256, Oct. 1984, doi: 10.1016/0022-2836(84)90467-4.
- [230] T. Madej *et al.*, “MMDB: 3D structures and macromolecular interactions,” *Nucleic Acids Res*, vol. 40, no. Database issue, Jan. 2012, doi: 10.1093/NAR/GKR1162.
- [231] J. Huet, Y. Looze, K. Bartik, V. Raussens, R. Wintjens, and P. Boussard, “Structural characterization of the papaya cysteine proteinases at low pH,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 341, no. 2, pp. 620–626, Mar. 2006, doi: 10.1016/J.BBRC.2005.12.210.
- [232] A. Naeem, S. Fatima, and R. H. Khan, “Characterization of partially folded intermediates of papain in presence of cationic, anionic, and nonionic detergents at low pH,” *Biopolymers*, vol. 83, no. 1, pp. 1–10, Sep. 2006, doi: 10.1002/BIP.20520.
- [233] J. Chamani, M. Heshmati, O. Rajabi, and K. Parivar, “Thermodynamic Study of Intermediate State of Papain Induced by n-Alkyl Sulfates at Two Different pH Values: A Spectroscopic Approach,” *The Open Surface Science Journal*, vol. 1, no. 1, pp. 20–29, Apr. 2014, doi: 10.2174/1876531900901010020.
- [234] D. E. Stevenson and A. C. Storer, “Papain in organic solvents: determination of conditions suitable for biocatalysis and the effect on substrate specificity and inhibition,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 37, no. 6, pp. 519–527, 1991, doi: 10.1002/BIT.260370605.
- [235] B. Raskovic, N. Babic, J. Korac, and N. Polovic, “Evidence of beta-sheet structure induced kinetic stability of papain upon thermal and sodium dodecyl sulfate denaturation,” *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 80, no. 5, pp. 613–625, 2015.
- [236] M. Manning and W. Colón, “Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure,” *Biochemistry*, vol. 43, no. 35, pp. 11248–11254, Sep. 2004, doi: 10.1021/BI0491898.
- [237] D. J. Buttle *et al.*, “Interactions of papaya proteinase IV with inhibitors,” *FEBS Lett*, vol. 262, no. 1, pp. 58–60, Mar. 1990, doi: 10.1016/0014-5793(90)80153-A.
- [238] “EFFECT OF PAPAINE ON TENDERIZATION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF SPENT HEN MEAT CUTS.” <https://arccjournals.com/journal/indian-journal-of-animal-research/ARCC3176> (accessed Mar. 02, 2023).

- [239] H. A. Shouket *et al.*, “Study on industrial applications of papain: A succinct review,” *E&ES*, vol. 614, no. 1, p. 012171, Dec. 2020, doi: 10.1088/1755-1315/614/1/012171.
- [240] K. Abu-Alruz, A. S. Mazahreh, J. M. Quasem, R. K. Hejazin, and J. M. El-Qudah, “Effect of Proteases on Meltability and Stretchability of Nabulsi Cheese,” *Am J Agric Biol Sci*, vol. 4, no. 3, pp. 173–178, Sep. 2009, doi: 10.3844/AJABSSP.2009.173.178.
- [241] M. L. H. Flindt, “Allergy to alpha-amylase and papain,” *Lancet*, vol. 1, no. 8131, pp. 1407–1408, Jun. 1979, doi: 10.1016/S0140-6736(79)92042-7.
- [242] D. C. Williams, V. C. Sgarbieri, and J. R. Whitaker, “Proteolytic Activity in the Genus *Ficus*,” *Plant Physiol*, vol. 43, no. 7, pp. 1083–1088, Jul. 1968, doi: 10.1104/PP.43.7.1083.
- [243] V. C. Sgarbieri, S. M. Gupte, D. E. Kramer, and J. R. Whitaker, “*Ficus* Enzymes: I. SEPARATION OF THE PROTEOLYTIC ENZYMES OF *FICUS CARICA* AND *FICUS GLABRATA* LATICES,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 239, no. 7, pp. 2170–2177, Jul. 1964, doi: 10.1016/S0021-9258(20)82216-9.
- [244] T. Boller, “Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms,” 1986, doi: 10.3/JQUERY-UIJS.
- [245] A. A. Kembhavi, D. J. Buttle, C. G. Knight, and A. J. Barrett, “The Two Cysteine Endopeptidases of Legume Seeds: Purification and Characterization by Use of Specific Fluorometric Assays,” *Arch Biochem Biophys*, vol. 303, no. 2, pp. 208–213, Jun. 1993, doi: 10.1006/ABBI.1993.1274.
- [246] G. N. Rudenskaya *et al.*, “Taraxalisin – a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb s.l.,” *FEBS Lett*, vol. 437, no. 3, pp. 237–240, Oct. 1998, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01243-5.
- [247] B. Raskovic, J. Lazic, and N. Polovic, “Characterisation of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening,” *J Sci Food Agric*, vol. 96, no. 2, pp. 576–582, Jan. 2016, doi: 10.1002/JSFA.7126.
- [248] Y. Pan, Y. Yang, Y. Pang, Y. Shi, Y. Long, and H. Zheng, “Enhancing the peroxidase-like activity of ficin via heme binding and colorimetric detection for uric acid,” *Talanta*, vol. 185, pp. 433–438, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.TALANTA.2018.04.005.
- [249] K. B. Devaraj, P. R. Kumar, and V. Prakash, “Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*,” *J Agric Food Chem*, vol. 56, no. 23, pp. 11417–11423, Dec. 2008, doi: 10.1021/JF802205A.
- [250] J. R. WHITAKER, “PROPERTIES OF THE PROTEOLYTIC ENZYMES OF COMMERCIAL FICIN,” *J Food Sci*, vol. 22, no. 5, pp. 483–493, Sep. 1957, doi: 10.1111/J.1365-2621.1957.TB17507.X.
- [251] B. H. Robbins, “A PROTEOLYTIC ENZYME IN FICIN, THE ANTHELMINTIC PRINCIPLE OF LECHE DE HIGUERON,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 87, no. 2, pp. 251–257, Jun. 1930, doi: 10.1016/S0021-9258(18)76858-0.
- [252] A. Walti, “Crystalline Ficin,” *J Am Chem Soc*, vol. 60, no. 2, p. 493, Feb. 1938, doi: 10.1021/JA01269A508/ASSET/JA01269A508.FP.PNG\_V03.

