



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
UNIVERSITY OF BANJA LUKA
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND MATHEMATICS



mr Jovana Glušac

**BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA PEROKSIDAZA I
TIROZINAZA IZ KUKURUZA I PASULJA I MEHANIZMI
UMREŽAVANJA PROTEINA KATALIZOVANI
PEROKSIDAZAMA I TIROZINAZAMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2019.



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
UNIVERSITY OF BANJA LUKA
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND MATHEMATICS



Jovana Glusac, M.Sc.

**BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CORN AND
BEAN PEROXIDASE AND TYROSINASE AND
MECHANISM OF PROTEIN CROSS-LINKING**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2019

Mentori: dr Biljana Kukavica, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet Bosne i Hercegovine; dr Ayelet Fishman, redovni profesor, Department of Biotechnology & Food Engineering, Technion-Israel Institute of Technology Haifa, Israel

Naslov doktorske disertacije: Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama

Rezime: Dvije frakcije peroksidaza Klase III (POX, EC 1.11.1.7), solubilne i jonski vezane za ćelijski zid, djelimično su prečišćene iz korijena pasulja i kukuruza i biohemijski okarakterisane. Prema izmjerenim K_m , najveći afinitet peroksidaza je pronađen za H_2O_2 , dok je najveća supstratna specifičnost izmjerena sa kafeičnom kiselinom i za solubilne i za jonske POX. Približne molekulske mase POX-a u njihovoj terciarnoj (prirodnoj) strukturi utvrđene su modifikovanom SDS elektroforezom, dok je identitet i pI različitih enzimskih traka određen LC-MS/MS analizom. Pored toga, ispitana je sposobnost solubilnih i jonskih frakcija kukuruza i pasulja da umrežavaju proteine krompira. Dobijeni rezultati SDS-PAGE pokazali su da su solubilne POXs umrežile proteine krompira, naročito patatin, globularni protein, sa i bez prisustva H_2O_2 . Da bi se ispitala uloga fenolnih jedinjenja kao medijatora u umrežavanju, komercijalna peroksidaze iz rena (HRP) sa i bez dodatka kafeične kiseline je korištena za umrežavanje proteina krompira. Zbog odsustva aktivnosti prečišćene polifenoloksidaze ili tirozinaze (EC 1.14.18.1) iz korijena pasulja i kukuruza, u daljem radu vezanom za umrežavanje proteina (krompira, graška i kukuruza) korištena je rekombinantna tirozinaza bakterijskog porijekla izolovana iz *Bacillus megaterium* (TyrBm). Dobijeni rezultati pokazali su da je TyrBm umrežavala pretežno frakcije proteina krompira sa niskim molekulskim masama. Proteini graška, kao i proteini kukuruza bili su dobri supstrati za TyrBm. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pružaju informacije o biohemijskim karakteristikama peroksidaza iz korijena kukuruza i pasulja. Sposobnost peroksidaza i tirozinaza da umrežavaju odabrane biljne proteine pružaju dodatna saznanja o modifikovanju biofizičke strukture proteina kao i o protein-protein interakcijama.

Ključne riječi: solubilne peroksidaze iz korijena pasulja i kukuruza, peroksidaze vezane za ćelijski zid korijena pasulja i kukuruza, tirozinaze, TyrBm, umrežavanje proteina, proteini krompira, fenoli, proteini graška, zein

Naučna oblast: Prirodne nauke

Naučno polje: Biološke nauke

Klasifikaciona oznaka: B 000

Tip odabrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada

Mentors: Biljana Kukavica, PhD, Associate Prof., Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka, Republic of Srpska, Bosna and Herzegovina; Ayelet Fishman, PhD, Full Prof., Department of Biotechnology & Food Engineering, Technion-Israel Institute of Technology Haifa, Israel

Title of the doctoral dissertation: Biochemical characterization of corn and bean peroxidase and tyrosinase and mechanism of protein cross-linking

Summary: The two fractions of Class III peroxidase (POX, EC 1.11.1.7), soluble and ionically bound to the cell wall, were partially purified from bean and corn roots and characterized. According to the measured K_m the peroxidase highest affinity was found for H_2O_2 , while the highest specificity was found for caffeic acid, for both soluble and ionically cell wall bound fractions. Approximate molecular weights of POX in their tertiary (native) structure were determined by modified SDS electrophoresis, while the identity and pI of different enzyme bands was performed using LC-MS/MS analysis. In addition, the ability of corn and bean soluble and ionically bound to the cell wall peroxidase to crosslink native potato proteins was evaluated. The obtained results by SDS-PAGE showed that soluble POXs were able to crosslink potato protein, particularly patatin, a globular protein, with and without the presence of H_2O_2 . To investigate the possible role of phenolic compounds in facilitating crosslinking, commercial horseradish peroxidase (HRP) with/without addition of caffeic acid was used to crosslink potato protein. Furthermore, due to no activity of purified polyphenoloxidase or tyrosinase (EC 1.14.18.1) from bean and corn root, tyrosinase from *Bacillus megaterium* (TyrBm) was used for crosslinking of potato proteins, pea proteins and corn protein, zein. Obtained results showed that TyrBm crosslinked mostly low molecular weight fractions of potato protein. Pea proteins and zein were good substrates for TyrBm. The results obtained in this research showed biochemical characterization of soluble and ionically cell wall bound peroxidase of corn and bean roots. Information provided here improve knowledge of peroxidase and tyrosinase crosslinking properties of plant proteins through the modification of the biophysical structure of protein and could provide additional insight into the protein-protein interaction.

Key words: soluble peroxidase, ionically cell wall bound peroxidase, bean and corn root, potato protein, protein crosslinking, phenolic compounds, tyrosinase, TyrBm, pea protein, zein

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Biological sciences

Classification Code: B 000

Type the selected license Creative Communities: CC BY-NC-ND

Zahvalnica

Mentorima prof. dr Biljani Kukavica i prof. dr Ayelet Fishman, dugujem veliku zahvalnost na razumijevanju, dragocijenoj pomoći i sugestijama tokom izrade ove disertacije, sumiranja i publikovanja rezultata istraživanja. Posebno se zahvaljujem mentoru na podršci da eksperimentalni dio istraživanja svoje doktorske disertacije realizujem na Technionu- Izraelskom institutu tehnologije u laboratoriji prof. dr Ayelet Fishman.

Zahvaljujem se Sivan I., Shalev, Riti, Ilil, Zohar, Batel, Almog, Sivan G., Ayelet H. i svim ostalim članovima laboratorije na nesebičnoj pomoći i divnom vremenu provedenom skupa u Izraelu.

אני שמחה שהייתי חלק מצוות המעבדה המדהים של פרופ' אילת פישמן.
סיון א., שלו, בטל, ריטה, אילאיל, זוהר, אלומג, סיון ג., איילת, המון תודה על זמנים נפלאים במעבדה.
...ותודה רבה לכולכם שעשיתם את השהות שלי בישראל בלתי נשכחת.

Prof. dr Milici Balaban zahvaljujem se na literaturi i korisnim savjetima, a prof. dr Milki Stijepić i prof. dr Radenku Stijepiću zahvaljujem se na podršci tokom rada na mojoj disertaciji. Mireli Boroja i Dini Hasanagiću zahvaljujem se na pomoći tokom rada u laboratoriji. Kolegama Dejanu Dmitroviću, Goranu Šukalu, Milici Lukač, Nataši Vojinović i Dragani Šnjegota zahvaljujem se na savjetima i pomoći tokom nastajanja ove disertacije.

Zahvaljujem se Ministarstvu nauke i tehnologije Republike Srpske, Ministarstvu prosvjete i kulture Republike Srpske, te Visokoj medicinskoj školi u Prijedoru na finansijskoj podršci tokom mog boravka na Technionu.

Članovima Komisije za pregled, ocjenu i odbranu doktorske disertacije, profesoru dr Zoranu Kukriću i profesoru dr Siniši Škondriću, zahvaljujem na čitanju rukopisa i sugestijama.

Na kraju, posebno se zahvaljujem svojoj porodici, prijateljima i Rafał-u, za bezrezervnu i neprocijenjivu pomoć, podršku i razumijevanje.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	3
3. PREGLED LITERATURE	4
3.1. Peroksidaze	4
3.2. Tirozinaze	7
3.3. Tirozinaza iz <i>Bacillus megaterium</i> (TyrBm)	8
3.4. Umrežavanje proteina	10
3.5. Umrežavanje proteina peroksidazama i tirozinazama	11
3.6. Model proteini za umrežavanja katalizovana peroksidazama i tirozinazama.....	15
4. MATERIJAL I METODE RADA	17
4.1. MATERIJAL	17
4.1.1. Hemikalije	17
4.1.2. Biljni materijal i uslovi gajenja	17
4.1.3. Bakterijski soj i vektor.....	18
4.1.4. Antibiotici.....	18
4.1.5. Medijumi za rast	18
4.1.6. Pufferi i rastvori	19
4.2. METODE.....	24
4.2.1. Izolacija peroksidaza i tirozinaza iz biljnog materijala	24
4.2.2. Karakterizacija izolovanih peroksidaza i tirozinaza iz biljnog materijala.....	27
4.2.3. Ekspresija i prečišćavanje tirozinaze (TyrBm).....	30
4.2.4. Određivanje koncentracije proteina prema Lowry	31
4.2.5. SDS-PAGE elektroforeza	32
4.2.6. Proteoliza u gelu (eng. <i>In gel</i>) i masena spektrometrija	32
4.2.7. Model proteini	33
4.2.8. Umrežavanje proteina krompira katalizovano peroksidazama i tirozinazama iz kukuruza i pasulja.....	34
4.2.9. Umrežavanje biljnih proteina (krompira, grašak i zein) sa TyrBm.....	35
4.2.10. Statistička obrada podataka	36

5. REZULTATI I DISKUSIJA	37
5.1. Izolacija i karakterizacija enzima.....	37
5.1.1. Izolacija i karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz korijena kukuruza i pasulja	37
5.1.2. Biohemijske osobine solubilnih peroksidaza i tirozinaza detektovanih u korijenu pasulja i kukuruza masenom spektrometrijom.....	39
5.1.3. Karakterizacija peroksidaznih i tirozinaznih izoformi modifikovanom SDS- i nativnom gel elektroforezom	45
5.1.4. Kinetičke studije i supstratna specifičnost.....	50
5.1.5. Proizvodnja i prečišćavanje proteina TyrBm WT	58
5.2. Enzimatski katalizovano umrežavanje model proteina.....	60
5.2.1. Prečišćavanje i karakterizacija proteina krompira.....	60
5.2.2. Peroksidazama Klase III katalizovano umrežavanje proteina krompira	62
5.2.3. TyrBm-katalizovano umrežavanje proteina krompira.....	71
5.2.4. Prečišćavanje i karakterizacija model proteina kukuruza-zeina.....	77
5.2.5. TyrBm-katalizovano umreženje zeina.....	78
5.2.6. Karakterizacija model proteina graška	81
5.2.7. TyrBm-katalizovano umrežavanje proteina graška.....	82
6. ZAKLJUČAK	85
7. LITERATURA.....	88

1. UVOD

Enzimi, makromolekule proteinske prirode, predstavljaju glavne biološke katalizatore hemijskih reakcija u živim sistemima. Zbog svojih izuzetnih osobina sposobni su za katalizu složenih reakcija pri blagim eksperimentalnim uslovima.

Peroksidaze su enzimi veoma rasprostranjeni u prirodi. Većina peroksidaza pripada hemproteinima, jer sadrže gvožđe (III) protoporfirin IX (feriprotoporfirin IX) kao prostetičnu grupu. Tirozinaze ili polifenoloksidaze su enzimi sa dva atoma bakra u aktivnom mjestu, široko rasprostranjeni u animalnim, biljnim i tkivima mikroorganizama (Lerch, 1983). Tirozinaze katalizuju kiseonik zavisnu oksidaciju monofenola ili o-difenola u o-hinone.

Primjena peroksidaza i tirozinaza u različitim biohemijskim i biotehnološkim procesima otvara potrebe za njihovim intenzivnim izučavanjem, kao i traženje novih izvora ovih enzima u živom svijetu. Stoga, izolacija i prečišćavanje peroksidaza i tirozinaza iz korijena kukuruza i pasulja jeste jedan od ciljeva ove doktorske teze.

Umrežavanje (eng. *cross-linking*) jeste stvaranje jonske ili kovalentne veze između 2 polimerna lanca. U biološkom kontekstu, umrežavanje predstavlja reakciju u kojoj se dvije molekule spajaju, a njihova interakcija predstavlja težište istraživanja. U procesima izučavanja protein-protein interakcija, u cilju dobijanja što kvalitetnijih podataka o strukturi i funkciji proteina, tehnike umrežavanja su jako korisne. Umrežavanje, takođe, pomaže u cilju dobijanja vitalnih informacija o interakcijama sa receptorima, u signalnim kaskadnim i multiproteinskim kompleksima. Informacije dobijene iz eksperimenata sa umrežavanjima su jako značajne jer obezbjeđuju podatke o strukturi, mapiranju protein-protein interakcija sa specifičnim domenom ili aminokiselinom. Najznačajnija prednost umrežavanja jeste u uključivanju nekovalentnih protein-protein interakcija, posebno onih koje su tranzicione ili zavisne od specifičnih fizioloških uslova, da postanu dio kovalentno vezanog kompleksa koji bi dalje obezbjeđio važne informacije kroz korake prečišćavanja i daljeg analiziranja.

Umrežavanje proteina se može postići korištenjem različitih enzima i obično se ostvaruje preko određenih amino kiselina u proteinima (glutamina, lizina, tirozina i cisteina) ili ugljenih hidrata. Rezultat je direktne enzimske katalize i formiranja mreže, a može se javiti

indirektno nastankom umrežavajućih agenasa u reakciji koju katalizuju enzimi (vodonik peroksid ili lipidni radikali) koji mogu oksidovati reaktivne strukture i na taj način dovesti do umrežavanja.

Podaci o biohemijskim karakteristikama enzima iz odabranih biljnih vrsta pružili bi neophodne informacije u oblasti bazničnih nauka i pomogli bi u unaprijeđenju kreiranja novih životno važnih proizvoda u oblastima biohemije i biotehnologije.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Peroksidaze i tirozinaze ili polifenoloksidaze predstavljaju klase enzima koje se nalaze u animalnim, biljnim i tkivima mikroorganizama. Brojna istraživanja pokazala su različite fiziološke uloge peroksidaza u biljkama, kao što su uloga u lignifikaciji, suberinizaciji, umrežavanju proteina u ćelijskom zidu i dr., dok je poznato da tirozinaze učestvuju u tamnjenju tkiva, lignifikaciji, odbrani od insekata i patogena i dr. Novija istraživanja pokazuju ulogu peroksidaza i tirozinaza u umrežavanju proteina. Umrežavanje (eng. *cross-linking*) predstavlja povezivanje dva biopolimerna lanca kovalentnom vezom. Težište istraživanja, u biološkom kontekstu, je upravo interakcija između biopolimernih lanaca, sa ciljem dobijanja podataka o strukturi i funkciji proteina.

Stoga, cilj doktorske teze će biti usmjeren ka istraživanjima iz oblasti biljne proteomike na odabranim biljnim vrstama.

Prvi cilj će biti usmjeren ka djelimičnom prečišćavanju i biohemijskoj karakterizaciji enzima peroksidaza i tirozinaza u korijenu kukuruza (*Zea mays* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.). Upravo primjena peroksidaza i tirozinaza će zavisiti od poznavanja strukturnih i biohemijskih karakteristika ovih enzima.

Drugi cilj istraživanja će biti usmjeren ka određivanju sposobnosti enzima peroksidaza (POX, EC 1.11.1.7) iz biljnog tkiva i tirozinaza (EC 1.14.18.1) iz *Bacillus megaterium* (TyrBm) za cross-linking (umrežavanje) odabranih model proteina, sa posebnim osvrtom na globularne proteine koji teško podliježu reakcijama umrežavanja. Nova bazična saznanja iz proteomike biće potencijalno primjenjiva u oblastima biohemije i biotehnologije.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. Peroksidaze

Peroksidaze predstavljaju klasu enzima koja se nalaze u animalnim, biljnim i tkivima mikroorganizama. Predstavljaju superfamiliju proteina koji sadrži tri različite klase peroksidaza (Pasardi i sar., 2005):

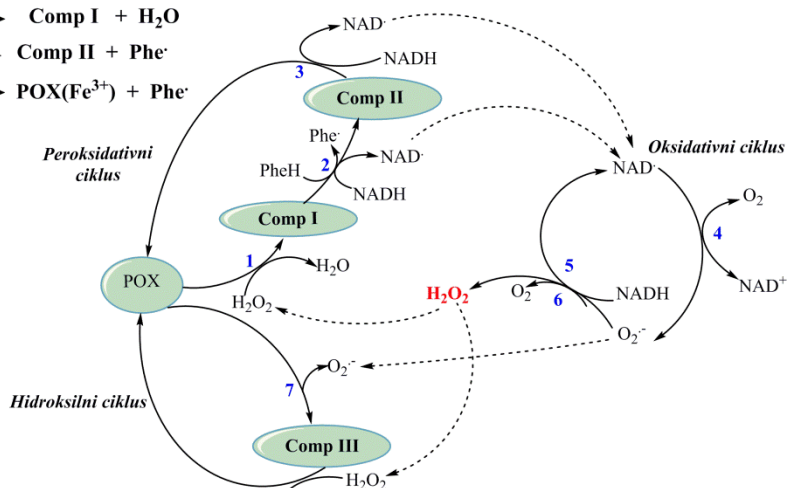
- a) Intracelularne peroksidaze (Klasa I, EC 1.11.1.5/6/11) obuhvataju citohrom C peroksidaze i askorbat peroksidaze;
- b) Ekstracelularne peroksidaze gljiva (Klasa II, EC 1.11.1.13/14) obuhvataju lignin peroksidaze i mangan peroksidaze;
- c) Ekstracelularne peroksidaze biljaka (Klasa III, EC 1.11.1.7).

Klasa III biljnih peroksidaza (POX, EC 1.11.1.7) su nespecifične peroksidaze koje su uključene u sekretorne puteve u ćeliji (Veljović Jovanović i sar., 2018). Peroksidaze su monomeri glikozilovani hemoproteini i podklasa oksidoreduktaza koji katalizuju oksidaciju različitih supstrata koristeći vodonik peroksid (Veljović Jovanović i sar., 2018). Pored hem-peroksidaza, poznate su i ne-hem peroksidaze (Hofrichter i sar., 2010).

POX su sposobne oksidovati širok spektar organskih jedinjenja, uključujući fenole, aromatične amine, indole i sulfonate, koristeći vodonik peroksid kao oksidant (Gray i Montgomery, 2003). Pored toga POX mogu u oksidaznom ciklusu uz prisustvo reduktanta (NADH ili fenoli) proizvesti H₂O₂, a u hidroksilnom ciklusu i veoma reaktivni hidroksilni radikal. Detaljan reakcioni ciklus peroksidaza Klase III prikazan je na Slici 1.

Peroksidativni ciklus

- 1) $\text{POX}(\text{Fe}^{3+}) + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Comp I} + \text{H}_2\text{O}$
- 2) $\text{Comp I} + \text{PheH} \longrightarrow \text{Comp II} + \text{Phe}^\cdot$
- 3) $\text{Comp II} + \text{PheH} \longrightarrow \text{POX}(\text{Fe}^{3+}) + \text{Phe}^\cdot$



Hidroksilni ciklus

- 7) $\text{POX}(\text{Fe}^{3+}) + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{Comp III}$
- 8) $\text{Comp III} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{POX}(\text{Fe}^{3+}) + \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$

PheH- fenolna komponenta (redukovana)
 Phe[·]- fenoksi radikal

Oksidativni ciklus

- 4) $\text{NAD}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{O}_2^-$
- 5) $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$

Dismutacija O₂⁻

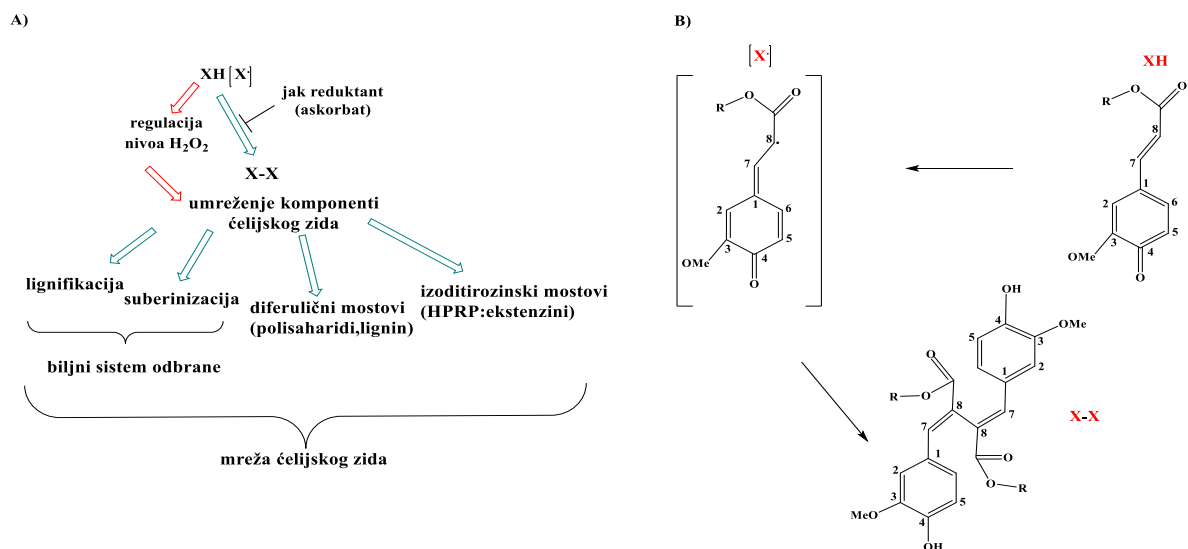
- 6) $2\text{O}_2^- + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

Slika 1. Reakcioni ciklus peroksidaza Klase III (Liszkaý i sar., 2003) .

U svim fazama razvoja biljaka, od klijanja do starenja, peroksidaze su uključene u širok spektar fizioloških procesa biljaka (npr. lignifikacija, suberinizacija, katabolizam auksina, antioksidativne reakcije) (Welinder i sar., 2002; F. Passardi i sar., 2004; Passardi i sar., 2005; Passardi i sar., 2006; Veljović Jovanović i sar., 2018), a neki od procesa su prikazani na Slici 2.

Biljke imaju veliki broj izoenzima peroksidaza koje se razlikuju u molekularnoj masi, termičkoj stabilnosti, pH optimumu, specifičnosti za supstrat i fiziološkim ulogama (Welinder i sar., 2002; F. Passardi i sar., 2004; Onsa i sar., 2004; Passardi i sar., 2005; Passardi i sar., 2006; Veljović Jovanović i sar., 2018).

Prema filogenetici, postoji 13 glavnih grupa peroksidaza, koje su podijeljene na više od 60 klasa i prisutne u bazi peroksidaza. Oko 11000 sekvenci peroksidaza sakupljenih u internet bazi posvećenoj ovoj grupi enzima govori o njihovoj zastupljenosti ([https://www.uniprot.org/uniprot/?query=database:\(type:PeroxiBase\)](https://www.uniprot.org/uniprot/?query=database:(type:PeroxiBase))).



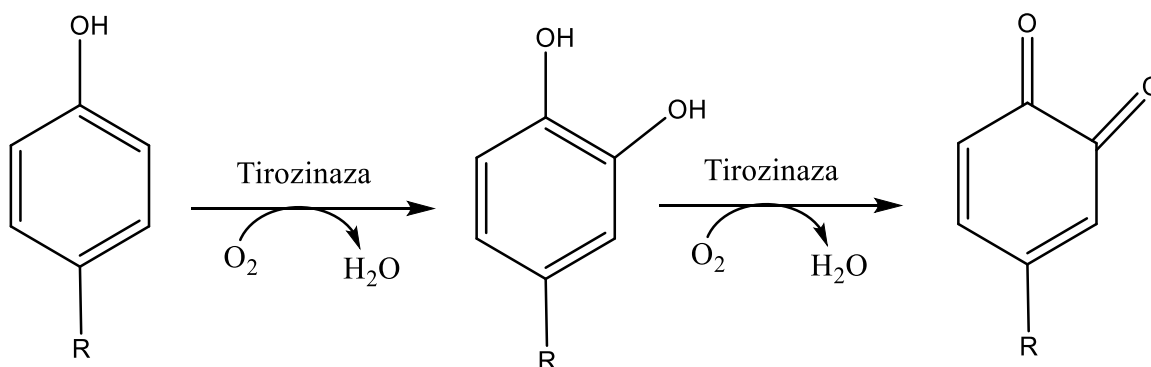
Slika 2. Neke od funkcije peroksidaza u ćelijskom zidu.

Peroksidaze u mehanizmu umrežavanja ćelijskog zida. (A) Peroksidazni ciklus peroksidaza (zelene strelice): peroksidaze oksiduju različite supstrate (XH), kao što su tirozinski ostaci, monolignoli, suberinske jedinice i ferulična kiselina (neki od ovih molekula su povezani sa različitim biopolimerima). Radikali nastali peroksidaznom reakcijom mogu formirati umrežavanja (X-X) između biopolimera ćelijskog zida i proteina koji učestvuju u reakcijama odbrane biljaka, kao i tokom formiranja mreže ćelijskih zidova. Peroksidaze takođe regulišu nivo H_2O_2 (crvene strelice) (B) Primjer umrežavanja posredovanog peroksidazom. Skraćenice: R, vezani polisaharid; XH, ester ferulične kiseline; X, intermedijerni ester ferulične kiseline (prikazan je samo jedan izomer); X-X, 8-8-povezani ester dehidroferulata. Povezivanje se može pojaviti na drugim položajima, dajući 5-5-, 8-5- ili 8-O-4- povezane estre dehidroferulata. (F. Passardi i sar., 2004).

Na Slici 2 su navedene neke od funkcija peroksidaza Klase III u ćelijskom zidu. Peroksidaze biljaka su lokalizovane intracelularno (u vakuolama i citoplazmi) i vanćelijski (apoplast i ćelijski zid) (Takahama, 2004; Ferreres i sar., 2011; Kukavica i sar., 2012). Takođe, detektovane su peroksidaze biljnih membrana (Mika i Luthje, 2003). Intracelularne i apoplastne peroksidaze su solubilne, dok su jonske ili kovalentne peroksidaze vezane za ćelijski zid (Kukavica i sar., 2012; Veljović Jovanović i sar., 2018). Kod biljaka peroksidaze se mogu naći i u peroksizomima, mitohondrijama i granuliranom endoplazmatičnom retikulumu.

3.2. Tirozinaze

Tirozinaze ili polifenoloksidaze (EC 1.14.18.1) su enzimi, sa dva atoma bakra u aktivnom centru, koji su široko rasprostranjeni u animalnim, biljnim i tkivima mikroorganizama (Claus i Decker, 2006). Tirozinaze pripadaju porodici Cu oksidaza, a par Cu jona u aktivnom mjestu ih povezuje sa super-familijom tipa "tip-3-Cu" zajedno sa katehol oksidazama i hemocijaninima. Članovi ove porodice imaju konzervisano aktivno mjesto od šest histidinskih ostataka, koji su dio četiri heliksa i koordinisani su sa dva jona bakra (CuA i CuB) (Sendovski i sar., 2011). Ovi enzimi su uglavnom odgovorni za formiranje melanina, ali imaju razne druge funkcije. Tirozinaze katalizuju kiseonik zavisnu oksidaciju monofenola ili o-difenola u o-hinone. Oksidaciju aromatičnih ortofenola olakšava prisustvo molekularnog kiseonika formirajući o-difenole i odgovarajuće o-hinone, poznate i kao "aktivnost monofenolaze" i "aktivnost difenolaze" (Slika 3).



Slika 3. Šema reakcije tirozinaze: monofenolazna i difenolazna aktivnost. Jedan mol kiseonika se troši po jednom molu formiranog o-hinona.

o-hinoni su jako reaktivne supstance koje mogu da reaguju sa aminokiselinama, peptidima i proteinima i na taj način da utiču na strukturne i funkcionalne osobine proteina. Reaktivni hinoni spontano polimerizuju do melanina (Fairhead i Thony-Meyer, 2012).

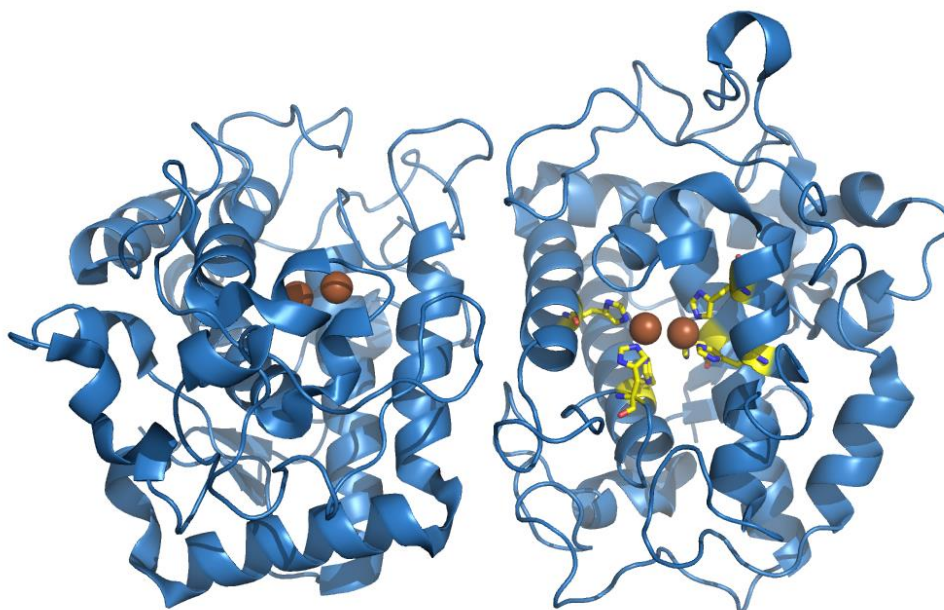
Mnogobrojne su fiziološke uloge tirozinaza (Mayer, 2006): lignifikacija (López-Serrano i sar., 2004), odbrana od insekata i patogena (Mohammadi i Kazemi, 2002; Pinto i sar., 2008), uloga u tamnjenju tkiva (Coetzer i sar., 2001; Gandía-Herrero i sar., 2003). Najviše je istraživanja rađeno na tirozinazama sisara, ali i bakterija *Streptomyces* (Lerch i Ettlinger,

1972; Katz i Betancourt, 1988; Ito i Oda, 2000; Matoba i sar., 2006) i *Bacillus* (Kanteev i sar., 2013; Goldfeder i sar., 2014) i gljiva: *Agaricus bisporus* (Wichers i sar., 1996) (Wichers *et al.*, 1996; Seo *et al.*, 2003), *N. Crassa* (Lerch, 1983), *Trichoderma reesei* (Selinheimo i sar., 2006), *Aspergillus* (Bull i Carter, 1973), *Ascovaginospora* (Abdel-Raheem i Shearer, 2002), *Trametes* (Tomšovský i Homolka, 2004), *Pycnoporus* species (Halaouli i sar., 2005) and *Marinomonas* (López-Serrano i sar., 2004).

Ključna uloga tirozinaza u pigmentaciji kože doprinosi njihovoj aktuelnosti i zbog toga su jedan od najviše proučavanih enzima iz familije enzima koji sadrže bakar. Monofenolazne i difenolazne aktivnosti tirozinaza su osnova za mnoge industrijske i biotehnološke primjene (Faccio i sar., 2012; Fairhead i Thony-Meyer, 2012). Primjene u oblasti životne sredine uključuju detoksikaciju otpadnih voda koje sadrže fenole, detoksikaciju kontaminiranih zemljišta i koriste se kao biosenzori za praćenje fenola (Halaouli i sar., 2005; Claus i Decker, 2006; Dalfard i sar., 2006). Sintetički melanin koji proizvodi tirozinaza ima i brojne primjene, te se može koristiti za zaštitu od zračenja i služi kao imunogen (Liu i sar., 2004; Halaouli i sar., 2005). Štaviše, sposobnost tirozinaze da reaguje sa ostacima tirozina unutar polipeptidnih lanaca učinila je enzim atraktivnim za umrežavanje proteina (Thalmann i Lötzbeier, 2002; Buchert i sar., 2010).

3.3. Tirozinaza iz *Bacillus megaterium* (TyrBm)

Među bakterijama postoje primjeri dobro okarakterisanih tirozinaza. Tirozinaze su prvi put opisane u nekoliko vrsta *Streptomyces* (Lerch i Ettliger, 1972; Katz i Betancourt, 1988; Ito i Oda, 2000; Matoba i sar., 2006), ali je enzim okarakterisan i kod drugih vrsta kao što su *Rhizobium*, *Symbiobacterium thermophilum*, *Pseudomonas maltophilia*, *Sinorhizobium meliloti*, *Marinomonas mediterranea*, *Thermomiconium roseum*, *Bacillus thuringiensis* i *Pseudomonas putida* F6 (Dalfard i sar., 2006; McMahon i sar., 2007). Tirozinaza iz bakterije pronađena u zemljištu, *Bacillus megaterium* (TyrBm), izolovana je, okarakterisana i kristalizirana (Shuster i Fishman, 2009; Sendovski i sar., 2010; Sendovski i sar., 2011). Struktura rekombinantnog enzima predstavljena je kao dimer koji sadrži dva jona Cu u svom aktivnom mjestu, 6 konzervisanih ostataka histidina, bez pomoćnog "caddie" proteina za njegovu aktivnost (Slika 4).



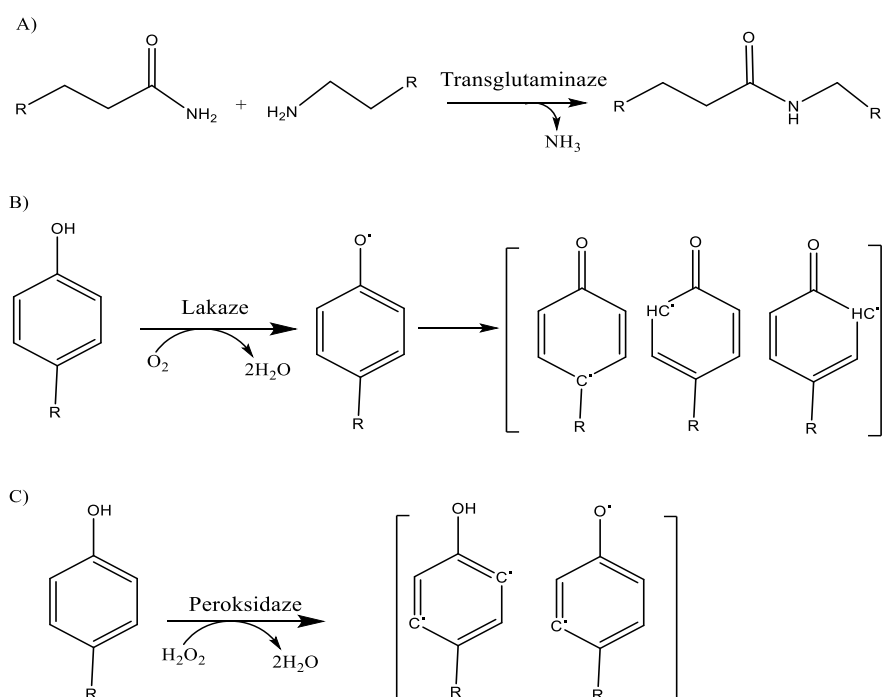
Slika 4. Struktura TyrBm (PDB kod 3NM8, <https://www.rcsb.org/structure/3NM8>). Joni bakra u aktivnom mjestu prikazani su braon bojom. Šest konzerviranih histidina u aktivnom mjestu monomera A su prikazane žutom bojom. Predstavljene strukture TyrBm su generisane pomoću PyMOL-a (<http://www.pymol.org/>)

TyrBm pokazuje jedinstvenu aktivnost u organskim rastvaračima i jonskim tečnostima, visoku stabilnost na temperaturama do 70°C i aktivan je sa velikim brojem supstrata (Shuster i Fishman, 2009; Goldfeder i sar., 2012).

Istraživanja TyrBm, do sada su bila uglavnom usmjerena na razjašnjavanje katalitičkih mehanizama (Shuster i Fishman, 2009; Goldfeder i sar., 2012), određivanje enzimske strukture (Sendovski i sar., 2010; Sendovski i sar., 2011; Goldfeder i sar., 2014) i dizajn inhibitora.

3.4. Umrežavanje proteina

Umrežavanje proteina se definiše kao "proces povezivanja proteinskih molekula kroz inter- ili intramolekulske kovalentne veze" (Heck i sar., 2013). Dok se hemijski reagensi, kao što su glutaraldehid ili formaldehid, često koriste za dobijanje kovalentnih veza između proteinskih lanaca, povezivanje posredstvom enzima predstavlja poželjnu alternativu. Velika motivacija za istraživanje i upotrebu enzimskog umrežavanja proistekla je iz brojnih važnih pitanja. Enzimatski proces je obično sigurniji i ima manji uticaj na životnu sredinu u poređenju sa hemijskim procesom, omogućava upotrebu blagih vodenih reakcionih uslova i omogućava smanjenje troškova rada. Umrežavanje katalizovano enzimima često se može kontrolisati modifikovanjem temperature, pH ili jonske jačine (Heijnis i sar., 2010; Heijins i sar., 2010; Heijnis i sar., 2011; Heck i sar., 2013). Postoje različiti enzimi koji mogu generisati kovalentno umrežavanje proteina i stoga se koriste za različite aplikacije. Ovi enzimi se međusobno razlikuju u smislu reakcionog mehanizma i aminokiselinskih ostataka sa kojima reaguju (Gerrard i sar., 2005; Strong i Claus, 2011; Zeeb i sar., 2017).



Slika 5. Reakcije umrežavanja katalizovane enzimima: (a) Transglutaminazna, TG (TG iz mikroorganizama) reakcija formiranja amidne veze, (b) oksidacija katalizovana lakazama, (c) oksidacija katalizovana peroksidazama.

Transglutaminaza (E.C. 2.3.2.13, TG) se najčešće koristi za umrežavanje i jedini je komercijalno dostupan enzim. Katalizuje tristepenu (triadnu) reakciju koja uključuje i nastanak intermedijera između karboksamidne grupe glutaminskih ostataka i raznih primarnih amina, uključujući ostatke lizina koji vode formiranju krajnje amidne veze (Slika 5A). Specifičnost transglutaminaze za glutaminske i lizinske aminokiselinske ostatke ograničava reakciju na proteine koji imaju Glu i Lys ostatke na mjestima dostupnim aktivnom mjestu enzima.

Druga važna grupa enzima za umrežavanje proteina je iz porodice oksidoreduktaza. Ova grupa enzima, uključuje lakaze (EC 1.10.3.2), peroksidaze i tirozinaze (Slika 5B,C).

Navedeni enzimi pružaju široku specifičnost supstrata zajedno sa različitim ciljnim ostacima i različitim mehanizmima umrežavanja.

U prirodi, ovi enzimi se ne koriste za umrežavanje proteina nego iniciraju samo prvu hemijsku reakciju, formiraju reaktivnu vrstu koja se spontano polimerizuje sa drugim funkcionalnim grupama, što dovodi do nastanka kovalentne veze (Isaschar-Ovdat i Fishman, 2018).

3.5. Umrežavanje proteina peroksidazama i tirozinazama

Najpoznatiji predstavnik peroksidaza Klase III je hren peroksidaza (HRP) (EC 1.11.1.7) koja je najviše korištena u ispitivanju procesa umrežavanja. HRP karakteriše nizak redoks potencijal i sposobnost da katalizuje oksidaciju tirozinskih ostataka u proteinu. Nastali radikali tirozina mogu da indukuju konjugaciju (izo)di-tirozina i kao posljedica dovode do formiranja intramolekularne kovalentne veze (Veitch, 2004; Hejnis i sar., 2011).

Druga grupa peroksidaza čija je sposobnost umrežavanja proučavana pripada Klasi II i superfamiliji hem-peroksidaza koje karakteriše veliki redoks potencijal. Peroksidaze Klase II mogu da koriste različite vrste supstrata uključujući jedinjenja koja ne mogu biti oksidovana sa HRP usljed niskog redoks potencijal koji HRP posjeduje (Ruiz-Duenas i sar., 2001; Hofrichter i sar., 2010).