- [253] J. T. Johansen and M. Ottesen, "The proteolytic degradation of the B-chain of oxidized insulin by papain, chymopapain and papaya peptidase.," *C R Trav Lab Carlsberg*, vol. 36, no. 15, pp. 265–283, 1968.
- [254] P. T. Englund, T. P. King, L. C. Craig, and A. Walti, "Studies on Ficin. I. Its Isolation and Characterization," *Biochemistry*, vol. 7, no. 1, pp. 163–175, Jan. 1968, doi: 10.1021/BI00841A021/ASSET/BI00841A021.FP.PNG\_V03.
- [255] S. S. Husain and G. Lowe, "The amino acid sequence around the active-site cysteine and histidine residues of stem bromelain," *Biochemical Journal*, vol. 117, no. 2, pp. 341–346, Apr. 1970, doi: 10.1042/BJ1170341.
- [256] I. Björk and K. Ylinenjärvi, "Interaction between Chicken Cystatin and the Cysteine Proteinases Actinidin, Chymopapain A, and Ficin," *Biochemistry*, vol. 29, no. 7, pp. 1770–1776, Feb. 1990, doi: 10.1021/BI00459A016/ASSET/BI00459A016.FP.PNG\_V03.
- [257] I. Björk, E. Alriksson, and K. Ylinenjärvi, "Kinetics of Binding of Chicken Cystatin to Papain," *Biochemistry*, vol. 28, no. 4, pp. 1568–1573, 1989, doi: 10.1021/BI00430A022/ASSET/BI00430A022.FP.PNG\_V03.
- [258] S. Haesaerts, J. A. Rodriguez Buitrago, R. Loris, D. Baeyens-Volant, and M. Azarkan, "Crystallization and preliminary X-ray analysis of four cysteine proteases from *Ficus carica* latex," *urn:issn:2053-230X*, vol. 71, no. 4, pp. 459–465, Mar. 2015, doi: 10.1107/S2053230X15005014.
- [259] H. Zare, A. A. Moosavi-Movahedi, M. Salami, M. Mirzaei, A. A. Saboury, and N. Sheibani, "Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex," *Phytochemistry*, vol. 87, pp. 16–22, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.phytochem.2012.12.006.
- [260] F. Cormier, C. Charest, and C. Dufresne, "Partial purification and properties of proteases from fig (*Ficus carica*) callus cultures," *Biotechnol Lett*, vol. 11, no. 11, pp. 797–802, Nov. 1989, doi: 10.1007/BF01026100/METRICS.
- [261] B. Raskovic, O. Bozovic, R. Prodanovic, V. Niketic, and N. Polovic, "Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex," *J Biosci Bioeng*, vol. 118, no. 6, pp. 622–627, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.020.
- [262] J. Milošević *et al.*, "Isolation, identification, and stability of Ficin 1c isoform from fig latex," *New Journal of Chemistry*, vol. 44, no. 36, pp. 15716–15723, Sep. 2020, doi: 10.1039/D0NJ02938F.
- [263] P. Mokrejs, F. Langmaier, M. Mladek, D. Janacova, K. Kolomaznik, and V. Vasek, "Extraction of collagen and gelatine from meat industry by-products for food and non food uses," <https://doi.org/10.1177/0734242X07081483>, vol. 27, no. 1, pp. 31–37, Feb. 2009, doi: 10.1177/0734242X07081483.
- [264] C. K. KANG and E. E. RICE, "DEGRADATION OF VARIOUS MEAT FRACTIONS BY TENDERIZING ENZYMES," *J Food Sci*, vol. 35, no. 5, pp. 563–565, Sep. 1970, doi: 10.1111/J.1365-2621.1970.TB04809.X.
- [265] G. D. M. P. Madhusankha and R. C. N. Thilakarathna, "Meat tenderization mechanism and the impact of plant exogenous proteases: A review," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 14, no. 2, p. 102967, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.ARABJC.2020.102967.

- [266] E. Allen Foegeding and D. K. Larick, "Tenderization of beef with bacterial collagenase," *Meat Sci*, vol. 18, no. 3, pp. 201–214, Jan. 1986, doi: 10.1016/0309-1740(86)90034-3.
- [267] P. I. Haris and D. Chapman, "Analysis of polypeptide and protein structures using Fourier transform infrared spectroscopy," *Methods Mol Biol*, vol. 22, pp. 183–202, 1994, doi: 10.1385/0-89603-232-9:183.
- [268] F. Siebert, "Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems," *Methods Enzymol*, vol. 246, no. C, pp. 501–526, Jan. 1995, doi: 10.1016/0076-6879(95)46022-5.
- [269] G. A. Caputo and E. London, "Handbook of vibrational spectroscopy, volumes 1–5. Edited by J. M. Chalmers and P. R. Griffiths. John Wiley & Sons, Chichester, 2002, pp. 3862," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 36, no. 3, pp. 271–271, Mar. 2005, doi: 10.1002/JRS.1309.
- [270] R. B. Dyer, F. Gai, W. H. Woodruff, R. Gilmanishin, and R. H. Callender, "Infrared Studies of Fast Events in Protein Folding," *Acc Chem Res*, vol. 31, no. 11, pp. 709–716, 1998, doi: 10.1021/AR970343A/ASSET/IMAGES/LARGE/AR970343AF00003.JPEG.
- [271] D. Reinstä, H. Fabian, and D. Naumann, "New Structural Insights Into the Refolding of Ribonuclease T1 as Seen by Time-Resolved Fourier-Transform Infrared Spectroscopy," *Proteins*, vol. 34, pp. 303–316, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19990215)34:3.
- [272] E. Kauffmann, N. C. Darnton, R. H. Austin, C. Batt, and K. Gerwert, "Lifetimes of intermediates in the  $\beta$ -sheet to  $\alpha$ -helix transition of  $\beta$ -lactoglobulin by using a diffusional IR mixer," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 12, pp. 6646–6649, Jun. 2001, doi: 10.1073/PNAS.101122898/ASSET/836C1BAA-C0D4-4D05-B28D-4B8499A13672/ASSETS/GRAPHIC/PQ1011228005.JPEG.
- [273] "Determination of Secondary Structure in Proteins by FTIR Spectroscopy - JenaLib." [http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE\\_FTIR.html](http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html) (accessed Apr. 28, 2023).
- [274] K. Fahmy, "Application of ATR-FTIR spectroscopy for studies of biomolecular interactions," 2001.
- [275] K. A. Oberg and A. L. Fink, "A new attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy method for the study of proteins in solution," *Anal Biochem*, vol. 256, no. 1, pp. 92–106, Feb. 1998, doi: 10.1006/ABIO.1997.2486.
- [276] C. Duy and J. Fitter, "How Aggregation and Conformational Scrambling of Unfolded States Govern Fluorescence Emission Spectra," *Biophys J*, vol. 90, no. 10, pp. 3704–3711, May 2006, doi: 10.1529/BIOPHYSJ.105.078980.
- [277] R. W. Alston, M. Lasagna, G. R. Grimsley, J. M. Scholtz, G. D. Reinhart, and C. N. Pace, "Peptide Sequence and Conformation Strongly Influence Tryptophan Fluorescence," *Biophys J*, vol. 94, no. 6, pp. 2280–2287, Mar. 2008, doi: 10.1529/BIOPHYSJ.107.116921.
- [278] N. v. Visser, A. H. Westphal, A. van Hoek, C. P. M. van Mierlo, A. J. W. G. Visser, and H. van Amerongen, "Tryptophan-Tryptophan Energy Migration as a Tool to Follow Apoflavodoxin Folding," *Biophys J*, vol. 95, no. 5, p. 2462, Sep. 2008, doi: 10.1529/BIOPHYSJ.108.132001.
- [279] G. A. Caputo and E. London, "Cumulative effects of amino acid substitutions and hydrophobic mismatch upon the transmembrane stability and conformation of hydrophobic  $\alpha$ -helices,"

*Biochemistry*, vol. 42, no. 11, pp. 3275–3285, Mar. 2003, doi: 10.1021/BI026697D/ASSET/IMAGES/LARGE/BI026697DF00006.JPEG.

- [280] J. Slavík, “Anilino-naphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, vol. 694, no. 1, pp. 1–25, Aug. 1982, doi: 10.1016/0304-4157(82)90012-0.
- [281] S. Guha and B. Bhattacharyya, “Partially Folded Intermediate during Tubulin Unfolding: Its Detection and Spectroscopic Characterization,” *Biochemistry*, vol. 34, no. 21, pp. 6925–6931, 1995, doi: 10.1021/BI00021A003/ASSET/BI00021A003.FP.PNG\_V03.
- [282] E. Bismuto, E. Gratton, and D. C. Lamb, “Dynamics of ANS Binding to Tuna Apomyoglobin Measured with Fluorescence Correlation Spectroscopy,” *Biophys J*, vol. 81, no. 6, pp. 3510–3521, Dec. 2001, doi: 10.1016/S0006-3495(01)75982-6.
- [283] T. Mazaheri, B. R. H. Cervantes-Huamán, M. Bermúdez-Capdevila, C. Ripolles-Avila, and J. J. Rodríguez-Jerez, “*Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen?,” *Microorganisms*, vol. 9, no. 1, pp. 1–19, 2021, doi: 10.3390/MICROORGANISMS9010181.
- [284] D. Leong, A. Alvarez-Ordóñez, and K. Jordan, “Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland,” *Front Microbiol*, vol. 5, no. AUG, p. 436, Aug. 2014, doi: 10.3389/FMICB.2014.00436/BIBTEX.
- [285] L. Lobel, N. Sigal, I. Borovok, B. R. Belitsky, A. L. Sonenshein, and A. A. Herskovits, “The metabolic regulator CodY links *Listeria monocytogenes* metabolism to virulence by directly activating the virulence regulatory gene *prfA*,” *Mol Microbiol*, vol. 95, no. 4, pp. 624–644, Feb. 2015, doi: 10.1111/MMI.12890.
- [286] S. T. Ooi and B. Lorber, “Gastroenteritis Due to *Listeria monocytogenes*,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 40, pp. 1327–1359, 2005, Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/cid/article/40/9/1327/371654>
- [287] J. A. Vázquez-Boland *et al.*, “*Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 14, no. 3, pp. 584–640, 2001, doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
- [288] E. J. Wing and S. H. Gregory, “*Listeria monocytogenes*: Clinical and Experimental Update,” *J Infect Dis*, vol. 185, no. Supplement\_1, pp. S18–S24, Feb. 2002, doi: 10.1086/338465.
- [289] J. W. F. Law, N. S. Ab Mutalib, K. G. Chan, and L. H. Lee, “An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food,” *Front Microbiol*, vol. 6, no. NOV, 2015, doi: 10.3389/FMICB.2015.01227.
- [290] C. O. Gill, M. Badoni, and J. C. McGinnis, “Microbiological sampling of meat cuts and manufacturing beef by excision or swabbing,” *J Food Prot*, vol. 64, no. 3, pp. 325–334, 2001, doi: 10.4315/0362-028X-64.3.325.
- [291] C. O. Gill, J. C. McGinnis, S. Barbut, D. Young, N. Lee, and K. Rahn, “Microbiological conditions of moisture-enhanced chicken breasts prepared at a poultry packing plant,” *J Food Prot*, vol. 67, no. 12, pp. 2675–2681, 2004, doi: 10.4315/0362-028X-67.12.2675.