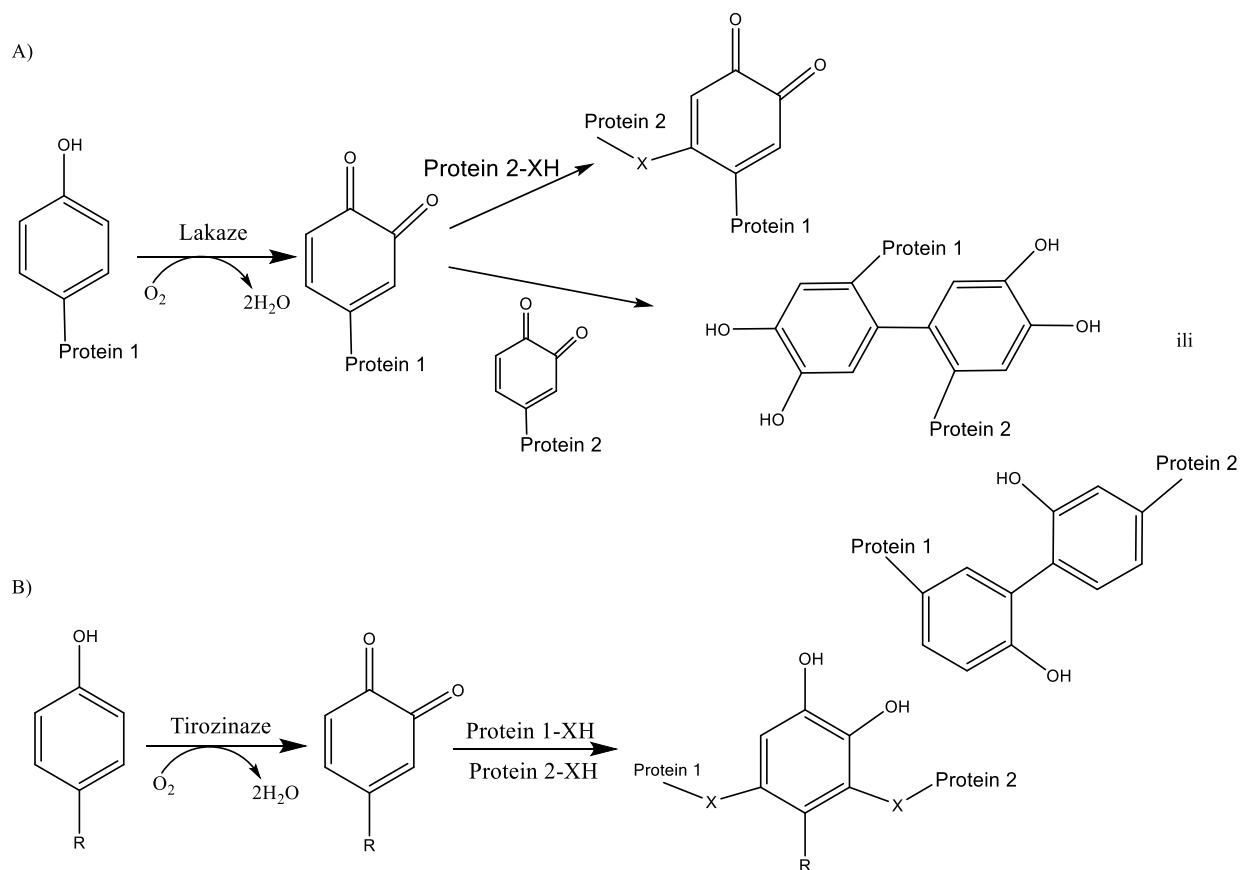
Pokazano je da peroksidaze mogu da umreže protein gluten i stvaraju kovalentne konjugate između glutena ili β -kazeina i arabinoksilana, odnosno da se arabinoksilani vezuju preko ferulične kiseline za gluten za ostatke lizina, tirozina ili cisteina (Hilhorst i sar., 1999; Boeriu i sar., 2004). Takođe je pokazano da peroksidaze mogu da umreže proteine kazeina (Matheis i Whitaker, 1984), apo- α -laktoalbumina (Saricay i sar., 2013) i

da utiču na parcijalno umrežavanje proteina surutke (Færgemand i sar., 1998; Thalmann i Lötzbeyer, 2002).

Heijins i saradnici (2010) su opisali umrežavanja α -laktalbumina sa HRP i proces dobijanja oligomera (Heijins i sar., 2010). Autori su pokazali da je niska jonska jačina dovela do stvaranja više dimera. Međutim, kada je primijenjena slična jonska jačina i niža pH (5,9 u odnosu na 6,8), primjećena je pojava viših nivoa oligomerizacije sa većom molekulskom masom, dok je ostao isti procenat konverzije monomera. Pored toga u istom radu je pokazano da postepeno dodavanje vodonik peroksida poboljšava efikasnost enzima i oligomerizaciju. Rezultati se pripisuju promjenama u konformaciji proteina zbog promjena u uslovima sredine.

Takođe, ispitan je i nastanak različitih veličina oligomera tokom HRP-katalizovanog umrežavanja apo- α -laktoalbumina (Saricay i sar., 2013). Različiti parametri kao što je količina dodatog HRP-a, jonska jačina, te koncentracija proteina, mogu kontrolisati oligomerizaciju (Dhayal i sar., 2014). Istraživanja mehanizama umrežavanja su pokazala da peroksidazna reakcija sa α -laktalbuminom dovodi do formiranja di-tirozina, ali i formiranja oligo-tirozina (Dhayal i sar., 2015).

Pokazano je da peroksidaza iz *Pleurotus eryngii* (EC 1.11.1.16) katalizuju nastanak intramolekularne veze u lignanima, različitim peptidima i β -kazeinu. Isto istraživanje je pokazalo sa SDS-PAGE i TEM (transmisioni elektronski mikroskop) analizama nastanak 8 jedinica umreženih lignana, 11 jedinica heterogenih umreženih peptida koji sadrže tirozin i polimerizaciju β -kazeina. Peptidi koji nisu sadržavali ostatke tirozina, nisu bili umreženi. Takođe, pokazano je da dodatak Mn^{2+} može poboljšati stabilnost i efikasnost enzima (Salvachúa i sar., 2013).



Slika 6. Predložena šema umrežavanja proteina katalizovanih sa tirozinazama (A) u odsustvu fenolnog medijatora i (B) u prisustvu fenolnog medijatora (koji nije prikazan na šemi). X predstavlja hidroksil, amin ili sulfhidril grupu. Bez fenolnog medijatora može doći i do 1,4 veze i do radikalnog spajanja, dok u prisustvu fenolnog medijatora male molekulske mase češće će doći do 1,4 veze (Isaschar-Ovdat i Fishman, 2017).

Tirozinaze su korištene za umrežavanje uglavnom u prisustvu posrednika male molekulske mase kao medijatora za umrežavanje. Na primjer, kada je fenol prisutan u reakcionoj smješi on posredstvom enzima prelazi u reaktivni hinon koji dalje reaguje sa drugim reaktivnim grupama u proteinskom lancu kao što su ostaci hidroksila, sulfhidrila ili amina. Bez dodavanja fenolnog medijatora, umrežavanje će se odvijati preko ostataka tirozina (Slika 6) i stepen umrežavanja će zavisiti od dostupnosti ostataka tirozina aktivnom mjestu enzima.

Tirozinaze različitog porijekla su proučavane u odnosu na mogućnosti umrežavanja glutena, kazeina i mesa. Gljivične tirozinaze su u centru istraživanja i stoga su najviše istražene.

Tirozinaze gljivica koje su se najčešće koristile u umrežavanju proteina su porijeklom iz *Agaricus bisporus* (TyrAb), *Trichoderma reesei* (TyrTr) i *Botryosphaeria obtuse* (TyrBo). Druge tirozinaze koje su proučavane i korišćene su za procese umrežavanja proteina tokom protekle decenije su bakterijske tirozinaze iz *Verrucomicrobium spinosum* (TyrVs) i tirozinaze iz mastila lignje (Fairhead i Thony-Meyer, 2012; Vate i Benjakul, 2016).

TyrAb je najviše proučena tirozinaza iz gljiva i jedina komercijalno dostupna tirozinaza. Pokazano je da je koristeći TyrAb moguće formiranje molekula velike molekulske mase u proteinima β -laktoglobulin i α -laktoalbumin (Thalmann i Lötzbeyer, 2002). U studiji objavljenoj 2010. godine Fairhead i Thony-Meyer su pokazali upotrebu TyrVs za umrežavanje različitih proteina, kao što su kazein, lizozim, mioglobin i drugi. Naime, dok je enzim pokazao dobru sposobnost umrežavanja proteina sa nižim nivoima organizacije, kao što je kazein, proteini sa višim nivoima organizacije (tercijarnom i kvarternom) nisu bili umreženi i zahtijevali su dodavanje molekula male molekulske mase (fenol ili kafeična kiselina) kao medijatora (Fairhead i Thöny-Meyer, 2010; Fairhead i Thony-Meyer, 2012). Druga istraživanja su pokazala pozitivan efekat umrežavanja sa tirozinazom na formiranje filma i površinske osobine filmova kazeina (Juvonen i sar., 2011).

Kako je već rečeno da proteini sa višim nivoima organizacije (tercijarnom i kvarternom) teško mogu biti umreženi bez dodavanje molekula male molekulske mase, fenolnih medijatora, Partanen i saradnici (2011) su primjenom alkalnih pH modifikovali dostupnost β -laktoglobulina za umrežavanje pomoću TyrTr i TyrAb. Studija je pokazala da do umrežavanja β -laktoglobulina sa TyrTr dolazi na alkalnom pH (pH 9), dok druga tirozinaza (TyrAb) nije umrežila protein niti pri neutralnom niti pri alkalnom pH. Alkalni pH dovodi do promjena u tercijarnoj strukturi proteina i dovodi do pojave monomera u rastvoru što je suprotno prirodnom dimernom obliku na neutralnom pH. Ove promjene zapravo utiču na ostatke tirozina koji omogućavaju enzimsku aktivnost (Partanen i sar., 2011).

Pokazano je da je mješavina tirozinaze i fenola postigla bolji efekat umrežavanja i stabilizaciju nanočestica natrijum-kazeinata, nego kada je primjenjen glutaraldehid (Xu i sar., 2016). Ovo se pripisuje sposobnosti hinona da reaguju sa različitim funkcionalnim

grupama u proteinima, dok bi-aldehid može formirati kovalentne veze samo između aminskih grupa lizina ili ostataka hidroksilizina (Xu i sar., 2016).

Rad Xu i saradnika (2016) je pokazao da TyrBm ima ogroman potencijal za reakciju sa različitim supstratima što otvara mogućnost umrežavanja proteina direktnom hidroksilacijom ostatka tirozina peptida. Činjenica da mehanizam kojim se vrši umrežavanje zavisi od strukture tirozinaze, takođe je dovela do intenzivnijeg ispitivanja mehanizma umrežavanja od strane TyrBm.

3.6. Model proteini za umrežavanja katalizovana peroksidazama i tirozinazama

Proteini krompira, hidrofobni proteini kukuruza (zeini) i proteini graška odabrani su kao model proteini i supstrati za ispitivanje sposobnosti peroksidaza i TyrBm katalizovanog umrežavanja.

Proteini krompira (PP) postaju sve prisutniji u prehrambenim proizvodima zbog visokog nutritivnog kvaliteta uporedivog sa proteinima cijelog jajeta (Liedl i sar., 1987; Friedman, 1996) kao i visokim indeksom esencijalnih amino kiselina (Pouvreau i sar., 2001; Alting i sar., 2011). Oni se smatraju GRAS (engl. *General Recognized As Safe*), nealergenim i mogu se inkorporirati u vegetarijanske, veganske i Kosher Parve proizvode (David i Livney, 2016). U pogledu zdravstvenih koristi, dokazano je da protein krompira, patatin, poseduje sposobnost regulisanja nivoa serumskog holesterola (Liyanage i sar., 2008) i da djeluju kao potencijalni hemijski antikancerogeni agens (Sun i sar., 2013). Hidrolizovani protein krompira ima izuzetne antioksidativne osobine (Nieto i sar., 2009; Cheng i sar., 2010; Udenigwe i sar., 2016).

Zeini, klasifikovani kao prolamini, su glavni proteini u kukuruza koji čine 60% ukupnih proteina (Shukla i Cheryan, 2001). Zein je uglavnom bogat glutaminskom kiselinom (21-26%), leucinom (20%), prolinom (10%) i alaninom (10%), ali mu nedostaju esencijalne amino kiseline lizin i triptofan (Dhillon i sar., 2016). Zbog svog aminokiselinskog sastava koji sadrži visok procenat hidrofobnih ostataka, frakcije zeina imaju lošu rastvorljivost u vodi i uglavnom su rastvorljivi u vodenim alkoholnim rastvorima, pri visokim koncentracijama uree, alkalnim rastvorima (pH 11 ili višim) ili sa anjonskim

deterdžentima (Paraman i Lamsal, 2011). Hidrofobna priroda zeina ograničava njegovu primjenu u različitim biotehnološkim procesima i prehrambenim proizvodima. Ali, s druge strane, njegova sposobnost da fizički "uhvati" veliki broj hidrofobnih jedinjenja, čini zein atraktivnim sistemom za transport različitih funkcionalnih komponenti (kvercetin, kurkumin, β -karoten, polifenolna jedinjenja biljnog porijekla, esencijalna ulja, vitamini, minerali i dr.) (Patel i sar., 2010; Patel i sar., 2012; Patel i Velikov, 2014). Glavne primjene zeina su kao polimerni materijal za film, premaz i plastične materijale (Lawton, 2002). Kombinacija zeina sa drugim polimerima, kao što je pektin, dovela je do stvaranja hidrogela sa povećanom efikasnošću enkapsulacije i stabilnijom mrežom pektina (Liu i sar., 2006).

Proteini graška imaju važnu ulogu u mnogim prehrambenim proizvodima, zbog njihove hranljive vrijednosti i njihovog doprinosa teksturi hrane (Sun i Arntfield, 2011). Tržište za grašak se brzo povećava i očekuje se da do 2020. godine njegova vrijednost dostigne 34,8 miliona dolara zbog povećanog interesovanja potrošača za biljne proteine i relativno niskih troškova proizvodnje graška (Grand View Research, 2015). Proteini graška smatraju se dobrim izvorom esencijalnih aminokiselina sa visokim sadržajem lizina, ali sa niskim sadržajem metionina (Boye i sar., 2010). Komercijalno dostupni koncentрати ili izolati grašaka mogu imati loše funkcionalne osobine, zbog različitih procesa frakcioniranja.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Hemikalije

L-DOPA, amonijum persulfat i N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) su kupljeni od Acrosa (Geel, Belgija). Trizma baza, kanamicin, natrijum dodecil sulfat (SDS), imidazol, akrilamid/metilenbisakrilamid, dinatrijeva so L-tirozina, natrijum metabisulfit, amonijum sulfat, bromfenol plava, glicerol, kafeična kiselina, hlorogena kiselina, *p*-kumarinska kiselina, Folin-Ciocalteu reagens, K-Na-tartarat, 4-hloro- α -naftol, 3,3-diaminobenzidinom (DAB), vodonik peroksid, fenilmetilsulfonyl fluorida (PMSF), HRP (engl. *horseradish peroxidase*, komercijana peroksidaza iz hrena) dobijeni su od Sigma Chemical Co. (Rehovot, Izrael). 2-propanol, metanol, sirćetna kiselina i etanol dobijeni su od Gadot-Group (Netanya, Israel). CuSO₄ i dimetil sulfoksid (DMSO) su nabavljeni od Merck-a (Whitehouse Station, N.J., SAD). β -mercaptoethanol je nabavljen od Spectrum-a (Gardena, Kalifornija, SAD). Brašno od kukuruznog glutena (engl. CGM- *corn gluten meal*) je dobijen od Galam Ltd, Israel. Bio-Rad protein reagens je nabavljen od Bio-Rad Laboratories (Richmond, Ca., SAD). Svi upotrebljeni materijali su bili najviše čistoće i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

4.1.2. Biljni materijal i uslovi gajenja

Sjeme pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) i kukuruza (*Zea mays* L.) su isprani pod vodovodnom vodom i naklijani na 18°C u mraku tokom 3 dana. Klijanci su nakon toga hidroponično uzgajani tokom 14 dana u komori za rast sa fotoperiodom od 16h/8h (svjetlost/mrak) na 24°C i 18°C, tako što su postavljeni u vodovodnu vodu, koja se mijenjala svakih 7 dana (Slika 7). Osvjetljenje od 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obezbijeđeno je bijelim fluorescentnim lampama. Nakon dvije sedmice korijenje je držano u zamrzivaču do analize.



Slika 7. Hidroponične kulture kukuruza i pasulja u kontrolisanim uslovima

4.1.3. Bakterijski soj i vektor

Bakterijski soj korišten u ovom istraživanju je BL21 DE3 (Novagen, Darmstadt, Njemačka) i sadrži genotip: $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])$. *E. coli* BL21 je korišćena kao domaćin za plazmid pET9d (Novagen, Darmstadt, Njemačka) i otporna je na kanamicin.

4.1.4. Antibiotici

Antibiotik koji je korišćen u ovom radu je kanamicin (Sigma-Aldrich, Rehovot, Izrael). Koncentracija osnovnog rastvora sterilisana filtracijom ($0,22 \mu\text{m}$) bila je $25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ u vodi, a konačna koncentracija u medijumu je bila $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Osnovni rastvor je čuvan na -20°C .

4.1.5. Medijumi za rast

Sve količine su predstavljene kao procenat masene koncentracije.

Luria-Bertani (LB) medijum

Trypton (Tryptone)	1,0%
NaCl	1,0%
Ekstrakt kvasca	0,5%

Za čvrste agar-ploče 1,5% agara je dodato u medijum. Sterilizovana smješa je sipana u ploče. Za LB medijum sa kanamicinom (LBK), kanamicinski štok rastvor (25 mg/mL) je dodat do konačne koncentracije od 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Terrific Broth (TB) medijum

Trypton (Tryptone)	1,2%
Ekstrakt kvasca	2,4%
Glicerol	0,4%
0,72 M K_2HPO_4 , 0,17 M KH_2HPO_4	10%

Za TB medijum sa kanamicinom (TBK), dodat je kanamicin-štok rastvor (25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) do konačne koncentracije 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.1.6. Puferi i rastvori

Većina pufera i rastvori koja su korišćena u ovoj studiji, izuzev onih koja su precizirana, pripremljena su prema Sambrook i saradnicima (Sambrook i Russell, 2001).

Rastvori za određivanje koncentracije proteina prema Lowry-ju (Lowry i sar., 1951)

0.2 N NaOH,

Reagens I (2 % Na_2CO_3 + 0.2 N NaOH),

Reagens II (0.1 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)

Reagens III (0.13 M K-Na-tartarat),

Reagens IV (1 ml Reagens II + 1 mL Reagens III, dopuni se do 100 mL Reagensom I) i

Komercijalni Folin-Ciocalteu reagens razblažen u odnosu 1:3 sa destilovanom vodom.

Puferi za ekstrakciju peroksidaza i tirozinaza

0,2 mM natrijum di-hidrogen fosfat (NaH_2PO_4)

Natrijum di-hidrogen fosfat 3,9 g

dH_2O je dodata do zapremine 500 mL

0,2 mM dinatrijum hidrogen fosfat (Na_2HPO_4)

Natrijum fosfat heptahidrat 53,65 g
dH₂O je dodata do zapremine 1000 mL

25 mM Natrijum fosfatni pufer (SPB), pH 7

0.2 M Monobazni pufer 29,25 mL
0.2 M Dibazni pufer 45,75 mL
dH₂O je dodata do zapremine 600 mL

25 mM Natrijum fosfatni pufer (SPB), pH 6,4

1 M Monobazni pufer 11,03 mL
1 M Dibazni pufer 3,98 mL
dH₂O je dodata do zapremine 600 mL

100 mM pufer za ekstrakciju peroksidaza i tirozinaza

100 mM SBP pH 6,4
1 mM PMSF

Puferi za prečišćavanje TyrBm

Tris pufer 1M, pH 7,5

121,4 g Tris-a je rastvorena u 800 mL dH₂O i pH je podešen dodavanjem koncentrovane HCl. Poslije dodavanja HCl, dodata je dH₂O do finalne zapremine od 1000 mL.

2 M NaCl

116,9 g NaCl je rastvoreno u 800 mL dH₂O. Poslije rastvaranja, dH₂O je dodata do finalne zapremine od 1000 mL.

2 M imidazol

136,2 g imidazola je rastvoreno u 800 mL dH₂O. Poslije rastvaranja, dH₂O je dodata u finalnu zapreminu od 1000 mL.

Pufer za vezivanje (engl. binding)

20 mM Tris-HCl (40 mL Tris HCl 1M)

500 mM NaCl (500 mL NaCl 2M)

20 mM imidazola (20 mL imidazola 2M)

dH₂O je dodata do finalne zapremine od 2000 mL. Rastvor je filtriran kroz sistem vakum filtriranja (0.45µ).

Elucioni pufer

20 mM Tris-HCl (40 mL Tris HCl 1M)

500 mM NaCl (500 mL NaCl 2M)

500 mM imidazola (500 mL imidazola 2M)

dH₂O je dodata do finalne zapremine od 2000 mL. Rastvor je filtriran kroz sistem vakum filtriranja (0,45 µm).

Pufer za dijalizu

1 M Tris-HCl pufer pH 7,5 250 mL

dH₂O je dodata do finalne zapremine od 5000 mL

Rastvori za elektroforezu proteina (SDS-PAGE)

Tris-SDS, pH 8,8 pufer

Tris 1,5 M

SDS 0,4%

Podšavanje pH vršeno je sa HCl 32%.

Pufer za nativnu elektroforezu je pripremljen bez SDS.

Tris-SDS, pH 6,8 pufer

Tris 0,5 M

SDS 0,4%

Podšavanje pH vršeno je sa HCl 32%.

Pufer za nativnu elektroforezu je pripremljen bez SDS.