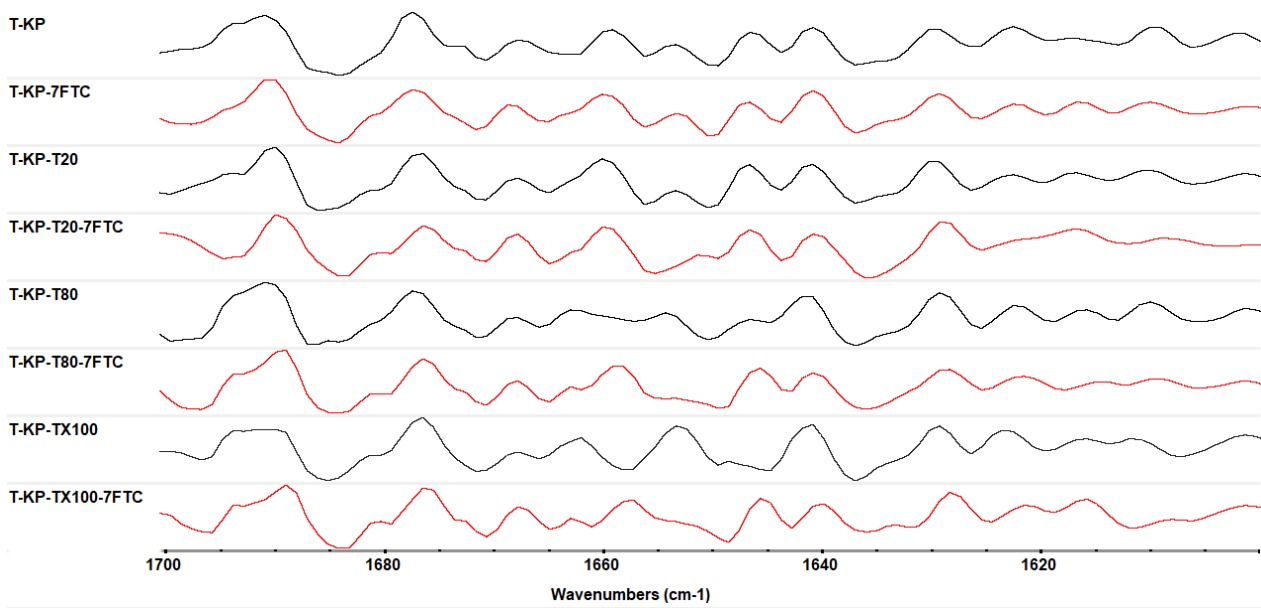
- [292] A. N. Sharpe, C. I. bin Kingombe, P. Watney, L. J. Parrington, I. Dudas, and M. P. Diotte, “Efficient Nondestructive Sampler for Carcasses and Other Surfaces,” *J Food Prot*, vol. 59, no. 7, pp. 757–763, 1996, doi: 10.4315/0362-028X-59.7.757.
- [293] J. Weiss, M. Gibis, V. Schuh, and H. Salminen, “Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products,” *Meat Sci*, vol. 86, no. 1, pp. 196–213, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.meatsci.2010.05.008.
- [294] O. Kaiser *et al.*, “Dissociated Neurons and Glial Cells Derived from Rat Inferior Colliculi after Digestion with Papain,” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e80490, Dec. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0080490.
- [295] Y. C. Sim *et al.*, “Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products,” *Biotechnol Lett*, vol. 22, no. 2, pp. 137–140, 2000, doi: 10.1023/A:1005670323912.
- [296] S. S. Khaparde and R. S. Singhal, “Chemically modified papain for applications in detergent formulations,” *Bioresour Technol*, vol. 78, no. 1, pp. 1–4, 2001, doi: 10.1016/S0960-8524(00)00178-4.
- [297] C. K. Nielsen, J. Kjems, T. Mygind, T. Snabe, and R. L. Meyer, “Effects of tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media,” *Front Microbiol*, vol. 7, no. NOV, p. 1878, Nov. 2016, doi: 10.3389/FMICB.2016.01878/BIBTEX.
- [298] M. S. R. Fachmann *et al.*, “Detection of Salmonella enterica in Meat in Less than 5 Hours by a Low-Cost and Noncomplex Sample Preparation Method,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 83, no. 5, 2017, doi: 10.1128/AEM.03151-16.
- [299] K. Hayama, N. Maruyama, and S. Abe, “Cell preparation method with trypsin digestion for counting of colony forming units in Candida albicans-infected mucosal tissues,” *Med Mycol*, vol. 87, no. 8, pp. 858–862, Nov. 2012, doi: 10.3109/13693786.2012.683538.
- [300] G. L. Pettipher, R. Mansell, C. H. McKinnon, and C. M. Cousins, “Rapid Membrane Filtration-Epifluorescent Microscopy Technique for Direct Enumeration of Bacteria in Raw Milk,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 39, no. 2, p. 423, 1980, doi: 10.1128/AEM.39.2.423-429.1980.
- [301] S. RAZIN and M. ARGAMAN, “Lysis of Mycoplasma, bacterial protoplasts, spheroplasts and L-forms by various agents.,” *J Gen Microbiol*, vol. 30, pp. 155–172, 1963, doi: 10.1099/00221287-30-1-155.
- [302] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal Biochem*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [303] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,” *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970, doi: 10.1038/227680A0.
- [304] D. M. BOLLAG, “Isoelectric focusing and two dimensional gel electrophoresis,” *Protein Method.*, pp. 161–174, 1991, [Online]. Available: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012913176/en/>
- [305] “GelAnalyzer.” <http://www.gelanalyzer.com/?i=1#section-citation> (accessed Mar. 02, 2023).
- [306] E. Cao, Y. Chen, Z. Cui, and P. R. Foster, “Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 82, no. 6, pp. 684–690, Jun. 2003, doi: 10.1002/BIT.10612.