Gel za razdvajanje 12% (količine za 2 gela)

Tris-SDS, pH 8,8 4,95 mL

Akrilamid/metilenbisakrilamid 40% 6 mL

Glicerol 50%	400 μ L
H ₂ O	8,6 mL
Nakon miješanja i deaeracije dodaju se sljedeći sastojci:	
TEMED	15 μ L
Amonijum persulfat 10%	100 μ L

Gel za koncentrovanje 4% (količina za 2 gela)

Tris-SDS, pH 6,8	1,75 mL
Akrilamid/metilenbisakrilamid 40%	0,695 mL
H ₂ O	4,5 mL
Nakon miješanja i deaeracije dodaju se sljedeći sastojci:	
TEMED	8 μ L
Amonijum persulfat 10%	30 μ L

Tris-glicin pufer za elektroforezu pH 8,3

Tris	0,025 M
SDS	0,1%
Glicin	0,192 M

Pufer za nativnu elektroforezu je pripremljen bez SDS.

4x koncentrovan pufer za uzorake SDS elektroforeze

SDS (w/v)	10%
Glicerol (v/v)	20%
β -merkaptotanol (v/v)	10%
Bromofenol plavo (v/v)	2,5%
Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M

Neredukujući pufer za uzorak je pripremljen bez β -merkaptotanola.

Rastvor za bojenje SDS gelova

Coomassie Brilliant Blue	2,5 g
Etanol	500 mL
Glacijalna sirćetna kiselina	100 mL

dH₂O se dodaje do finalne zapremine od 1000mL. Rastvor se filtrira kroz Whatman papir.

Rastvor za obezbojavanje SDS gelova

Etanol apsolutni (ili metanol) 200 mL

Sirćetna kiselina 100 mL

dH₂O se dodaje do finalne zapremine od 1000mL. Rastvor se čuva na sobnoj temperaturi.

Rastvori za nativnu elektroforezu proteina (PAGE)

Gel za koncentrovanje 5% (5 mL)

0,5 M Tris pH 6,8 0,63 mL

Akrilamid/metilenbisakrilamid 30% 0,83 mL

H₂O 3,4 mL

Nakon miješanja i deaeracije dodaju se sljedeći sastojci:

TEMED 5 µL

Amonijum persulfat 10% 50 µL

Gel za razdvajanje 10% (10 mL)

1,5 M Tris pH 8,8 0,63 mL

Akrilamid/metilenbisakrilamid 30% 3,3 mL

H₂O 4 mL

Nakon miješanja i deaeracije dodaju se sljedeći sastojci:

TEMED 4 µL

Amonijum persulfat 10% 100 µL

3 x koncentrovan pufer za uzorak za nativnu elektroforezu

H₂O 90 µL

Glicerol (v/v) 10% 600 µL

Bromofenol plavo (v/v) 2,5% 10 µL

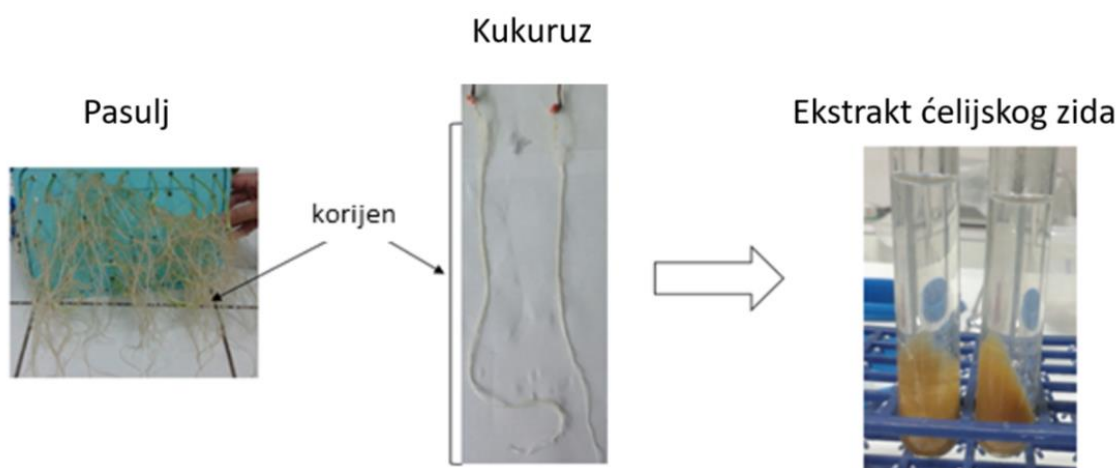
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 300 µL

4.2. METODE

4.2.1. Izolacija peroksidaza i tirozinaza iz biljnog materijala

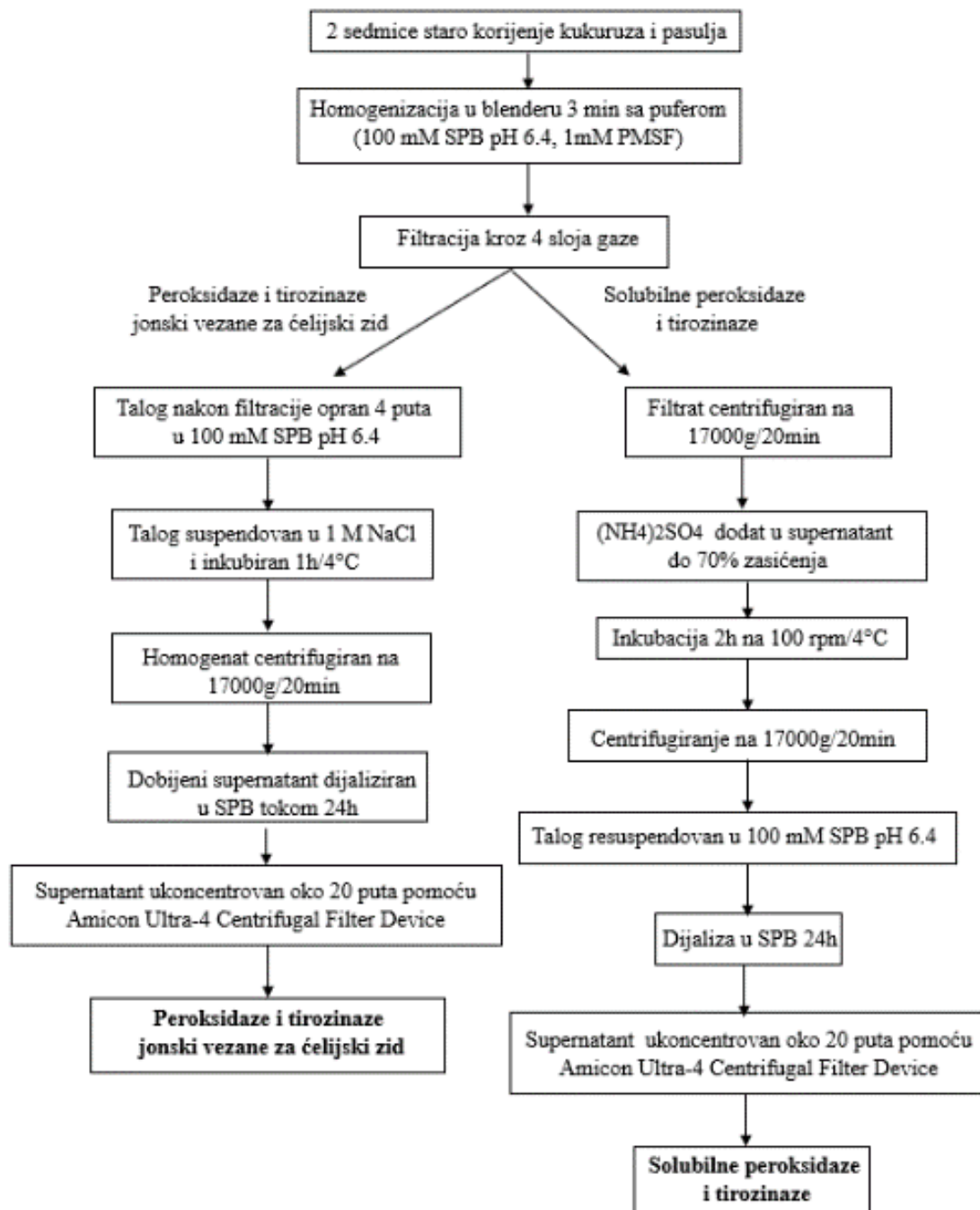
Korijenje pasulja i kukuruza je homogenizovano u blenderu tokom 3 minuta (u odnosu 1:3 = biljka: pufer) sa dodatkom natrijum fosfatnog pufera (SPB) [100mM SPB pH 6,4, 1mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF)] na 4°C. Nakon ekstrakcije, homogenizat je filtriran kroz četiri sloja gaze i procijeđeni ekstrakt je centrifugiran na 17000g/20 min. Odvojen je supernatant i tako je dobijen sirovi ekstrakt (engl. *crude extract*) iz korijena kukuruza i pasulja.

Supernatant je korišten za taloženje proteina sa 70% zasićenjem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. U supernatant je dodat čvrsti amonijum sulfat i inkubiran u trajanju od 2 sata pri laganom miješanju na 100 o/min na ledu. Nakon toga uzorci su centrifugirani (17000g/20min/4°C) i dobijeni talozi su suspendovani u SPB i prebačeni u crijevo za dijalizu, te dijalizovani nasuprot SPB-a za uklanjanje soli. Dijalizat je zatim koncentrovan (oko 20-puta) pomoću filtera za centrifugiranje (*Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device*) čija je propusnost molekulskih masa (Mw) 3 kDa. Nakon koncentrovanja ekstrakta kukuruza dobijen je bistar narandžast rastvor, dok je ekstrakt pasulja bio bistar sa žućkastom bojom. Dobijena koncentrovana proteinska frakcija je korištena za analizu solubilnih tirozinaza i peroksidaza i izmjerena je koncentracija proteina po Lowry-iju.



Slika 8. Ekstrakt ćelijskog zida iz korijena pasulja i kukuruza sa jonskim frakcijama POX

Talog sa fragmentima ćelijskog zida, dobijen nakon homogenizacije biljnog materijala, ispran je četiri puta u 100 mM SPB (pH 6,4). Da bi se ekstrahovala jonska proteinska frakcija vezana za ćelijski zid, talog je suspendovan u 1M NaCl, inkubiran 1h na ledu, a zatim centrifugiran na 17000g/20 min (Slike 8,9). Dobijeni supernatant je dijalizovan u SPB tokom 24h, da bi se otklonio višak soli. Nakon toga supernatant je koncentrovan oko 20 puta pomoću filtera za centrifugiranje (*Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device*) čija je propusnost molekulskih masa (Mw) 3 kDa. Ovako dobijen uzorak je korišten za analizu peroksidaza i tirozinaza jonski vezanih za ćelijski zid. Dobijeni ekstrakti jonski vezanih frakcija POX za ćelijski zid pasulja i kukuruza bili su bistri i bezbojni. Kompletan proces izolacije solubilnih peroksidaza (sPOX) i jonskih frakcija peroksidaza vezanih za ćelijski zid (iPOX), kao i solubilnih tirozinaza i jonskih frakcija tirozinaza vezanih za ćelijski zid prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Postupak izolacije i parcijalnog prečišćavanja solubilnih i jonski vezanih za ćelijski zid peroksidaza i tirozinaza iz korijena kukuruza i pasulja.

4.2.2. Karakterizacija izolovanih peroksidaza i tirozinaza iz biljnog materijala

4.2.2.1. Određivanje aktivnosti peroksidaza

Ukupna aktivnost solubilnih i jonski vezanih peroksidaza izolovanih iz korijena pasulja i kukuruza mjerena je spektrofotometrijski u reakcionoj smješi koja se sastojala od 100 mM SPB pH 6,4, 0,01 M pirogalola, 3,3 mM H₂O₂ i alikvota (2 μL) solubilnih POX (sPOX) ili jonskih POX (iPOX). Reakcija je započeta dodavanjem H₂O₂, a pratilo se povećanje apsorbance na 430 nm na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan). Rastvor supstrata pirogalola izuzetno je osjetljiv pa stoga mora biti svježe pripremljen i čuvan na tamnom mjestu do upotrebe. U reakciji nastaje narandžasto obojeni purpurogalin, proizvod peroksidazom katalizovane oksidacije pirogalola u prisustvu vodonik peroksida. Aktivnost peroksidaze je izračunata korištenjem koeficijenta ekstinkcije za purpurogalin ($\epsilon = 12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Aktivnost enzima (sPOX i iPOX) je izražena kao $\text{mmol mg}_{\text{prot}}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Aktivnost enzima u reakcionoj smješi (A_c), izražena u internacionalnim jedinicama [IU ili $\mu\text{mol}/\text{min}$], može se izračunati iz jednačine:

$$A_c = \frac{\Delta A_{430} \cdot V \cdot R}{\epsilon \cdot \Delta t \cdot d} \quad (1)$$

Gdje su:

$\Delta A_{430\text{nm}}$ - apsorbance na 430 nm

V – ukupna zapremina reakcione smješe

R – faktor razblaženja

ϵ – molarni koeficijent za pirogalol

Δt – vrijeme trajanja reakcije izraženo u minutima (min)

d – dužina optičkog puta u cm (najčešće 1 cm)

4.2.2.2. Supstratna specifičnost peroksidaza

Aktivnost peroksidaza je određena i u prisustvu hidroksicinamičnih kiselina kao supstrata. Oksidacija hidroksicinamičnih kiselina (*p*-kumarične, hlorogene ili kafeične kiseline) sa sPOX ili iPOX ili kukuruza i pasulja, izmjerena je u reakcionoj smješi (3 mL) koja je sadržavala 2 μL sPOX ili iPOX, 3,3 mM H₂O₂ i 0,04 mM *p*-kumarične kiseline, ili 4 mM

hlorogene ili 4 mM kafeične kiseline u 100 mM SPB (pH 6,4). Povećanje apsorbance je praćeno na 410 nm za hlorogenu i kafeičnu kiselinu, a za *p*-kumarićnu kiselinu praćeno je smanjenje apsorbance na 286 nm (Bestwick i sar., 1998).

4.2.2.3. Određivanje K_m peroksidaza

Da bi odredili K_m za solubilne i jonske POX iz pasulja i kukuruza sa pirogalolom i vodonik peroksidom pripremljene su serije različitih koncentracija ova dva supstrata. Korišteni su rastvori pirogalola u opsegu od 0,33 do 10 mM dok su za vodonik peroksid rastvori bili u opsegu od 0,083 do 6,67 mM. Mjerenja enzimske aktivnosti sa pirogalolom su raćena pri konstantnoj koncentraciji enzima (solubilnog i jonski vezanog), pri zasićujućim koncentracijama vodonik peroksida (3,3 mM) i varirajućim koncentracijama pirogalola. Takoće, mjerenja enzimske aktivnosti sa razlićitim koncentracijama vodonik peroksida su raćena sa konstantnom koncentracijom enzima (solubilnog i jonski vezanog), pri zasićujućim koncentracijama pirogalola (3,3 mM). Na osnovu dobijenih vrijednosti početnih brzina reakcije konstruisan je Michaelis-Menten grafik (zavisnost brzine enzimske katalizovane reakcije od koncentracije supstrata). Uraćena je Lineweaver-Burkova linearizacija prave i iz jednaćine prave izraćunate su vrednosti K_m . Koncentracije proteina su odrećene prema Lowry-iju (Lowry i sar., 1951).

4.2.2.4. Modifikovana SDS-PAGE

Modifikovana SDS-PAGE korišćena je za razdvajanje izoformi peroksidaza prema molekulskim masama pri ćemu su izoforme POX u nativnoj konformaciji (Mika i Luthje, 2003). Za razdvajanje proteina je korišćen 12% gel za razdvajanje i 5% gel za koncentrovanje. Konaćna koncentracija SDS-a iznosila je 0,1% (w/v) u svim rastvorima i gelovima. Uzorci su razblaćeni u puferu za uzorke (engl. *Loading buffer*) do finalnih koncentracija: 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) SDS, 10% (w/v) glicerola i 0,002% (w/v) bromfenol plavo bez redukujućih komponenti i nanošeni su na gelove bez zagrijavanja. Nakon specifićnog bojenja peroksidaza sa 1 mM 3,3-diaminobenzidinom (DAB) i 0,03% H_2O_2 u 0,1 M SPB pH 6,4 pokazano je da sve izoforme peroksidaza ostaju aktivne nakon razdvajanja na gelu za modifikovanu SDS-PAGE. Na ovaj naćin moguće je određivanje molekulskih masa izoformi peroksidaza koristeći standarde sa poznatim

molekulskim masama (Broad Range, Bio-Rad, Minhen, Njemačka) prema Laemmli (1970).

Nakon skeniranja gela za modifikovanu SDS elektroforezu, Rf vrijednosti izoformi POX-a su određene programom Image Master Total Lab TL 120 (Nonlinear Dynamics Ltd., Durham, USA).

4.2.2.5. Nativna elektroforeza (PAGE)

Za razdvajanje POX izoformi nativnom elektroforezom korišteni su 10% gel za razdvajanje i 5% gel za koncentrovanje. Pufer za uzorke je bio tri puta koncentrovan i sastojao se od 0,5 M Tris pH 6,8 (300 μ L), 10% glicerola (600 μ L), bromfenol plavog (10 μ L) i destilovane vode (90 μ L). 100 μ L uzorka je pomiješano sa 30 μ L pufera, a količina ukupnih proteina koja je nanošena na gel je 15 μ g. Pufer za elektroforezu se sastojao od 0,025 M Tris i 0,192 M Gly (pH 8,3). Kroz gel je propušтана konstantna struja od 24 mA tokom 120 minuta.

Specifično bojenje za aktivnost POX

Nakon završetka elektroforeze gel je inkubiran 10 minuta u reakcionoj smješi koja je sadržavala 10 mg 4-hloro- α -naftol, 10% metanol i 0,1% H₂O₂ u 100 mM SPB (pH 6,4). POX izoforme su se pojavile kao ljubičaste trake na prozirnem akrilamidnom gelu.

4.2.2.6. Određivanje aktivnost tirozinaza

Aktivnost tirozinaza je određivana korišćenjem supstrata L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA) i L-tirozina na 25°C mjerenjem početne brzine formiranja dopahroma (Kwon i Kim, 1996). Standardna smješa za određivanje aktivnosti sastojala se od alikvota (5 μ L) solubilnih ili jonski vezanih tirozinaza sa 2,5 mM L-DOPA (L-tirozina) u 3 mL 100 mM SPB pH 6,4. Porast apsorbance na 475 nm je mjerena pomoću UV/VIS spektrofotometra (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan). Aktivnost tirozinaza je izračunata korištenjem koeficijenta ekstinkcije za dopahrom ($\epsilon = 3,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.2.2.7. Nativna elektroforeza (PAGE)

Za razdvajanje izoformi tirozinaza nativnom elektroforezom korišteni su 10% gel za razdvajanje i 5% gel za koncentrovanje. Pufer za uzorke je bio tri puta koncentrovan i sastojao se od 0,5 M Tris pH 6,8 (300 μ L), 10% glicerola (600 μ L), bromfenol plavog (10 μ L) i destilovane vode (90 μ L). 100 μ L uzorka je pomiješano sa 30 μ L pufera, a količina ukupnih proteina koja je nanošena na gel je 15 μ g. Pufer za elektroforezu se sastojao od 0,025 M Tris i 0,192 M Gly (pH 8,3). Kroz gel je propušтана konstantna struja od 24 mA tokom 120 minuta.

Specifično bojenje za aktivnost tirozinaza

Nakon završetka elektroforeze gel je inkubiran 10 minuta u reakcionoj smješi koja je sadržavala 25 mM L-DOPA u 100 mM SPB (pH 6,4). Tirozinazne izoforme su se pojavile kao smeđe trake na prozirnrom akrilamidnom gelu.

4.2.3. Ekspresija i prečišćavanje tirozinaze (TyrBm)

Soj *Bacillus megaterium* koji sadrži tirozinazu prethodno je izolovan iz zemljišta i gen (pristup broj ACC86108) je kloniran sa His-oznakom na C-terminusu u *Escherichia coli* BL21 [16]. Čelije *E. coli* BL21 (DE3) sa pET9d/tyr (C3) uzgajane su u medijumu 0,5 L TB preko noći na 37°C u cilju ekspresije rekombinantne tirozinaze. Čelije su sakupljene centrifugiranjem, suspendovane u puferu za vezivanje, a potom homogenizirane (Spectronic Instruments Inc., Rochester, N.Y., SAD) u cilju oslobađanja rekombinantne TyrBm. Čelijski ostaci uklonjeni su centrifugiranjem i filtriranjem kroz 4 sloja gaze. Tirozinaza je prečišćena afinitetnom hromatografijom pomoću His-tag kolone, a uzorci su prije nanošenja na kolonu razblaženi u 1:2 odnosu da bi se spriječilo taloženje. Supernatant je nanešen na afinitetnu Ni (II) kolonu, koja je ranije napakovana sa Ni²⁺ jonima i ekvilibrisana sa puferom za vezivanje (GE healthcare, Buckinghamshire, Velika Britanija), dok je elucija izvedena odgovarajućim puferom (koji uključuje 500 mM imidazola). Koncentracija proteina eluiranih frakcija mjerena je pomoću Nanodrop-a (Thermo Scientific, MA, USA) s obzirom na sljedeće parametre $M_w = 35,28$ kDa i $\epsilon = 75,39$. Step prečišćenja je praćen SDS elektroforezom. Uzorci sa prečišćenim proteinom, kao i čelijski ekstrakt su nanešeni na SDS-PAGE gel, a prečišćene frakcije su kombinovane za

dalje analize. Da bi se uklonio imidazol u puferu prečišćenog proteina, enzim je dijaliziran naspram 50 mM Tris-HCl pufera u toku 24h. Na kraju, određena je aktivnost tirozinaze sa 1 mM L-Dopa i L-tirozinazom kao supstratima. Dobijena rekombinantna tirozinaza je zamrznuta u tečnom azotom i čuvana na -80 °C do upotrebe.