- [307] B. Rašković, N. Babić, J. Korać, and N. Polović, “Evidence of  $\beta$ -sheet structure induced kinetic stability of papain upon thermal and sodium dodecyl sulfate denaturation,” *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 80, no. 5, pp. 613–625, 2015, doi: 10.2298/JSC140901007R.
- [308] C. Petibois, G. Gouspillou, K. Wehbe, J.-P. Delage, and G. Déléris, “Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 386, no. 7, pp. 1961–1966, 2006, doi: 10.1007/s00216-006-0828-0.
- [309] S. J. Prestrelski, N. Tedeschi, T. Arakawa, and J. F. Carpenter, “Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers,” *Biophys J*, vol. 65, no. 2, pp. 661–671, 1993, doi: 10.1016/S0006-3495(93)81120-2.
- [310] K. Ruan, R. Lange, F. Meersman, K. Heremans, and C. Balny, “Fluorescence and FTIR study of the pressure-induced denaturation of bovine pancreas trypsin,” *Eur J Biochem*, vol. 265, no. 1, pp. 79–85, Oct. 1999, doi: 10.1046/J.1432-1327.1999.00665.X.
- [311] J. Milošević, J. Petrić, B. Jovčić, B. Janković, and N. Polović, “Exploring the potential of infrared spectroscopy in qualitative and quantitative monitoring of ovalbumin amyloid fibrillation,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 229, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.saa.2019.117882.
- [312] M. G. CACACE, E. M. LANDAU, and J. J. RAMSDEN, “The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena,” *Q Rev Biophys*, vol. 30, no. 3, pp. 241–277, 1997, doi: DOI: 10.1017/S0033583597003363.
- [313] A. P. dos Santos, A. Diehl, and Y. Levin, “Surface Tensions, Surface Potentials, and the Hofmeister Series of Electrolyte Solutions,” *Langmuir*, vol. 26, no. 13, pp. 10778–10783, Jul. 2010, doi: 10.1021/la100604k.
- [314] K. A. Pikal-Cleland, J. L. Cleland, T. J. Anchordoquy, and J. F. Carpenter, “Effect of glycine on pH changes and protein stability during freeze-thawing in phosphate buffer systems,” *J Pharm Sci*, vol. 91, no. 9, pp. 1969–1979, Sep. 2002, doi: 10.1002/jps.10184.
- [315] G. Gómez, M. J. Pikal, and N. Rodríguez-Hornedo, “Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from-equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions,” *Pharm Res*, vol. 18, no. 1, pp. 90–97, 2001, doi: 10.1023/A:1011082911917.
- [316] Y. Orii and M. Morita, “Measurement of the pH of frozen buffer solutions by using pH indicators,” *J Biochem*, vol. 81, no. 1, pp. 163–168, 1977, doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A131431.
- [317] B. Rašković, M. Popović, S. Ostojić, B. Ancrossed D Signelković, V. Tešević, and N. Polović, “Fourier transform infrared spectroscopy provides an evidence of papain denaturation and aggregation during cold storage,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 150, pp. 238–246, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.saa.2015.05.061.
- [318] J. Milošević, B. Janković, R. Prodanović, and N. Polović, “Comparative stability of ficin and papain in acidic conditions and the presence of ethanol,” *Amino Acids*, 2019, doi: 10.1007/S00726-019-02724-3.
- [319] Y. Cordeiro *et al.*, “Fourier Transform Infrared Spectroscopy Provides a Fingerprint for the Tetramer and for the Aggregates of Transthyretin,” *Biophys J*, vol. 91, no. 3, pp. 957–967, Aug. 2006, doi: 10.1529/biophysj.106.085928.

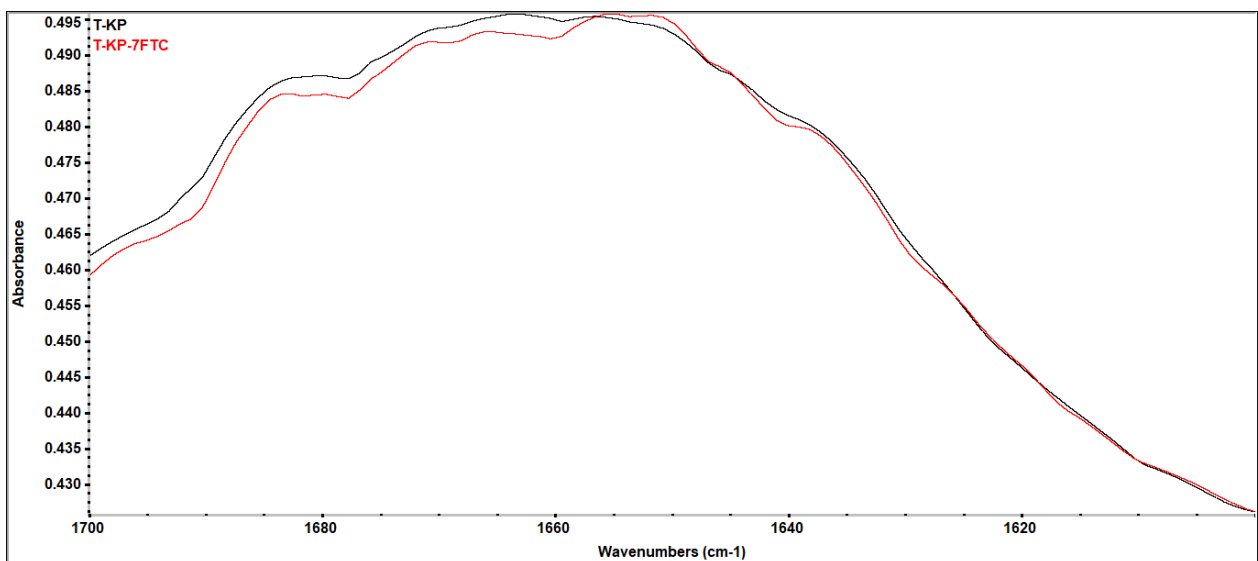
- [320] M. Brumano and M. Oliveira, “Urea-Induced Denaturation of  $\alpha$ -Trypsin: An Evidence for a Molten Globule State,” *Protein Pept Lett*, vol. 11, no. 2, pp. 133–140, Mar. 2005, doi: 10.2174/0929866043478257.
- [321] F. Meersman, L. Smeller, and K. Heremans, “Comparative Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of Cold-, Pressure-, and Heat-Induced Unfolding and Aggregation of Myoglobin,” *Biophys J*, vol. 82, no. 5, pp. 2635–2644, May 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75605-1.
- [322] N. Martins, E. Ferreira, K. Torres, and M. M. Santoro, “The Denaturation of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -Bovine Trypsin at Ph 3.0: Evidence of Intermediates,” *Protein Pept Lett*, vol. 10, no. 1, pp. 73–81, Mar. 2005, doi: 10.2174/0929866033408336.
- [323] K. Ruan, R. Lange, N. Bec, and C. Balny, “A Stable Partly Denatured State of Trypsin Induced by High Hydrostatic Pressure,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 239, no. 1, pp. 150–154, 1997, doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7313>.
- [324] K. Vamvaca, B. Vögeli, P. Kast, K. Pervushin, and D. Hilvert, “An enzymatic molten globule: Efficient coupling of folding and catalysis,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 35, pp. 12860–12864, Aug. 2004, doi: 10.1073/PNAS.0404109101.
- [325] M. Guncheva and E. Stippler, “Effect of Four Commonly Used Dissolution Media Surfactants on Pancreatin Proteolytic Activity,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 18, no. 4, pp. 1402–1407, 2017, doi: 10.1208/s12249-016-0618-8.
- [326] S. K. Singh and N. Kishore, “Thermodynamic insights into the binding of triton X-100 to globular proteins: A calorimetric and spectroscopic investigation,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 19, pp. 9728–9737, May 2006, doi: 10.1021/JP0608426.
- [327] K. Nishimura, K. Higashiya, N. Ueshima, T. Abe, and K. Yasukawa, “Characterization of proteases activities in *Ficus carica* cultivars,” *J Food Sci*, vol. 85, no. 3, pp. 535–544, Mar. 2020, doi: 10.1111/1750-3841.15028.
- [328] S. Kitajima *et al.*, “Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (*Ficus carica*),” *Planta*, vol. 247, no. 6, pp. 1423–1438, Jun. 2018, doi: 10.1007/S00425-018-2880-3.
- [329] D. E. Woolley, “Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion,” *Cancer and Metastasis Review*, vol. 3, no. 4, pp. 361–372, Dec. 1984, doi: 10.1007/BF00051460.
- [330] A. Pielecz, “Temperature-dependent FTIR spectra of collagen and protective effect of partially hydrolysed fucoidan,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 118, pp. 287–293, 2014, doi: 10.1016/j.saa.2013.08.056.
- [331] R. J. Atkinson, R. L. Parfitt, and R. S. C. Smart, “Infra-red study of phosphate adsorption on goethite,” *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, vol. 70, pp. 1472–1479, 1974, doi: 10.1039/F19747001472.
- [332] T. Ahmad *et al.*, “Autolysis of bovine skin, its endogenous proteases, protease inhibitors and their effects on quality characteristics of extracted gelatin,” *Food Chem*, vol. 265, pp. 1–8, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.046.