4.2.3.1. Aktivnost tirozinaze bakterijskog porijekla

Tirozinazna (TyrBm) monofenolaza i difenolazna aktivnost mjerene su pomoću L-tirozina i L-DOPA kao supstrata, kako je prethodno opisano (Shuster i Fishman, 2009). Reakcija je mjerena na 25°C korištenjem ploča sa 96 bunarčića sa zapreminom od 200 µL. Aktivnost je mjerena praćenjem formiranja L-dopahroma kroz porast absorbance na 475 nm tokom 10 minuta reakcije. Tris-HCl pufer (50 mM pH 7,5) i 0,01 mM CuSO₄ (finalna koncentracija 10 µM) su dodati u sve bunarčiće. Enzim je dodat u finalnoj koncentraciji od 0,012 mg/mL (0,34 µM). Na kraju je u bunarčiće dodat supstrat (L-tirozina ili L-Dopa) konačne koncentracije od 1 mM u cilju iniciranja reakcije. Negativni kontrolni eksperimenti (slijepa proba) su izvedeni bez enzima. Apsorbance u bunarčićima sa reakcionim smješama su očitane preko Eon microplate reader (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) na talasnoj dužini od 475 nm u toku 10 minuta, uz mjerenje apsorbance svakih 12 sekundi. Step formiranja dopahroma definisan je kao nagib u području linearne zavisnosti apsorbance od vremena reakcije. Sva merenja su izvršena u duplikatima.

TyrBm aktivnost u alkalnom pH

Kako bi se optimizovala enzimska reakcija i kako bi se prilagodili uslovima rastvorljivosti zeina i proteina graška u alkalnom pH, monofenolazna aktivnost tirozinaza na pH 10 i 11 određena je spektrofotometrijski sa L-tirozinom i upoređena je sa aktivnošću TyrBm sa pH 7,4 puferu.

4.2.4. Određivanje koncentracije proteina prema Lowry

Koncentracija ukupnih proteina određivana je metodom po Lowry-iju (Lowry i sar., 1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji kupri jona (Cu²⁺) jona sa peptidnim vezama proteina u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa (Folin-Ciocalteu reagens) sa aromatičnim amino kiselinama tirozinom i triptofanom. Nakon

vezivanja za peptidne veze joni Cu^{2+} redukuju se u kupro jone (Cu^+) i formira se kompleks Cu^+ protein, koji reaguje sa dodatim Folin-Ciocalteu reagensom. Nastali kompleks ima plavu boju čiji je maksimum apsorpcije na talasnoj dužini svetlosti od 550 nm. Vrijednost apsorbanace rastvora direktno je proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku.

4.2.5. SDS-PAGE elektroforeza

Za razdvajanje proteina primjenjena je diskontinualna gel elektroforeza (Laemmli, 1970) sa 4% gelom za koncentrovanje i 15% gelom za razdvajanje. Uzorci su razblaženi dH_2O do koncentracija od $0,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. $10 \mu\text{L}$ pufera za uzorak 4 puta koncentrovanog pomiješano je sa $30 \mu\text{L}$ uzorka i uzorci su kuhani 10 minuta na 95°C . Elektroforeza je sprovedena pomoću mini-gel uređaja (Bio-Rad, Richmond, Kalifornija). Pripremljeni uzorci ($40 \mu\text{L}$) nanešeni su na gelove i pufer za elektroforezu, Tris-glicin pH 8,3 dodat je u kadu za elektroforezu. Konstantna voltaža od 80V primjenjena je dok su uzorci prolazili kroz gel za koncentrovanje, a povećana je na 120V za prolazak kroz gel za razdvajanje. Po završetku elektroforeze, gel je inkubiran u CBB (Coomassie Brilliant Blue R-250) 20 minuta, a nakon toga je vršeno obezbojavanje u rastvoru za obezbojavanje [metanol:sirćetna kiselina:voda, 20:10:70 (v/v/v)] u toku 48h. Molekulska masa proteina je određena prema komercijalnom markeru - Dual Color (Bio-Rad).

4.2.6. Proteoliza u gelu (eng. *In gel*) i masena spektrometrija

Čisti SDS-PAGE gel sa sPOXc (solubilne peroksidaze kukuruza) i sPOXb (solubilne peroksidaze pasulja) su pripremljeni uzimajući u obzir izbegavanje kontaminacije keratinom (rukavice i kosa). Za ekstrakciju su korišćene trake sa ekstraktom sirovog enzima (sPOXc i sPOXb). Proteini razdvojeni na 12% gelu za SDS elektroforezu sječeni su korištenjem čistog žileta i zatim redukovani sa 3 mM DTT ($60^\circ\text{C}/30$ minuta), modifikovanim sa 10 mM jodoacetamida u 100 mM amonijum bikarbonatu (u mraku, na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta) i razblaženi u 10% acetonitrilu (ACN) i 10 mM amonijum bikarbonata sa modifikovanim tripsinom (Promega) preko noći na 37°C . Dobijeni triptični peptidi su podvrgnuti hromatografiji sa reverznom fazom na 0,075 X 200-mm fused silica capillaries (J&W) prečnika 0,075 X 200 mm, pakovanom sa Reprosil materijalom reverzne faze (Dr Maisch GmbH, Njemačka). Peptidi su eluirani sa linearnim

gradijentima: 65 minuta od 5 do 45% i 15 minuta sa 95% acetonitrilom sa 0,1% mravljom kiselinom u vodi, sa protokom od 0,25 μ L/min. Masena spektrometrija je izvršena pomoću ion-trap masenog spektrometra (OrbitrapXL, Thermo Fisher) u pozitivnom režimu korišćenjem repetitivnog potpunog MS skeniranja praćenim sa *collision induces dissociation* (CID) i 5 najdominantnijih jona odabranih od prvog MS skeniranja. Podaci o masenoj spektrometriji analizirani su korišćenjem Protein Discoverer 1,4 (ThermoFisher inc.) koristeći Sequest pretraživač, pretražujući baze pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) i kukuruza (*Zea mays* L.) (Uniprot). Stepenn lažnih otkrića na nivou peptida i proteina (FDR) podešena je na 1% koristeći strategiju *target-decoy*.

4.2.7. Model proteini

Proteini krompira, hidrofobni proteini kukuruza (zeini) i proteini graška odabrani su kao model proteini i supstrati za ispitivanje sposobnosti peroksidaza korijena kukuruza i pasulja i TyrBm za umrežavanje. Komercijalno dostupni proteini graška su korišteni, dok su proteini krompira prečišćeni iz krompira, a zein iz brašna od kukuruznog glutena.

4.2.7.1. Izolacija frakcija proteina krompira

Proteini krompira su izolovani iz svježeg krompira (*Solanum tuberosum* L.) kupljenog u lokalnom supermarketu (Haifa, Izrael). Izolacija je obavljena prema metodi van Koningsveld i saradnika (van Koningsveld i sar., 2001) sa neznatnim promjenama. Ukratko, krompir je oljušten i isjeckan na male dijelove i zamrznut na -80°C u trajanju od 30 minuta. Uzorci smrznutog krompira su suspendovani u puferu (25 mM SPB, pH 7,0, 4 mM natrijum metabisulfit) (odnos 1:1) i homogenizovani korišćenjem blendera na niskoj brzini tokom 5 minuta. Izblendana smješa je filtrirana kroz gazu (4 sloja) i filtrat je centrifugiran na 14000 g tokom 30 minuta na 4°C . Supernatant je zatim vakum-filtriran kroz 1,2 μm GF/C Whatman filtera. Taloženje proteina izvršeno je postepenim dodavanjem 60% amonijum sulfata. Smješe su inkubirane 90 minuta na 100 o/min i 4°C . Dobijeni talozi nakon centrifugiranja (14000g/30min/ 4°C) su rastvoreni u 25 mM SPB (pH 7) i dijalizovani naspram istog pufera tokom 24h na 4°C (100 o/min) kako bi se uklonio amonijum sulfat. Nakon dijalize, uzorci su liofilizovani. Čistoća proteina krompira

određena je na SDS-PAGE gelu u poređenju sa komercijalnim Solanic® Avebe PP izolatima 206P i 306P.

Sadržaj vode u proteinima krompira

Sadržaj vode određen je sušenjem liofilizovanih koncentrata proteina krompira u triplikatima u peći na 150°C tokom 16h i određivanjem razlike u težini prije i nakon sušenja (Løkra i sar., 2009).

Ukupan sadržaj fenola u proteinima krompira

Ukupan sadržaj fenola u ekstraktu određen je metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i sar., 1999). Pomiješano je 20 µL različitih koncentracija ekstrakta proteina u vodi sa 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa (1:10). Nakon 7 minuta dodato je 100 µL rastvora Na₂CO₃ (200 g/L) i inkubirano u tami tokom 60 minuta (30°C). Spektrofotometrijski je određena koncentracija fenola mjerenjem apsorbance na talasnoj dužini od 765 nm. Ukupan sadržaj fenola izračunat je na osnovu kalibracione krive za galnu kiselinu i izražen kao ekvivalenti galne kiseline (GAE) u miligramama po litru uzorka.

4.2.7.2. Izolacija zeina

Zein je ekstrahovan iz brašna od kukuruznog glutena (engl. CGM- *corn gluten meal*) prema metodi Matsushima i saradnika (Matsushima i sar., 1997) sa malim promjenama. CGM je pomiješan sa 2-propanolom (1:10 w/v) i mješan je preko noći na sobnoj temperaturi. Taloženje je izvršeno dodatkom 2% NaCl i smješa je miješana preko noći. Ekstrakcija zeina je izvršena korišćenjem 90% etanola. Rastvor je dijalizovan naspram vode i liofilizovan. Liofilizovani zein iz nekoliko eksperimenata je sakupljan kako bi se dobila jedna homogena serija proteina. Identifikacija i kvantifikacija proteinskih frakcija izvršena je korišćenjem SDS-PAGE.

4.2.8. Umrežavanje proteina krompira katalizovano peroksidazma i tirozinazama iz kukuruza i pasulja

Proteini krompira (1%) su rastvoreni u 100 mM SPB pH 6,4 i mješani 30 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcija umrežavanja je izvedena sa potpuno rastvorenim proteinima

krompira dodavanjem sPOX ili iPOX izolovanih iz korijena kukuruza i pasulja. Enzimi, sPOX ili iPOX su dodati u rastvor proteina krompira u odnosu 1:25 (enzim:protein). Kontrolni uzorci proteina tretirani su na isti način, ali bez dodavanja enzima. Pored toga, svakih 5 minuta 2 μ L 50 mM H_2O_2 rastvora je dodavano u reakcionu smješnu uzorka sa enzimom, kao i bez enzima (Dhayal i sar., 2014). Proces umrežavanja proteina krompira praćen je i bez dodatka H_2O_2 u reakcionu smješnu, što bi predstavljalo tirozinaznu sposobnost umrežavanja. Na isti način je praćeno i umrežavanje proteina krompira katalizovano sa komercijalnom peroksidazom iz rena (HRP) uz postepeno dodavanje H_2O_2 , u cilju poređenja sa POX izolovanim iz kukuruza i pasulja. Kako bi se ispitala uloga fenolnih medijatora u procesu umrežavanja proteina ista reakcija sa HRP je ponovljena, ali sa dodatkom 2 mM kafeične kiseline (Isaschar-Ovdat i sar., 2015) u sve reakcione smješe: 1) kontrolna reakciona smješa sa proteinima krompira i H_2O_2 bez HRP; 2) reakciona smješa sa proteinima krompira, H_2O_2 i HRP, kao i u 3) rastvor koji sadrži samo HRP. Reakcione smješe su inkubirane na 37°C pri 250 o/min u inkubatorskom shaker-u (inkubator Orbital Shaker, TU-400, MRC, Holon) tokom 5h (12h). Uzorci su uzeti tokom različitih vremenskih perioda (0, 60, 180 i 300 minuta nakon početka inkubacije) i reakcija je zaustavljena direktnim mješanjem reakcione smješe sa puferom za uzorak elektroforeze (x4) sa odnosom 1: 1 (v/v). Uzorci su analizirani SDS-PAGE.

4.2.9. Umrežavanje biljnih proteina (krompira, grašak i zein) sa TyrBm

Proteini krompira (1%, w/v) su suspendovani u 25 mM Na fosfatnom puferu pH 7 i miješani 30 minuta na sobnoj temperaturi.

1% (w/v) zeina je rastvoren u 50 mM SPB pH 10 i rastvor je miješan preko noći na 4°C.

Proteini graška su rastvoreni u 50 mM Tris-HCl na pH 10 i miješani preko noći na 4°C. Disperzija proteina graška je centrifugirana na 7500 o/min tokom 5 minuta, a supernatant sa rastvorljivim proteinom (koncentracija od 1% w/w) je korišten u daljnim eksperimentima umrežavanja.

$CuSO_4$ je dodat u 1:20 molarnom odnosu sa enzimom. Reakcija umrežavanja je sprovedena tako što je TyrBm dodan u rastvore biljnih proteina u odnosu 1:25 (TyrBm: protein) i reakciona smješa je inkubirana na 37°C uz konstantno miješanje na 250 o/min u inkubatorskom šejkeru (incubator Orbital Shaker, MRC, Holon, Izrael). Kontrolni uzorci rastvora biljnih proteina su tretirani isto, ali bez dodavanja enzima.

Uzorci su uzeti u različitim vremenskim intervalima (nakon 0, 30, 60, 120, 180 i 240 minuta) i reakcija je zaustavljena direktnim miješanjem reakcione smješe sa puferom za uzorak elektroforeze (x4) u odnosom 3:1 (v/v). Uzorci su analizirani SDS-PAGE.

Pored toga, rastvorljivost TyrBm-umreženog zeina je procijenjena na kraju inkubacionog perioda. Uzorci su liofilizovani, rastvoreni u etanolu i vizualno posmatrani.

4.2.10. Statistička obrada podataka

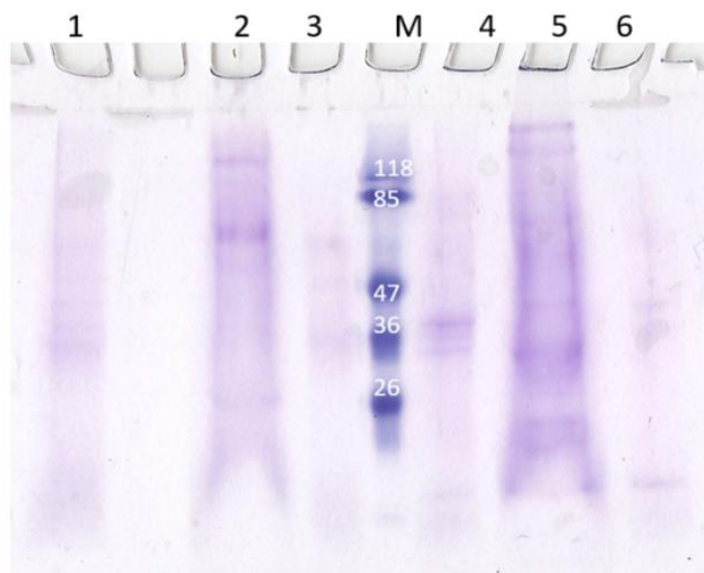
Rezultati su prikazani koristeći Microsoft Office Excell 2007, dok je za statističku obradu korišten program SigmaPlot 11.0. (SigmaPlot 11.0, Systat Software, Inc. USA) u okviru kojeg su razlike između prosječnih vrijednosti rezultata utvrđene t-testom na nivou značajnosti 5% ($p < 0,05$). Svi rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri ponavljanja \pm standardna devijacija (SD).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Izolacija i karakterizacija enzima

5.1.1. Izolacija i karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz korijena kukuruza i pasulja

Solubilne i jonski vezane POX djelimično su prečišćene iz korijena kukuruza i pasulja. Koraci prečišćavanja su prikazani na Slici 9. Na SDS-PAGE gelu (Slika 10) prikazani su proteinski profili *crude* ekstrakta, solubilne proteinske frakcije i proteinske frakcije jonski vezane za ćelijski zid.



Slika 10. SDS-PAGE tokom prečišćavanja solubilnih POX iz korijena kukuruza (sPOXc) i pasulja (sPOXb) i jonskih peroksidaza vezanih za ćelijski zid kukuruza (iPOXc) i pasulja (iPOXb). 1 – *crude* ekstrakt korijena pasulja; 2 – frakcija sa solubilnim POX pasulja nakon prečišćavanja sa 70% amonijum sulfatom; 3 – frakcija sa jonski vezanim POX pasulja; M - proteinski standardi sa odgovarajućom molekulskom masom 4 - *crude* ekstrakt korijena kukuruza; 5 frakcija sa solubilnim POX kukuruza nakon prečišćavanja sa 70% amonijum sulfatom; 6 - frakcija sa jonski vezanim POX kukuruza. 20 μ L uzorka je nanešeno na gel i uzorci 2,3,5,6 su koncentrovani 20 puta.

Na osnovu rezultata dobijenih TotalLab analizom, u svim frakcijama najintenzivnije proteinske trake bile su u rasponu od 30-40 kDa (Slika 10). Kod obe proteinske frakcije izolovane iz korijena pasulja i kukuruza i koncentrovane, vidljive su proteinske trake manjih molekularnih masa, u rasponu od 20-26 kDa, ali i traka od 78 kDa i traka veća od 130 kDa. Frakcije jonski vezane za ćelijski zid imale su izražene proteinske trake u rasponu od 30-40 kDa.

Koncentracija proteina je određena u uzorcima *crude* ekstrakta i koncentrovanim ekstraktima dobijenim iz korijena kukuruza i pasulja i rezultati su prikazani u Tabeli 1. Koncentrovani ekstrakti bogati solubilnim i frakcijama POX jonski vezani za ćelijski zid, korišteni su u daljem radu.

Tabela 1. Koncentracija proteina prema Lowry-u tokom prečišćavanja solubilnih frakcija POX iz korijena kukuruza (sPOXc) i pasulja (sPOXb) i frakcija jonski vezanih peroksidaza za ćelijski zid kukuruza (iPOXc) i pasulja (iPOXb) u ekstraktu (aliquot) i nakon koncentrovanja

	<i>Koncentracija proteina (mg/mL)</i>			
	frakcija sa solubilnim POX kukuruza	frakcija sa solubilnim POX pasulja	frakcija sa jonski vezanim POX kukuruza	frakcija sa jonski vezanim POX pasulja
<i>crude</i> ekstrakt	1,26 ± 0,12	0,69 ± 0,09	0,32 ± 0,06	0,13 ± 0,01
djelimično prečišćene proteinske frakcije (nakon zasićenja sa 70 % amonijum sulfatom)	1,47 ± 0,23	1,52 ± 0,24	1,35 ± 0,29	0,24 ± 0,02

Iz Tabele 1 može se vidjeti da je nakon taloženja sa amonijum sulfatom i koncentrovanja solubilni ekstrakt kukuruza imao 1,2 puta više proteina nego *crude* ekstrakt, dok je solubilni ekstrakt pasulja dobijen na isti način imao 2,2 puta veću koncentraciju proteina. Jonske frakcije vezane za ćelijski zid kukuruza nakon koncentrovanja imale su 4,2 puta veću koncentraciju proteina nego *crude* ekstrakt, dok su jonske frakcije pasulja imale svega 1,8 puta veću koncentraciju proteina. Generalno, *crude* ekstrakti solubilnih proteinskih frakcija izolovanih iz korijena pasulja i kukuruza, imali su veće koncentracije proteina nego *crude* ekstrakti jonski vezanih frakcija za ćelijski zid pasulja i kukuruza.

5.1.2. Biohemijske osobine solubilnih peroksidaza i tirozinaza detektovanih u korijenu pasulja i kukuruza masenom spektrometrijom

Solubilne frakcije POX iz kukuruza i pasulja su podvrgnute proteolizi u gelu i rezultati su detektovani na masenom spektrometru (LC-MS/MS) i prikazani su na Tabelama 2,3 i 4.

Rezultati masene spektrometrije pokazali su prisustvo 18 solubilnih POX u korijenu kukuruza sa molekulskim masama u opsegu od 33,1-38,7 kDa i sa pI vrijednostima u opsegu od 6,06-8,90 (Tabela 2). Kod pasulja je detektovan znatno manji broj POX, svega 5 sa molekulskim masama od 35,2-38 kDa i sa pI vrijednostima u opsegu od 5,08-8,75 (Tabela 3). Važno je naglasiti da su u obzir uzimani samo rezultati sa više od 50% poklapanja proteinske sekvence sa identifikovanim peptidima (*coverage*), osim za tirozinaze (polifenoloksidaze). Stoga, broj POX i kod pasulja i kod kukuruza je mnogo veći, ako bi se uzimale sve vrijednosti *coverage*. Dužina aminokiselinske sekvence solubilnih peroksidaza pasulja i kukuruza dobijena LC-MS/MS, bila je od 320-367 aminokiselina za sPOX kukuruza (Tabela 2), dok je za sPOX pasulja bila od 329-348 (Tabela 3), što je uobičajena dužina polipeptidnih lanaca Klase III sekretornih peroksidaza (Welinder, 1992). Dosadašnji podaci ukazuju na veliku varijabilnost peroksidaznih primarnih sekvenci unutar pojedinačnih biljnih vrsta (preklapanje aminokiselinske sekvence (*coverage*) ponekad je manje od 35%) (Hiraga i sar., 2001), što je u skladu sa našim dobijenim rezultatima.

Većina peroksidaza su glikoproteini sa jednim polipeptidnim lancem od 300-350 aminokiselinskih ostataka i njihova molekulska masa varira od 33-55 kDa (Veljović Jovanović i sar., 2018). Iako je većina peroksidaza monomerna, pokazano je da su neke

homotetrameri, kao npr. peroksidaza iz kokosa (Mujer i sar., 1983), heterotrimeri kao peroksidaza iz *Leucaena leucocephala* (Pandey i Dwivedi, 2011) i homodimeri (Regalado i sar., 1999). Pokazano je da su sve peroksidaze u *Arabidopsis thaliana* (kodirane sa 73 gena), imale do 98% identične aminokiselinske sekvence (Welinder, 1992). Takođe, u literaturi je pokazano da su moguće varijacije molekulskih masa peroksidaza izolovanih iz različitih vrsta, zbog ugljenohidratne komponente vezane za polipeptidni lanac, kao što je to slučaj za peroksidaze izolovane iz korijena *Brasica napusa* (Duarte-Vázquez i sar., 2000). Zbog različitih post-translacionih modifikacija (PTM), koje utiču na mehanizme regulacije enzimskih aktivnosti *in vivo*, često više od jednog proteinskog oblika, u vidu izoformi, potiču iz određenog gena (Laugesen i sar., 2007). Štaviše, pokazano je da su određeni izoenzimi uključeni u dva procesa, kao što su, na primjer, lignifikacija i oksidativni stres indukovani napadom patogena (Young i sar., 1995; Morimoto i sar., 1999).

Relativno je malo detaljnih izvještaja o regulaciji post-translacionih modifikacija, osim glikozilacije peroksidaza. Klase III peroksidaza su uglavnom glikozilovane i razlike se ogledaju u broju ugljenohidratnih ostataka i stepenu grananja, kao i u njihovom rasporedu duž polipeptidnog lanca (Deepa i Arumughan, 2002). Uloga glikana u strukturi i funkciji POX intenzivno je ispitivana i pokazano je da N-glikozilacija utiče na uvijanje proteina, katalitičku aktivnost, subcelularnu lokalizaciju, K_m vrijednost, termostabilnost, proteolitičku osjetljivost i unutarćelijski transport (Lige i sar., 2001; Zhang i sar., 2004; Veljović Jovanović i sar., 2018).

Jedini antioksidativni enzimi u apoplastu/ćelijskom zidu i vakuolama su superoksid dismutaze i peroksidaze (Takahama, 2004; Ferreres i sar., 2011). Nađeno je da peroksidaze čine 6,4% od 500 analiziranih proteina ćelijskih zidova (Jamet i sar., 2008). Oko 10% svih peroksidaza su vakuolarne, ali u nekim biljkama, kao što su *C. roseus* je čak 90% (Ferreres i sar., 2011).

Prema ranijim objavljenim rezultatima nakon što je izvršena subcelularna lokalizacija 10 peroksidaznih gena iz topole i nakon ekspresije u *Nicotiana benthamiana*, čak 8 peroksidaza je nađeno u vakuoli, dok su dvije peroksidaze bile vezane za ćelijski zid (Veljović Jovanović i sar., 2018). Druge proteomiks studije su pokazale da su 32 peroksidazne izoforme u *A. thaliana* bile u ekstracelularnim frakcijama, 17 u plazma membrani, dok je 7 bilo u vakuolama (Veljović Jovanović i sar., 2018). U ekstraktima

listova, vakuolarne peroksidaze predstavljaju više od 90% rastvorljive gvajakol peroksidazne aktivnosti, dok se ostatak pripisuje jonskim i kovalentnim frakcijama vezanim za ćelijski zid.

Tirozinaze ili polifenoloksidaze (PPO) nisu detektovane u korijenu pasulja, dok su svega dvije polifenoloksidaze detektovane u korijenu kukuruza, sa molekulskom masom od 65,5 kDa (pI 7,97) i 70,9 kDa (pI 7,30) (Tabela 4). Prema literaturnim podacima, molekulska masa jedne od izoformi PPO izolovanih iz korijenja orhideja bila je 68 kDa, što je slično molekulskoj masi PPO izolovanoj iz korijena kukuruza (Tabela 4). Aminokiselinske sekvence polifenoloksidaza kukuruza dobijene LC-MS/MS (Nicolas i sar., 1994) bile su 597 i 645 aminokiselina (Tabela 4).

Tabela 2. Lista solubilnih POX iz korijena kukuruza detektovana masenom spektrometrijom (LC-MS/MS)

Pristup	Opis	Score ¹	Coverage ²	Proteini ³	Unique Peptides ⁴	Peptidi ⁵	AAs ⁶	MW [kDa]	calc. pI
B4FG39	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=100193733 PE=2 SV=1 - [B4FG39_MAIZE]	413,48	62,50	2	27	27	344	36,6	7,85
B4FHG3	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=542464 PE=2 SV=1 - [B4FHG3_MAIZE]	471,42	71,15	5	16	27	364	38,7	6,05
B4FH68	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=100194034 PE=2 SV=1 - [B4FH68_MAIZE]	373,16	70,14	5	16	27	355	37,5	6,67
A0A1D6N0K3	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=ZEAMMB73_Zm00001d042022 PE=3 SV=1 - [A0A1D6N0K3_MAIZE]	227,57	59,00	1	25	26	361	38,1	7,90
A0A1D6LYW3	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=542505 PE=3 SV=1 - [A0A1D6LYW3_MAIZE]	432,04	58,89	4	17	25	360	38,6	6,96
A0A1D6LYW3	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=542505 PE=3 SV=1 - [A0A1D6LYW3_MAIZE]	432,04	58,89	4	17	25	360	38,6	6,96
A0A1D6LYW3	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=542505 PE=3 SV=1 - [A0A1D6LYW3_MAIZE]	432,04	58,89	4	17	25	360	38,6	6,96
A5H8G4	Peroxidase 1 OS=Zea mays OX=4577 GN=PER1 PE=1 SV=1 - [PER1_MAIZE]	377,18	50,14	14	1	22	367	38,3	7,14
A0A1D6MSC0	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=ZEAMMB73_Zm00001d040702 PE=3 SV=1 - [A0A1D6MSC0_MAIZE]	332,32	50,14	14	1	22	367	38,3	7,14
B6THU9	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=100283382 PE=2 SV=1 - [B6THU9_MAIZE]	169,75	53,35	2	21	21	328	35,4	7,66
A0A1D6F4C8	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=541674 PE=3 SV=1 - [A0A1D6F4C8_MAIZE]	377,73	62,81	12	15	19	320	33,5	8,07
B4FSW5	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=100273104 PE=2 SV=1 - [B4FSW5_MAIZE]	130,40	55,59	7	8	18	340	37,0	6,06

A0A1D6F4C8	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=541674 PE=3 SV=1 - [A0A1D6F4C8_MAIZE]	377,73	62,81	12	15	19	320	33,5	8,07
B4FSW5	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=100273104 PE=2 SV=1 - [B4FSW5_MAIZE]	130,40	55,59	7	8	18	340	37,0	6,06
A5H452	Peroxidase 70 OS=Zea mays OX=4577 GN=PER70 PE=1 SV=1 - [PER70_MAIZE]	243,74	63,86	2	2	16	321	33,5	8,90
A0A1D6IMZ9	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=ZEAMMB73_Zm00001d022457 PE=3 SV=1 - [A0A1D6IMZ9_MAIZE]	268,91	78,44	3	15	16	320	33,2	6,65
B6T3V1	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=100282124 PE=2 SV=1 - [B6T3V1_MAIZE]	122,62	55,56	3	15	16	333	35,7	8,18
A0A1D6H658	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=ZEAMMB73_Zm00001d016185 PE=3 SV=1 - [A0A1D6H658_MAIZE]	198,28	58,26	2	15	16	321	33,1	8,07

¹Score-prikazuje procjenu proteina, u vidu zbira procenata pojedinačnih peptida

²Coverage- prikazuje procenat proteinske sekvence pokrivena identifikovanim peptidima

³Proteins-prikazuje broj identifikovanih proteina u proteinskoj grupi glavnog proteina

⁴Unique peptides-prikazuje broj peptidnih sekvenci jedinstvenih za proteinsku grupu

⁵Peptidi-prikazuje broj različitih peptidnih sekvenci u grupi proteina

⁶AAs-prikazuje dužinu sekvence proteina (broj aminokiselina)

Tabela 3. Lista solubilnih POX iz korijena pasulja detektovana masenom spektrometrijom (LC-MS/MS)

Pristup	Opis	Score	Coverage	Proteini	Unique Peptides	Peptidi	AAs	MW [kDa]	calc. pI
V7C6Q8	Peroxidase OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 GN=PHAVU_003G003100g PE=3 SV=1 - [V7C6Q8_PHAVU]	413,03	74,85	3	24	27	330	35,2	5,08
V7BY15	Peroxidase OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 GN=PHAVU_005G113800g PE=3 SV=1 - [V7BY15_PHAVU]	238,22	57,72	3	25	26	324	35,8	6,84
V7CNV0	Peroxidase OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 GN=PHAVU_002G166300g PE=3 SV=1 - [V7CNV0_PHAVU]	215,50	72,51	5	24	26	331	36,6	8,43
V7BR14	Peroxidase OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 GN=PHAVU_006G129400g PE=3 SV=1 - [V7BR14_PHAVU]	317,53	56,03	1	24	25	348	38,0	7,87
V7CCH8	Peroxidase OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 GN=PHAVU_003G236500g PE=3 SV=1 - [V7CCH8_PHAVU]	268,76	51,98	3	21	22	329	36,0	8,75

Tabela 4. Lista solubilnih polifenoloksidaza u korijenu kukuruza detektovana masenom spektrometrijom (LC-MS/MS)

Pristup	Opis	Score	Coverage	Proteini	Unique Peptides	Peptidi	AAs	MW [kDa]	calc. pI
A0A1D6N9K8	Polyphenol oxidase chloroplastic OS=Zea mays OX=4577 GN=103651121 PE=4 SV=1 - [A0A1D6N9K8_MAIZE]	7,17	4,36	1	2	2	597	65,5	7,97
B4FHG3	Peroxidase OS=Zea mays OX=4577 GN=542464 PE=2 SV=1 - [B4FHG3_MAIZE]	16,42	6,36	1	4	4	645	70,9	7,30

Što se tiče prekrivenosti proteinske sekvence sa identifikovanim peptidima (*coverage*) ona je bila manja od 7% za tirozinaze (polifenoloksidaze).

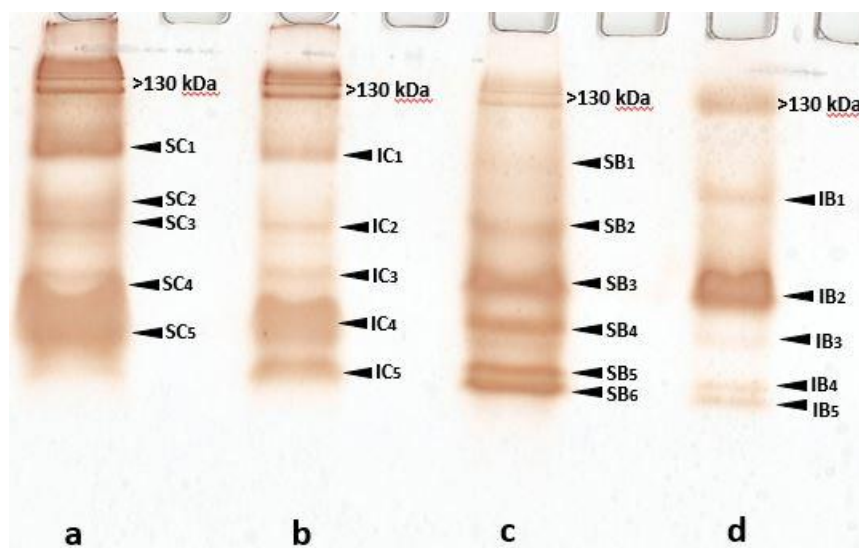
Subcelularna lokacija PPO je veoma važna zbog fiziološke uloge enzimu. Većina PPO-a je lokalizovana u plastidima viših biljaka (Mayer i Harel, 1979; Mayer, 2006). PPO se obično nalazi u tilakoidnoj membrani hloroplasta (Nicolas i sar., 1994), ali su takođe pronađene i u vazdušastom korijenju orhideja (Ho, 1999). Pretpostavlja se da je PPO sintetisana na ribozomima u citoplazmi i vjerovatno je integrisana u neaktivnoj formi u plastidima (Yoruk i Marshall, 2003). Generalno, aktivnost PPO mnogo je veća kod mladih nego kod zrelih tkiva (Nicolas i sar., 1994; Serradell i sar., 2000; Mayer, 2006) ukazujući na njihovu ulogu u odbrani biljaka. Smanjenje aktivnosti može biti posljedica nekoliko razloga kao što su proteolitička degradacija, konformacione promjene i smanjene koncentracije enzimskih aktivatora ili supstrata (Laveda i sar., 2000; Mayer, 2006).

Ranije je opisano prisustvo i aktivnost PPO u korijenu trave roda *Bromus* (Holzapfel i sar., 2010), koja se odlikovala uskom suspsratnom specifičnošću i odsustvom monofenolazne aktivnosti. Prema studiji Holzapfel i saradnika (2010) značajna PPO aktivnost među travama ograničena je na rod *Bromus*, dok je korijenje drugih testiranih trava, uključujući članove filogenetski bliskih taksona, imalo nisku PPO aktivnost ili su bili bez aktivosti. Prema literaturnim podacima PPO aktivost je izmjerena u listovima pasulja, ali ne u korijenu (Jukanti, 2017). Na osnovu svega navedenog, prisustvo PPO ili tirozinaza u korijenju biljaka nije uobičajeno, što su pokazali i naši rezultati dobijeni proteomskom analizom gdje je nađeno odsustvo PPO ili tirozinaza u ekstraktu korijena pasulja i prisustvo 2 izoforme PPO u ekstraktu korijena kukuruza. Da bi se sa sigurnošću moglo potvrditi odsustvo PPO, dobijeni ekstrakti su korišteni za određivanje enzimske aktivosti.

5.1.3. Karakterizacija peroksidaznih i tirozinaznih izoformi modifikovanom SDS i nativnom gel elektroforezom

Solubilne i jonski vezane POX-a djelimično prečišćene iz korijena kukuruza i pasulja analizirane su modifikovanom SDS-PAGE. Modifikovana SDS-PAGE sa niskom koncentracijom SDS bojena sa 3,3-diaminobenzidinom (DAB), pokazala je peroksidazne izoforme (Slika 11). *Crude* ekstrakt bogat solublним i jonski vezanim peroksidazama iz korijena kukuruza i pasulja odlikovao se razlikama u broju peroksidaznih izoformi kao i širokim rasponom molekulskih masa izoformi. U svim izolatima su prisutne uobičajene

izoforme peroksidaza od oko 45 i 38 kDa, kao i izoforme sa molekulskom masom većom od 130 kDa. Ova atipična frakcija visoke molekulske mase, oko 130 kDa, pronađena je u svim frakcijama pasulja i kukuruza, što je ranije bilo pokazano za peroksidaze jonski vezane za ćelijski zid kukuruza (Hiraga i sar., 2001; Hadži-Tašković Šukalović i sar., 2015). Tako visoke molekulske mase su takođe otkrivene među peroksidazama čvrsto vezanim za plazma membranu korijena kukuruza, kao i kod drugih solubilnih peroksidaza različitih biljaka i pripisane su oligomernim formama od 63 kDa (Mika i Luthje, 2003; Mika i sar., 2010). Osim peroksidaza molekulske mase od 78 kDa, u svim frakcijama kukuruza i pasulja su identifikovane tipične izoforme u opsegu od 28-60 kDa (Hiraga i sar., 2001). Sa Slike 11 može se vidjeti da su izoforme sa molekulskim masama oko 50 i 78 kDa prisutne u svim POX frakcijama osim u jonskoj frakciji pasulja (iPOXb). Izoforma od oko 35 kDa je pronađena u jonskoj frakciji kukuruza (iPOXc) i pasulja (iPOXc) i u solubilnim (sPOXc) frakcijama kukuruza.

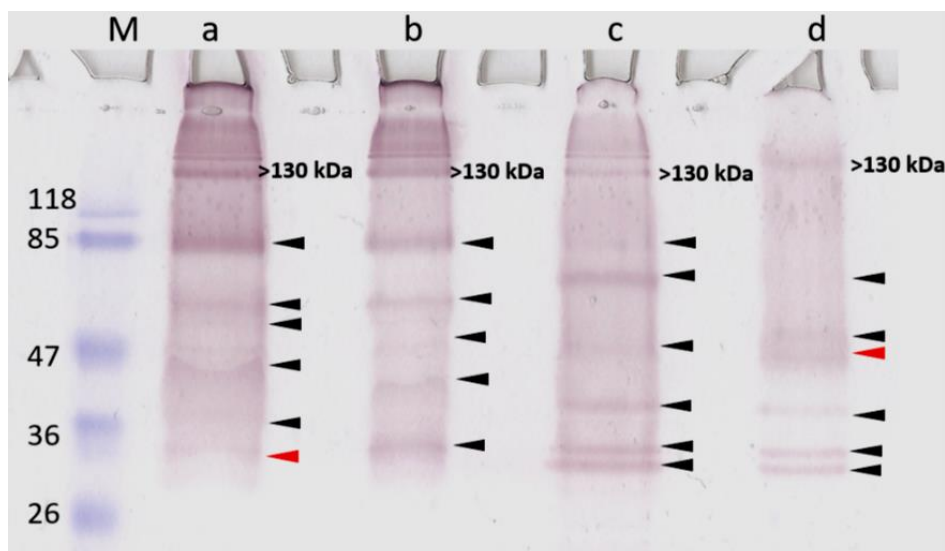


Slika 11. Razdvajanje POX izoforni modifikovanom SDS-PAGE: (a) solubilne POX kukuruza (b) POX jonski vezane za ćelijski zid kukuruza; (c) solubilne POX pasulja i (d) POX jonski vezane za ćelijski zid pasulja. M- proteinski standardi sa poznatom molekulskom masom. Gelovi su obojeni sa 1 mM 3,3-diaminobenzidinom (DAB). Strelice ukazuju na različite POX izoforme sa približnim molekulskim masama: SC- solubilna frakcija POX kukuruza (SC1-78 kDa, SC2-55 kDa, SC3-50 kDa, SC4-45 kDa i SC5-38 kDa) i IC- frakcije jonski vezane za ćelijski zid kukuruza (IC1-78 kDa, IC2-50 kDa, IC3-45 kDa , IC4-38 kDa i IC5-35 kDa); SB- solubilna frakcija POX pasulja (SB1-78 kDa,

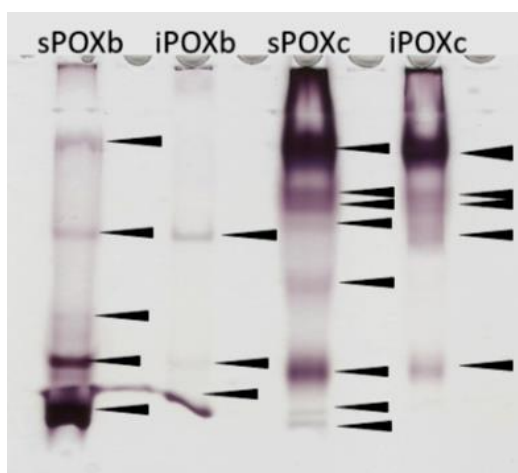
SB2-50 kDa, SB3-45 kDa, SB4-38 kDa, SB5-36 kDa i SB6-35 kDa) i IB- frakcije jonski vezane za ćelijski zid pasulja (IB1-57 kDa, IB2-45 kDa, IB3-38 kDa, IB4-36 kDa i IB5-35 kDa).