- [333] G. L. Pettipher and U. M. Rodrigues, "Rapid enumeration of microorganisms in foods by the direct epifluorescent filter technique," *Appl Environ Microbiol*, vol. 44, no. 4, pp. 809–813, 1982, doi: 10.1128/AEM.44.4.809-813.1982.
- [334] B. G. Shaw, C. D. Harding, W. H. Hudson, and L. Farr, "Rapid Estimation of Microbial Numbers on Meat and Poultry by the Direct Epifluorescent Filter Technique," *J Food Prot*, vol. 50, no. 8, pp. 652–658, Aug. 1987, doi: 10.4315/0362-028X-50.8.652.
- [335] V. Jasson, L. Jacxsens, P. Luning, A. Rajkovic, and M. Uyttendaele, "Alternative microbial methods: An overview and selection criteria," *Food Microbiol*, vol. 27, no. 6, pp. 710–730, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.fm.2010.04.008.
- [336] K. B. Devaraj, P. R. Kumar, and V. Prakash, "Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride," *Process Biochemistry*, vol. 46, no. 2, pp. 458–464, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.procbio.2010.09.016.
- [337] A. A. Kortt and S. Hamilton, "Ficins (E.C. 3.4.22.3). Purification and Characterization of the Enzymic Components of the Latex of *Ficus Glabrata*," *Biochemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 2023–2028, May 1974, doi: 10.1021/BI00707A004.
- [338] M. Nasabi, M. Labbafi, M. E. Mousavi, and A. Madadlou, "Effect of salts and nonionic surfactants on thermal characteristics of egg white proteins," *Int J Biol Macromol*, vol. 102, pp. 970–976, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.102>.