Solubilne (sPOXb) i jonske (iPOXb) frakcije pasulja su imale izoformu od oko 36 kDa. Izoforma od ~ 55 kDa je pronađena u solubilnoj frakciji kukuruza (sPOXc), a izoforma od ~ 57 kDa u jonskoj frakciji pasulja (iPOXb). Razlike u molekularnoj masi POX-a mogu biti zbog razlika u aminokiselinskoj sekvenci ili stepenu glikolize što je prethodno diskutovano (Welinder, 1992; Mika i sar., 2008). Peroksidaza kukuruza, jonski vezana za ćelijski zid, sa molekularnom masom od 45 kDa (monomer) ranije je okarakterisana (Hadži-Tašković Šukalović i sar., 2015), dok je solubilna POX pasulja sa istom molekularnom masom takođe ranije okarakterisana (Köktepe i sar., 2017), što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Takođe, proteomiks rezultati (Tabele 2, 3, 4) potvrdili su prisustvo solubilnih POX kukuruza sa molekularnom masom od 38 kDa i sa vrijednostima pI od 6,05, 6,96, 7,14 i 7,9. Proteomiks analiza je takođe potvrdila prisustvo sPOX izoformi pasulja sa molekularnom masom od 35 kDa (sa pI vrijednostima 5,08 i 6,84), 36 kDa (sa pI vrijednostima 8,43 i 8,75) i 38 kDa (sa pI vrijednosti 7,87).

Modifikovana SDS-PAGE sa niskom koncentracijom SDS-a specifično je bojena sa još jednim supstratom peroksidaza (sa 0,01% 4-hloro- α -naftolom) i razdvojene izoforme POX su prikazane na Slici 12. Sličan izoenzimski profil je detektovan i kad je gel bojen sa 4-hloro- α -naftolom (crnim strelicama na Slici 12 su označene POX detektovane i nakon bojenja sa DAB-om) u odnosu na bojenje sa DAB-om (Slika 11). Dvije nove POX izoforme su vidljive u solubilnoj frakciji kukuruza sa molekularnom masom od 30 kDa i jedna POX izoforma jonski vezana za ćelijski zid pasulja sa molekularnom masom od 45 kDa (Slika 12). Ovo se može protumačiti različitom specifičnošću POX izoformi za različite supstrate.



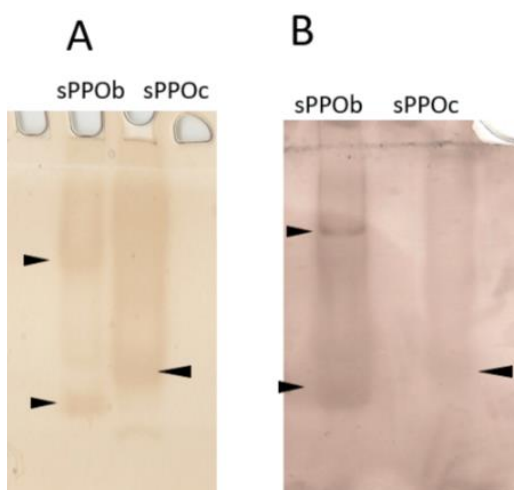
Slika 12. Razdvajanje POX izoformi modifikovanom SDS-PAGE: (a) solubilnih POX kukuruza (b) POX jonski vezane za ćelijski zid kukuruza; (c) solubilnih POX pasulja i (d) POX jonski vezane za ćelijski zid pasulja. M- proteinski standardi sa poznatom molekulskom masom. Gel je obojen sa 0,01% 4-hloro- α -naftol. Crne strelice ukazuju na izoforme POX, detektovane sa DAB-om, dok crvene strelice označavaju izoforme POX koje nisu bile vidljive sa DAB.



Slika 13. Gel za nativnu elektroforezu sa razdvojenim POX izoformama u solubilnim i jonskim frakcijama korijena kukuruza i pasulja: 1) solubilne POX pasulja -sPOXb; 2) jonske POX pasulja - iPOXb; solubilne POX kukuruza - sPOXc i jonske POX kukuruza –

iPOXc. Izoforme su specifično bojene sa α -hloro naftolom. Strelice ukazuju na različite izoforme peroksidaza.

Nativnom elektroforezom detektovano je pet peroksidaznih izoformi u solubilnoj proteinskoj frakciji korijena pasulja (sPOXb) i 3 peroksidne izoforme u jonski vezanoj frakciji za ćelijski zid pasulja (iPOXb). U solubilnoj proteinskoj frakciji korijena kukuruza (sPOXc) 8 POX izoformi je detektovano, a u frakciji vezanoj za ćelijski zid (iPOXc) četiri POX izofome (Slika 13).



Slika 14. Gel za nativnu elektroforezu sa razdvojenim tirozinaznim izoformama u solubilnim i jonskim frakcijama korijena kukuruza i pasulja: solubilne tirozinaze pasulja (sPPOb), solubilne tirozinaze kukuruza (sPPOc). Izoforme su detektovane nakon specifičnih bojenja za tirozinaze sa pirogalolom (A) i L-DOPA (B). Strelice ukazuju na različite izoforme polifenoloksidaza.

Nativnom elektroforezom detektovane su dvije tirozinazne izoforme u solubilnoj proteinskoj frakciji korijena pasulja (sPPOb) i jedna izoforma u solubilnoj proteinskoj frakciji korijena kukuruza (sPPOc) kada su gelovi bojani i sa pirogalolom i sa L-DOPA-a (Slika 14). Veća PPO aktivnost je vidljiva u proteinskoj solubilnoj frakciji kukuruza nego u frakciji korijena pasulja. Uzimajući u obzir rezultate dobijene proteomiks analizom, koji govore o odusustvu PPO u solubilnoj proteinskoj frakciji korijena pasulja važno je spomenuti da aktivnost u prisustvu pirogalola i L-DOPA može biti i peroksidazna aktivnost, ne nužno tirozinazna.

5.1.4. Kinetičke studije i supstratna specifičnost

5.1.4.1. Kinetičke studije i supstratna specifičnost peroksidaza

K_m vrijednosti za različite POX frakcije za pirogalol kao supstrat su određene u prisustvu 3,3 mM H_2O_2 , dok su K_m vrijednosti za H_2O_2 kao supstrat određene u prisustvu 3,3 mM pirogalola kao supstrata (Tabela 5).

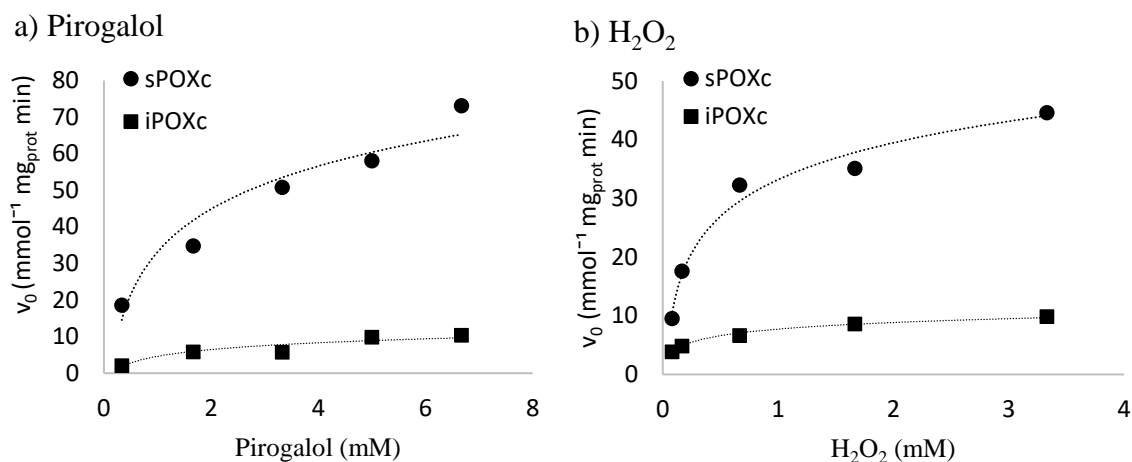
Tabela 5. Vrijednosti K_m za solubilne peroksidaze pasulja (sPOXb), solubilne peroksidaze kukuruza (sPOXc), jonski vezane peroksidaze čelijskog zida pasulja (iPOXb) i jonski vezane peroksidaze čelijskog zida kukuruza (iPOXc) za pirogalol u prisustvu 3,3 mM H_2O_2 . K_m vrijednosti za H_2O_2 su dobijene sa 3,3 mM pirogalolom kao supstratom. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost od najmanje tri mjerenja i standardnu devijaciju.

K_m (mM)				
<i>Solubilne i jonski vezane peroksidaze</i>				
Supstrat	sPOXb	sPOXc	iPOXb	iPOXc
H_2O_2	$0,339 \pm 0,009a$	$0,319 \pm 0,02a$	$0,111 \pm 0,008b$	$0,110 \pm 0,03b$
Pirogalol	$4,371 \pm 0,11c$	$0,833 \pm 0,02d$	$4,076 \pm 0,12c$	$1,319 \pm 0,110e$

a, b, c, d, e: Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$, t-test). Izvršeno je poređenje između istih supstrata i različitih POX-a i između različitih supstrata za istu POX.

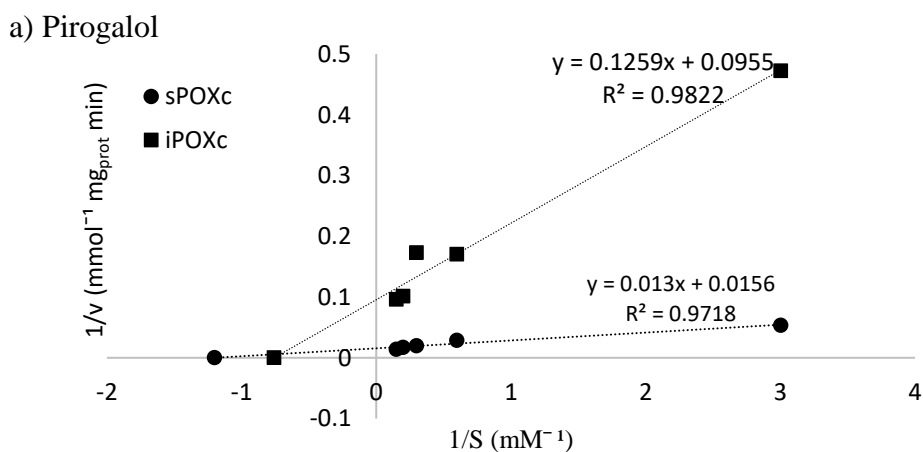
Za pirogalol su vrijednosti K_m bile u milimolarnom opsegu za sve POX osim za solubilne POX izolovane iz kukuruza (sPOXc) (Tabela 5). Prema vrijednostima K_m , sve POX su pokazale niži afinitet za pirogalol nego za H_2O_2 , naročito POX izolovane iz pasulja (Slike 15-18). Jonske peroksidaze iz kukuruza imale su 1,5 puta manji afiniteta za pirogalol u odnosu na sPOX. Solubilne peroksidaze pasulja (sPOXb) i jonske peroksidaze pasulja

(iPOXb) su imale oko 4 puta niži afinitet za pirogalol od istih frakcija izolovanih iz kukuruza.

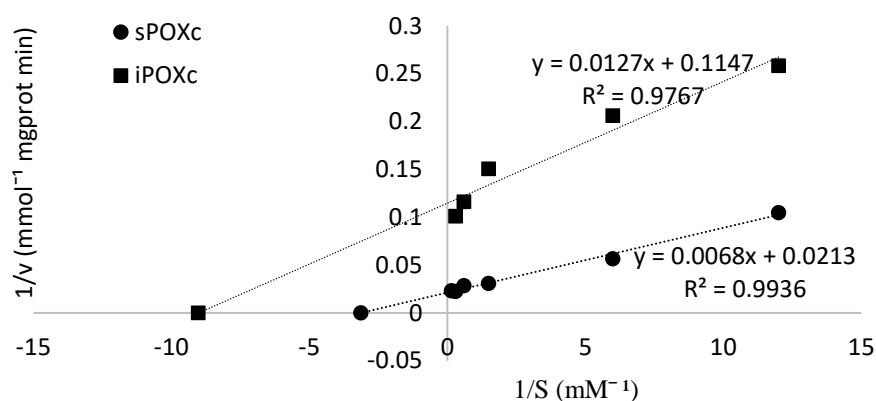


Slika 15. Michaelis-Menten kriva zavisnosti aktivnosti peroksidaza od koncentracije supstrata (pirogalol (a) i H_2O_2 (b)) za solubilne peroksidaze korijena kukuruza (sPOXc) i jonske POX korijena kukuruza (iPOXc).

Kada je H_2O_2 korišten kao supstrat, vrijednosti K_m se nisu razlikovale između solubilnih i POX, za obe biljke. Jonske peroksidaze izolovane iz pasulja i kukuruza, imale su 3-puta veći afinitet u poređenju sa solubilnim POX pasulja i kukuruza za H_2O_2 kao supstrat. Generalno, POX izolovane iz pasulja odlikuje niži afinitet (veći K_m) za oba supstrata nego POX izolovane iz kukuruza, u datim uslovima (Tabela 5, Slike 15-18).



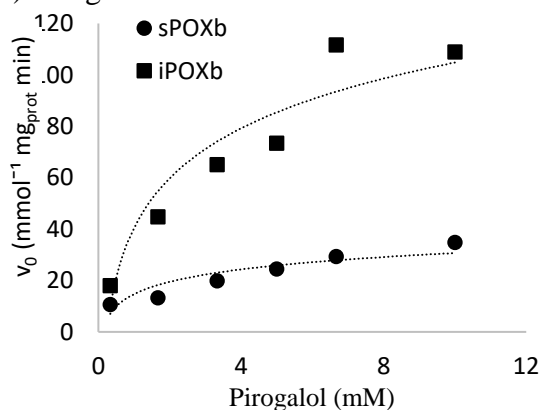
b) H₂O₂



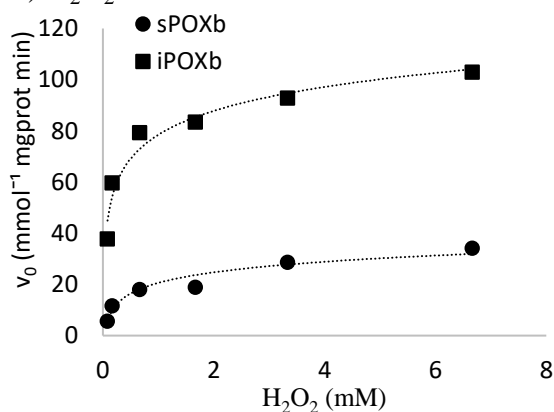
Slika 16. Lineweaver-Burk-ova linearizacija Michaelis-Menten krive za solubilne POX kukuruza (sPOXc) i za jonske POX kukuruza (iPOXc) sa pirogalolom (a) i sa vodik peroksidom (b) kao supstratom.

Uticaj različitih koncentracija pirogolola kao supstrata određen je mjerenjem aktivnosti peroksidaza (Tabela 5, Slike 15a, 16a, 17a, 18a). Aktivnost peroksidaza se povećala s povećanjem koncentracije supstrata i pratila je tipičnu Michaelis-Menten-ovu kinetiku sa vrijednostima K_m sličnim za solubilne i jonske POX pasulja. Sličan afinitet za H₂O₂ jonskih POX kukuruza sa K_m vrijednošću od 0,182 mM pokazan je u prethodnim istraživanjima (Hadži-Tašković Šukalović i sar., 2015).

a) Pirogalol

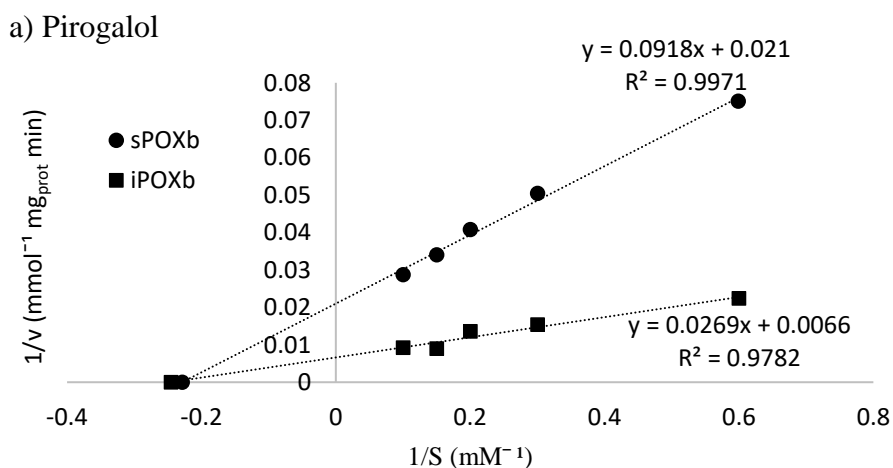


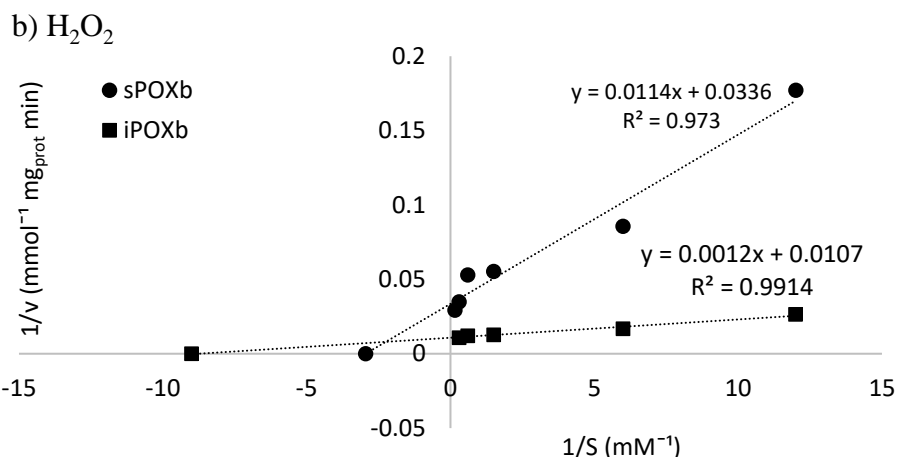
b) H₂O₂



Slika 17. Michaelis-Menten kriva zavisnosti aktivnosti peroksidaza od koncentracije supstrata (pirogalol (a) i H_2O_2 (b)) za solubilne peroksidaze korijena pasulja (sPOXb) i jonske POX korijena pasulja (iPOXb).

Generalno, veći afinitet svih POX je primjećen kada je H_2O_2 korišten kao supstrat (Slike 15-18, Tabela 5). Čak i kad je ista biljka u pitanju, razlike u K_m vrijednostima su pronađene između solubilnih i jonski vezanih POX (Hamed i sar., 1998). Michaelis-Menten konstanta (K_m) je specifična za određeni kompleks izoenzim-supstrat. K_m je numerička vrijednost koja omogućava upoređivanje različitih izoenzima, pri čemu različite vrijednosti K_m mogu takođe ukazati na lokaciju izoenzima u samoj biljci, pošto se zna da K_m određuje koncentraciju supstrata u ćeliji. Poznato je da niske vrijednosti K_m za supstrat ukazuju na visok afinitet za aktivno mjesto enzima, odnosno niži K_m ukazuje na veću specifičnost. Prema tome, varijacija u K_m vrijednosti peroksidaza za isti supstrat može zavisiti i od malih varijacija u terciarnoj strukturi aktivnog mjesta enzima. Na osnovu K_m dobijenih za različite izoenzime POX, može se zaključiti da specifičnost POX izolovanih iz različitih biljnih vrsta za isti supstrat varira (Veljović Jovanović i sar., 2018).





Slika 18. Lineweaver-Burk-ova linearizacija Michaelis-Menten krive za solubilne POX pasulja (sPOXb) i za jonske POX pasulja (iPOXb) sa pirogalolom (a) i vodik peroksidom (b) kao supstratima

Takođe, prema razlikama u kinetičkim parametarima između solubilnih i jonskih POX, može se pretpostaviti da vezivanje peroksidaza za ćelijski zid rezultira u konformacionim promjenama koje utiču na njegov afinitet za supstrate (Hadži-Tašković Šukalović i sar., 2015). Zbog toga je asocijacija sa ćelijskim zidom značajno povećala afinitet enzima za H₂O₂, što ukazuje na povećanu dostupnost ovog supstrata za POX, kao što je ranije rečeno (Hadži-Tašković Šukalović i sar., 2015). Veća aktivnost peroksidaza u jonskoj frakciji POX pasulja u poređenju sa solubilnim frakcijama izolovanih iz pasulja, takođe ukazuje na povećanu dostupnost fenolnih supstrata. Ranije se pokazalo da su različita fenolna jedinjenja supstrati za peroksidaze jonski vezane za ćelijske zid, kao i za apoplastne peroksidaze (Šukalović i sar., 2003; Takahama, 2004; Šukalović i sar., 2005; Dragišić Maksimović i sar., 2008). Monolignoli, estri ferulične i *p*-kumarične kiseline su supstrati za peroksidaze i odgovorni su za proces lignifikacije i umrežavanja polimernih komponenti ćelijskog zida u travama (Ralph i sar., 2004).