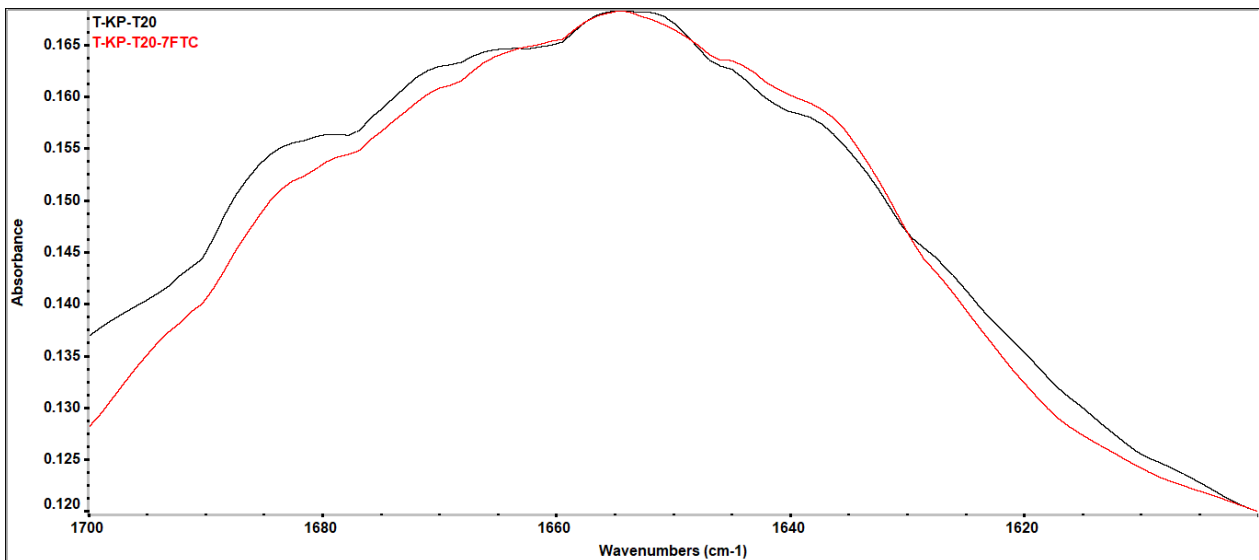
## 9. PRILOZI



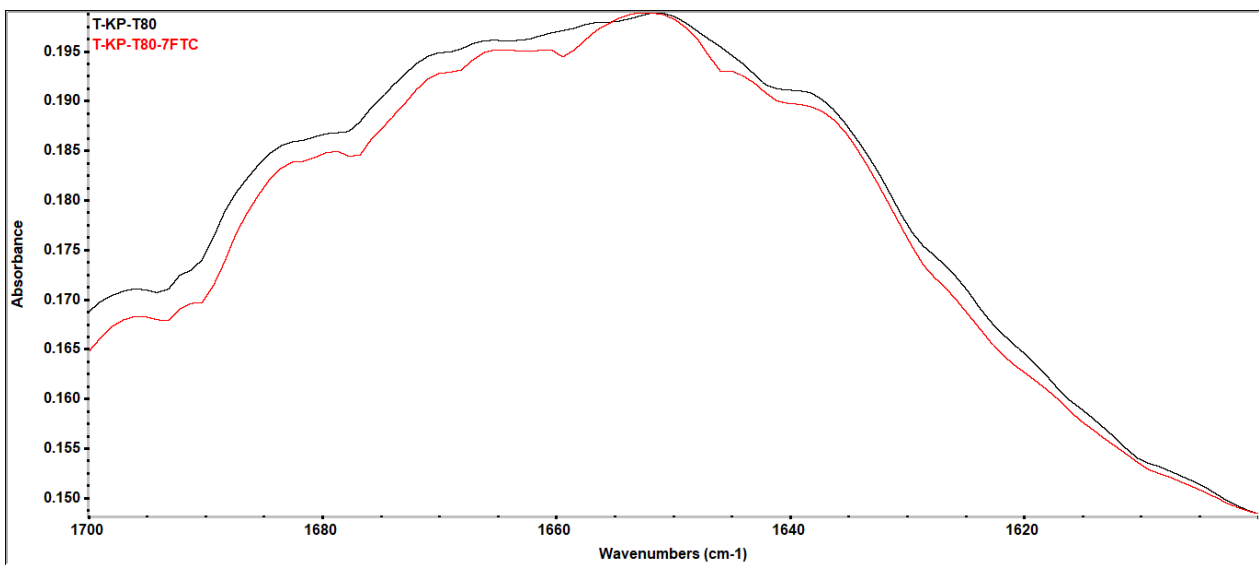
**Prilog 1.** Amidni I region drugih izvoda FTIR spektara tripsina pre i nakon 7 ciklusa/zamrzavanja (FTC) u 100 mM kalijum-fosfatnom puferu (KP) sa surfaktantima (Tween 20 (T20); Tween 80 (T80); Triton X-100). (TX100)).



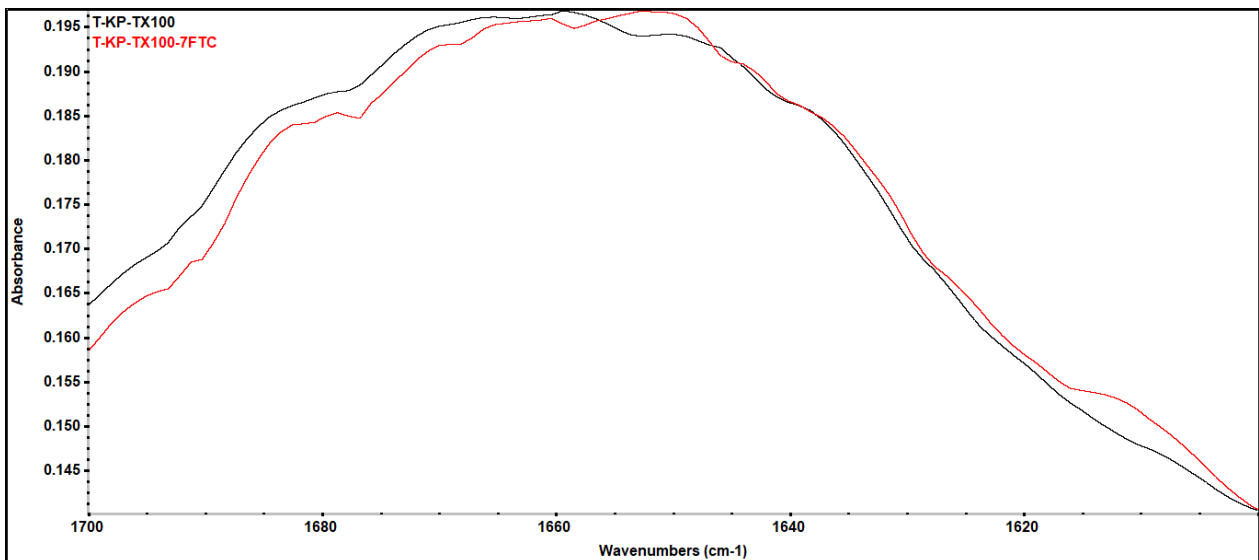
**Prilog 2.** Amidni I region FTIR spektara uzoraka tripsina, pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (FTC) u 100 mM kalijum-fosfatnog pufera (KP).



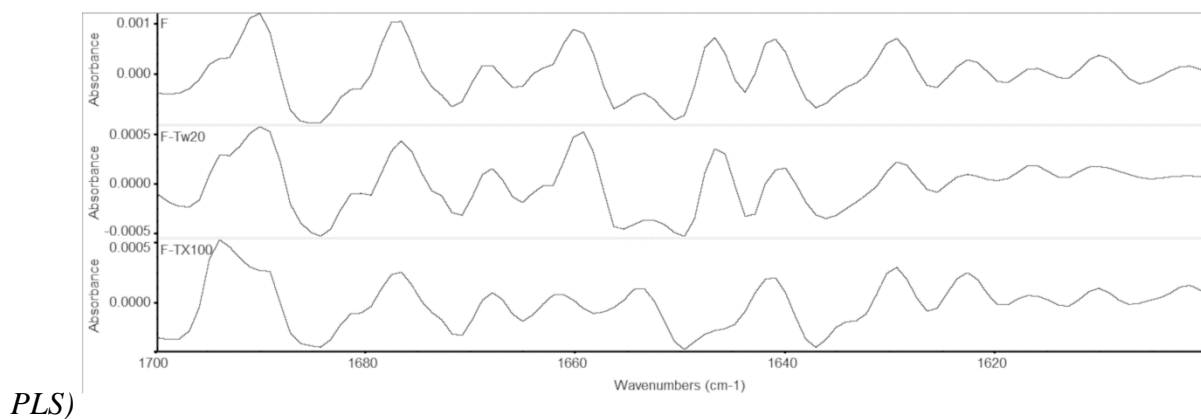
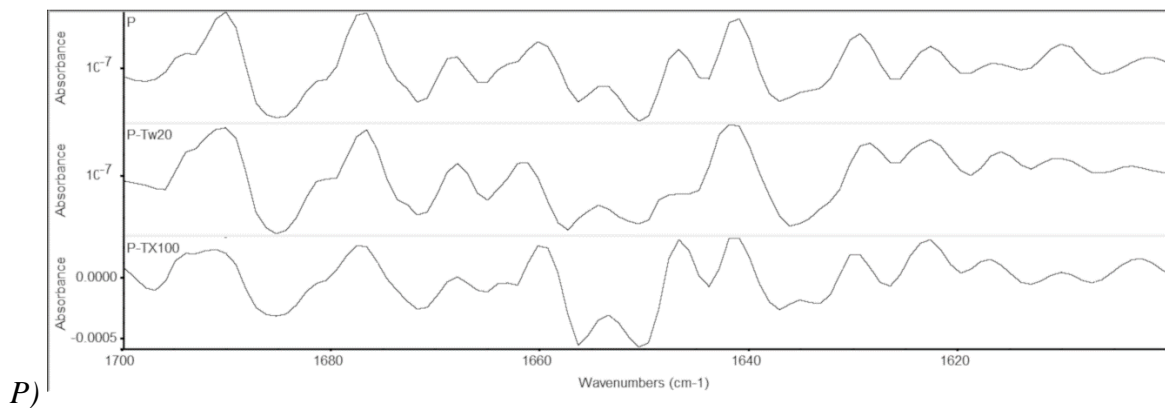
**Prilog 3.** Amidni I region FTIR spektara uzoraka tripsina, pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (FTC) u 100 mM kalijum-fosfatnog pufera (KP) sa 0.1 % Tween 20 (T20).



**Prilog 4.** Amidni I region FTIR spektara uzoraka tripsina, pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (FTC) u 100 mM kalijum-fosfatnog pufera (KP) sa 0.1 % Tween 80 (T80).



**Prilog 5.** Amidni I region FTIR spektara uzoraka tripsina, pre i nakon 7 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (FTC) u 100 mM kalijum-fosfatnog pufera (KP) sa 0.1 % Triton X-100 (TX100).



**Prilog 6.** Amidni I region drugih izvoda FTIR spektara za uzorke papaina (P) i proteina lateksa smokve (PLS) u prisustvu 0,1% nejonskih surfaktanata (Tw20 – Tween20, TX100 – Triton X 100).

## KRATKA BIOGRAFIJA

Saša Vatić rođen je 23.10.1988. godine u Negotinu. Diplomirao je 2012. na studijskom programu Hemija na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Master studije na Katedri za biohemiju matičnog fakulteta, studijskog programa Hemija, završio je 2014. godine i iste godine upisao doktorske studije, studijskog programa Biohemija. Tokom 2016, kao gostujući student, boravio je na Departmanu za farmaceutsku hemiju, Univerziteta u Beču, gde se specializovao u oblasti proteomike. Od 2018 je asistent na Katedri za hemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Objavljeni radovi koji čine deo disertacije:

1. Saša Vatić, Nemanja Mirković, Jelica R. Milošević, Branko Jovčić, Natalija Đ. Polović, „Broad range of substrate specificities in papain and fig latex enzymes preparations improve enumeration of *Listeria monocytogenes*,“ *International Journal of Food Microbiology*, vol 334, no. 108851, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108851>

1. Saša Vatić, Nemanja Mirković, Jelica R. Milošević, Branko Jovčić, Natalija Đ. Polović, „Trypsin activity and freeze-thaw stability in the presence of ions and non-ionic surfactants,“ *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol 131, no. 3, p. 234-240, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.10.010>



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Саша Ватић**

Број индекса: ДБ05/2014

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**„Утицај нејонских сурфактаната на структуру и активност пептидаза“**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 11. 09. 23.

**Потпис аутора**  


## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Саша Ватић**

Број индекса: **ДБ05/2014**

Студијски програм: **Доктор биохемијских наука**

Наслов рада:

**„Утицај нејонских сурфактаната на структуру и активност пептидаза“**


Ментор проф. Др Наталија Половић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањења у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 11. 09. 23.

Потпис аутора  


## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Утицај нејонских сурфактаната на структуру и активност пептидаза“**

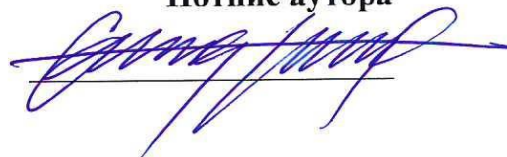
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање. Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Београду, 11.09.23.

Потпис аутора



1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.