Specifičnost solubilnih i jonskih peroksidaza izolovanih iz kukuruza i pasulja za različite supstrate predstavljena je u Tabeli 6. Veće aktivnosti su detektovane za jonske POX pasulja u odnosu na solubilne POX, dok je suprotan trend pokazan za POX kukuruza, nezavisno od korištenog supstrata (Tabela 6). Najveća aktivnost solubilnih i jonskih peroksidaza pasulja, kao i jonskih peroksidaza kukuruza dobijena je u prisustvu kafeične kiseline kao supstrata, dok je za solubilnu frakciju kukuruza (sPOXc) pirogalol bio najbolji supstrat. Najmanja aktivnost za solubilne peroksidaze pasulja i kukuruza izmjerena je u

prisustvu *p*-kumarične kiseline kao supstrata. Za jonske peroksidaze pasulja najmanja aktivnost izmjerena je sa hlorogenom kiselinom kao supstratom, dok je za jonske peroksidaze kukuruza izmjerena sa *p*-kumaričnom kiselinom kao supstratom.

Tabela 6. POX aktivnosti solubilnih peroksidaza pasulja (sPOXb) i kukuruza (sPOXc), jonski vezanih peroksidaza pasulja (iPOXb) i kukuruza (iPOXc) za različite supstrate. Aktivnosti peroksidaza određene su mjerenjem promjene apsorbance na 430 nm za 6,67 mM pirogalola (PG), 286 nm za 0,04 mM *p*-kumaričnu kiselinu (*p*-CA), 410 nm za 4 mM hlorogenu (CGA) i kafeičnu (CA) kiselinu.

Supstrat	POX aktivnost ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteina min}^{-1}$)			
	sPOXb	sPOXc	iPOXb	iPOXc
Pirogalol	34,84 ± 8,17	73,19 ± 5,70	108,99 ± 0,75	10,41 ± 1,55
<i>p</i> -CA	10,72 ± 0,38	6,41 ± 1,65	116,94 ± 30,70	2,14 ± 0,53
CGA	15,06±1,18	12,10±0,96	77,94±9,66	4,62±0,32
CA	67,50±5,33	56,79±8,99	240,88±49,69	19,11±1,44

Peroksidaze sadrže promjenljive domene i različita im je dostupnost aktivnom mjestu, što može objasniti veliku supstratnu raznolikost (Cosio i Dunand, 2008). Supstrati za peroksidaze su fenoli, amini, indoli, alkaloidi i sulfonati (Veitch, 2004; Ferreres i sar., 2011; Veljović Jovanović i sar., 2018). Najčešći supstrati su fenoli i njihovi glikozidi: hidroksicinamične kiseline (npr. ferulična, hlorogena, *p*-kumarična), hidroksibenzojeve kiseline, hidroksil alkoholi (npr. koniferil, sinapil), različiti flavonoidi (npr. antocijanini, flavonoli), kumarini i tako dalje (Veljović Jovanović i sar., 2018). Poznato je da se endogeni supstrati peroksidaza uglavnom akumuliraju u vakuolama i apoplastu (Veljović Jovanović i sar., 2018). Nakon biosinteze, fenolna jedinjenja konjugovana sa GSH (pomoću glutation-S-transferaze: GST) ili esterifikovana sa malonom ili glikozilovana

(Zhao, 2015) transportuju se do vakuole i apoplasta. U zavisnosti od tipa konjugacije, flavonoidi i antocijanini se prenose u vakuolu kroz specifične transportere na tonoplastu (Zhao, 2015; Veljović Jovanović i sar., 2018). Međutim, sublokalizacija endogenih supstrata za peroksidaze je specifična. Stoga, kampferol, kvercetin i indol alkaloidi su pronađeni u vakuoli (Marinova i sar., 2007; Veljović Jovanović i sar., 2018), dok su ferulična kiselina i koniferil aldehid vezani za apoplastne dijelove ćelijskog zida (Barcelo i sar., 2007).

Iako su fenoli uključeni u brojne procese kod biljaka, od rasta i razvoja do interakcije biljaka sa okolinom, aktivnost peroksidaza često se određuje pomoću vještačkog donora elektrona, kao što je gvajakol, koji daje obojene proizvode nakon oksidacije sa H_2O_2 . Naravno, s obzirom da je proteinski ekstrakt mješavina izoenzima, ova procjena može biti uzeta samo kao relativna promjena u ukupnoj aktivnosti POX pod određenim uslovima. Stoga, aktivnost izoformi sa specifičnim afinitetom za različite supstrate može biti maskirana prosječnom ukupnom aktivnošću peroksidaza (Kukavica i sar., 2012).

Peroksidaze Klase III takođe mogu oksidovati fenolne glikozide i aglikone (Yamasaki i sar., 1997). Pored toga, neke specifične izoforme peroksidaza imaju IAA (indol 3-sirćetnu kiselinu) oksidaznu aktivnost ali još uvijek nije jasno utvrđeno da li takva aktivnost može biti isključivo pripisana peroksidazama (Veljović Jovanović i sar., 2018).

Konačni proizvodi oksidacije u peroksidaznoj reakciji sa istim fenolnim jedinjenjem zavise od lokalizacije izoformi. Peroksidaze koje su vezane za ćelijski zid učestvuju u lignifikaciji (Veljović Jovanović i sar., 2018), dok solubilne peroksidazne izoforme funkcionišu kao "čistači" H_2O_2 .

5.1.4.2. Kinetičke studije i supstratna specifičnost tirozinaza

PPO aktivnosti solubilnih proteinskih frakcija korijena pasulja, solubilnih frakcija kukuruza, te jonskih frakcija vezanih za ćelijski zid pasulja i kukuruza (iPOXc) za L-tirozinom i hlorogenenom kiselinom kao supstratima, nisu detektovane. Aktivnost u prisustvu L-DOPA, niža od $0,01 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteina min}^{-1}$, izmjerena je u solubilnim proteinskim frakcijama pasulja i kukuruza, dok u jonskim frakcijama aktivnost PPO nije detektovana (Tabela 7).

Tabela 7. Tirozinazna aktivnosti u solubilnim proteinskim frakcija korijena pasulja (sPPOb) i kukuruza (sPPOc), kao i u jonskim frakcijama pasulja (iPPOb) i kukuruza (iPPOc) za različite supstrate. Aktivnosti PPO određene su mjerenjem promjene apsorbance na 475 nm za 2,5 mM L-DOPA i 2,5 mM L-tirozin, 410 nm za 4 mM hlorogenu kiselinu (CGA) sa 5 ili 10 µl ekstrakta.

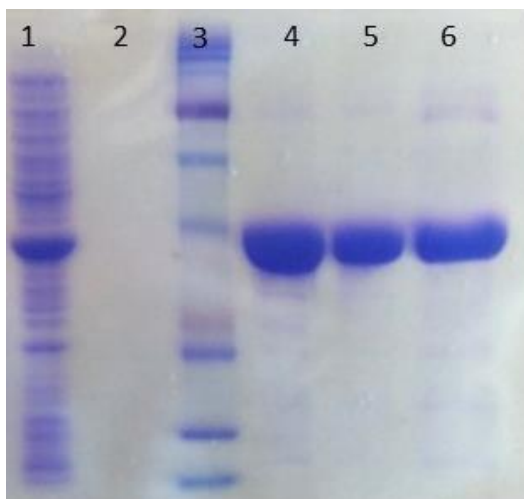
Supstrat	PPO aktivnost ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteina min^{-1})			
	sPPOb	sPPOc	iPPOb	iPPOc
L-DOPA	0,011±0,002	0,009±0,003	-	-
L-tirozin	-	-	-	-
CGA	-	-	-	-

Na katalitičku aktivnost enzima značajno utiče priroda bočnog lanca, broj hidroksilnih grupa i njihov položaj na benzenovom prstenu fenolnog supstrata (Macheix i sar., 1990; Jukanti, 2017). PPO iz nekih biljnih vrsta kao što je grožđe, jagoda i suncokretovo sjeme pokazali su samo difenolaznu aktivnost (Yoruk i Marshall, 2003; Jukanti, 2017), dok PPO jabuke nije imao monofenolaznu aktivnost (Jukanti, 2017) ili, kada je prisutan, aktivnost je bila veoma mala u odnosu na aktivnost difenolaze.

Na osnovu dobijenih rezultata za tirozinaze, mehanizmi umrežavanja model proteina su vršeni samo sa peroksidazama iz solubilnih i jonskih frakcija izolovanih iz korijena kukuruza i pasulja. Za umrežavanje model proteina sa tirozinazama, u daljem radu, korištena je tirozinaza bakterijskog porijekla (TyrBm).

5.1.5. Proizvodnja i prečišćavanje proteina TyrBm WT

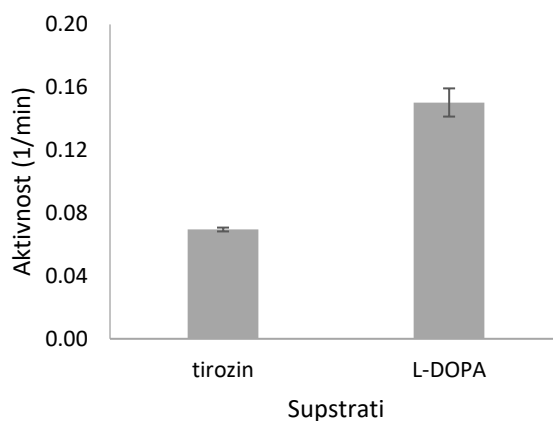
Rezultati prečišćavanja tirozinaza iz *E. coli* BL21 (DE3) pET9d/tyr (C3) su prikazani na Slici 19. Nakon razdvajanja na gelu za SDS elektroforezu u uzorcima prečišćenim na His-tag koloni (Slika 19, uzorci 4, 5, 6,) dobijena je jedna dominantna proteinska traka sa molekulskom masom od 35,28 kDa. U poređenju sa *crude* ekstraktom (ukupni ćelijski ekstrakt, uzorak 1) uzorak tirozinaza je značajno prečišćen.



Slika 19. SDS-PAGE prečišćavanja TyrBm. 1 - Ekstrakt ćelije (*crude* ekstrakt). 3 -Marker poznatih molekulskih masa. Trake 4, 5, 6 - frakcije prečišćene TyrBm nakon elucije (25 μ g proteina).

5.1.5.1. Određivanje TyrBm aktivnost

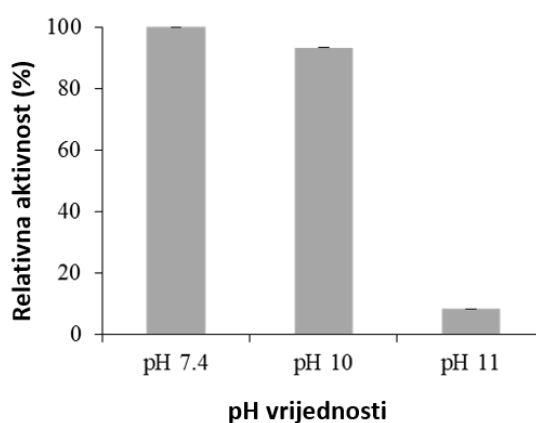
TyrBm monofenolaza i difenolazna aktivnost su izmjerene pomoću L-tirozina i L-DOPA kao supstrata, kako je prethodno opisano u radu Shuster i Fishman (Shuster i Fishman, 2009). TyrBm aktivnost sa L-tirozinom i L-DOPA bila je zadovoljavajuća, stoga je izolovani enzim nakon zamrzavanja u tečnom azotu čuvan na -80°C do analiza (Slika 20).



Slika 20. Aktivnost (A/min) TyrBm sa tirozinom i L-DOPA-om kao supstratima

TyrBm aktivnost na alkalnom pH

TyrBm monofenolazna aktivnost u puferским rastvorima pH 10 i 11 izračunata je kao relativna aktivnost u poređenju sa TyrBm aktivnošću u SPB na pH 7,4 (Slika 21). Rezultati pokazuju da se aktivnost enzima smanjuje sa povećanjem pH. pH 11 je dovela do dramatičnog smanjenja aktivnosti za 93%, ali je aktivnost enzima pri pH 10 smanjena za manje od 10%, što pokazuje veliki potencijal enzima u alkalnom medijumu. pH 10 je odabran za korištenje u budućim eksperimentima.



Slika 21. Aktivnost TyrBm na alkalnom pH (Tris-HCl pufer). Aktivnost na pH 7,4 je označena kao 100%.

5.2. Enzimatski katalizovano umrežavanje model proteina

5.2.1. Prečišćavanje i karakterizacija proteina krompira

Za enzimski katalizovano umrežavanje proteina kao model proteini, izabrani su proteini krompira. Nakon prečišćavanja, u izolovanim proteinima krompira tri glavne frakcije su se jasno razlikovale: patatin, inhibitori proteaze i proteini visoke molekulske mase (Slika 22). Identitet proteina potvrđen je poređenjem sa dva komercijalna standarda i proteomiks analizom.

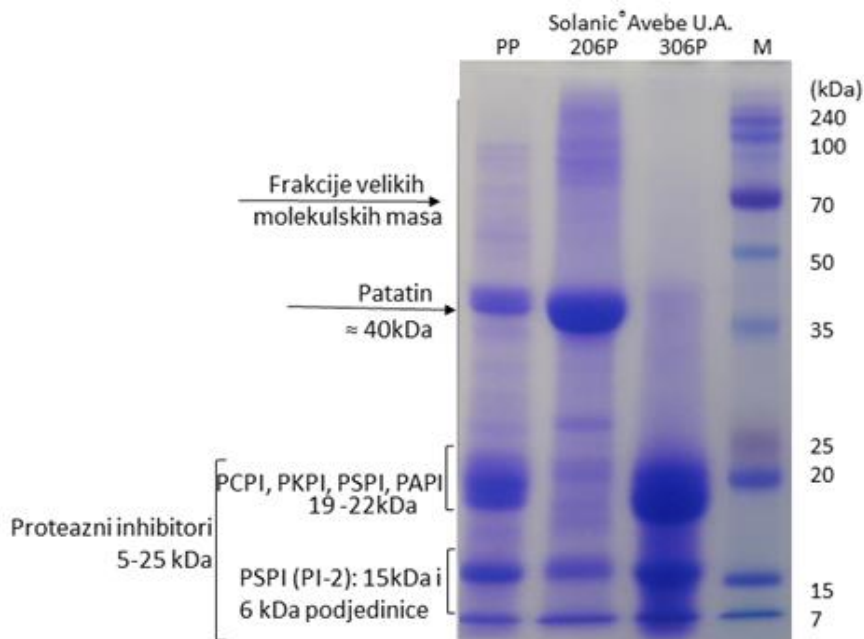
Poznato je da proteini krompira imaju tri glavne klase: patatin (do 40%), inhibitori proteaza (do 50%) i druge (uglavnom proteine sa visokom molekulskom masom) (Pouvreau i sar., 2001; Løkra i sar., 2008). Patatin, globularni glikoprotein sa izoelektričnom tačkom između 4,5 i 5,2 je dimer koji se pojavljuje kao monomer (40-45 kDa) u prisustvu natrijum dodecil sulfata (Racusen i Weller, 1984).

Inhibitori proteaza su najzastupljenija, heterogena grupa od sedam različitih klasa proteina s molekulskim masama koje variraju između 5-25 kDa (Pots i sar., 1999). Najzastupljenija grupa su inhibitori serin proteaze (PI-1 i PI-2 iz porodice Kunitz) (Pouvreau i sar., 2001; Pouvreau i sar., 2003). Inhibitor serine proteaze PI-2 je dimerni protein sa jednim disulfidnim mostom i molekulskom masom od 22 kDa, sa dvije subjedinice (16,5 kDa i 4,5 kDa) (Valueva i sar., 1998). Na SDS-PAGE gelu (Slika 22) veća subjedinica PI-2 se vidi i ima molekulsku masu od ~ 15 kDa. Inhibitor serine proteaze PI-1 je pentamerni protein sastavljen od pet subjedinica sa molekulskom masom od 7-8 kDa (Pouvreau i sar., 2001).

Druge zastupljene grupe su inhibitori cistein proteaze (PCPI), inhibitori aspartat proteaze krompira (PAPI) i drugi inhibitori proteaza tipa Kunitz (PKPI), od kojih su svi monomerni proteini (20-21 kDa) (Slika 22) (Pouvreau i sar., 2001).

PCPI se smatra proteinom beta-II prema strukturnim osobinama koje su slične kao kod inhibitora serin proteaze i sojinih inhibitora tripsina Kunitz tipa (Pouvreau i sar., 2005). Inhibitori proteina krompira variraju u svojim inhibitornim efektima među grupama, ali uglavnom inhibiraju tripsin, himotripsin i elastazu leukocita čovjeka (Pouvreau i sar., 2001). Razlike u molekulskoj masi mogu biti zbog različite sorte, stanja skladištenja i razvojne faze (Løkra i sar., 2008; Løkra i sar., 2009). Imaju antikancerogeno dejstvo

(Kennedy, 1998) i pozitivne dijetetske kvalitete i njihovo dejstvo utiče na oslobađanje holecistokinina (Komarnytsky i sar., 2011).



Slika 22. SDS-PAGE vizuelizacija prečišćene frakcije proteina krompira (PP), Solanic®Avebe frakcije velikih molekulskih masa (206P) i frakcije malih molekulskih masa (306P). M-označava marker sa poznatim molekulskim masama.

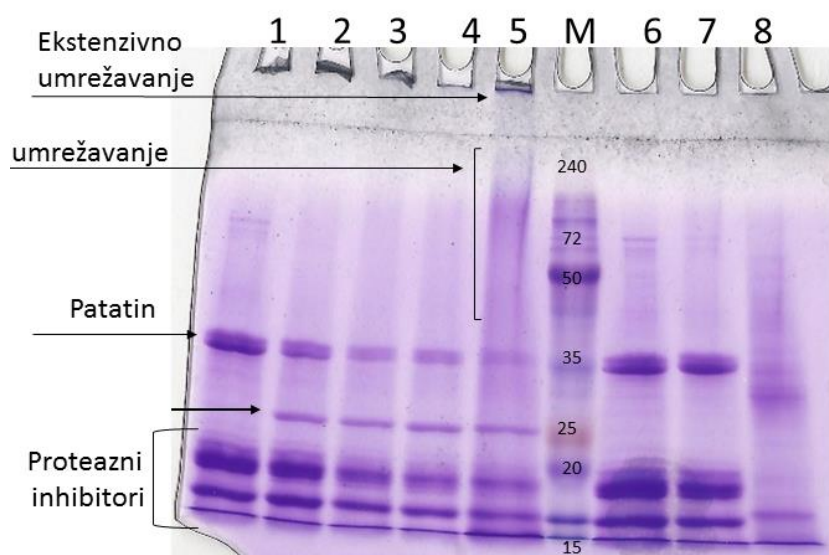
Prema dobijenim rezultatima, koncentracija proteina u izolovanom proteinu krompira je iznosila 62,6% proteina. Sadržaj vlage u proteinu krompira iznosio je $11,35\% \pm 1,31$, dok je sadržaj polifenola iznosio 1055 ± 78 mg GAE/L (2,11%). Prema prethodnim istraživanjima očekivani sadržaji lipida, ugljenih hidrata i pepela su bile u očekivanom opsegu: 3-13,6% (lipidi), 0,6-6% (ugljeni hidrati) i 1,2-6% (pepeo) (Vikelouda i Kiosseoglou, 2004; Løkra i sar., 2009).

Prema našim rezultatima, ekstrakcija proteina krompira sa amonijum sulfatom kao sredstvom za taloženje rezultirala je visokim prinosom proteina koje je karakterisala dobra rastvorljivost, ali niži faktor prečišćenosti, što je u skladu sa prethodnim literaturnim podacima (Knorr i sar., 1977; van Koningsveld i sar., 2001; Bartova i Barta, 2009). Ranije su proučavane različite metode taloženja kao što su primjena toplote, kiselina, etanola, FeCl_3 i amonijum sulfata za izolaciju proteina krompira (Knorr i sar., 1977; van Koningsveld i sar., 2001; Bartova i Barta, 2009). Poznato je da proteini krompira imaju nisku rastvorljivost koja može biti glavno ograničenje u njihovom prečišćavanju i daljoj

primjeni (van Koningsveld i sar., 2001; van Koningsveld i sar., 2006). U radu Ralet i Guéguen kada je korištena jednostavna metoda ekstrakcije uz pomoć vode, faktor prečišćavanja bio je nizak (46% proteina) i rastvorljivost je bila niska (Ralet i Guéguen, 2000), dok su Baier i Knorr ultrafiltracijom dobili znatno veći faktor prečišćenosti od 61% (Baier i Knorr, 2015). Koncentracija proteina krompira komercijalnih uzoraka 206P i 306P, koji su korišteni kao standardi za poređenje, iznosila je 83,8% i 88,1%. Ovi izolati su dobijeni *expanded bed adsorption (EBA)* hromatografijom, koja je među najefikasnijim metodama ekstrakcije proteina krompira sa očekivanim čistoćama između 72-96% (Løkra i sar., 2008; Løkra i sar., 2009). Međutim, ova metoda se koristi na industrijskom nivou i veoma je skupa.

5.2.2. Peroksidazama Klase III katalizovano umrežavanje proteina krompira

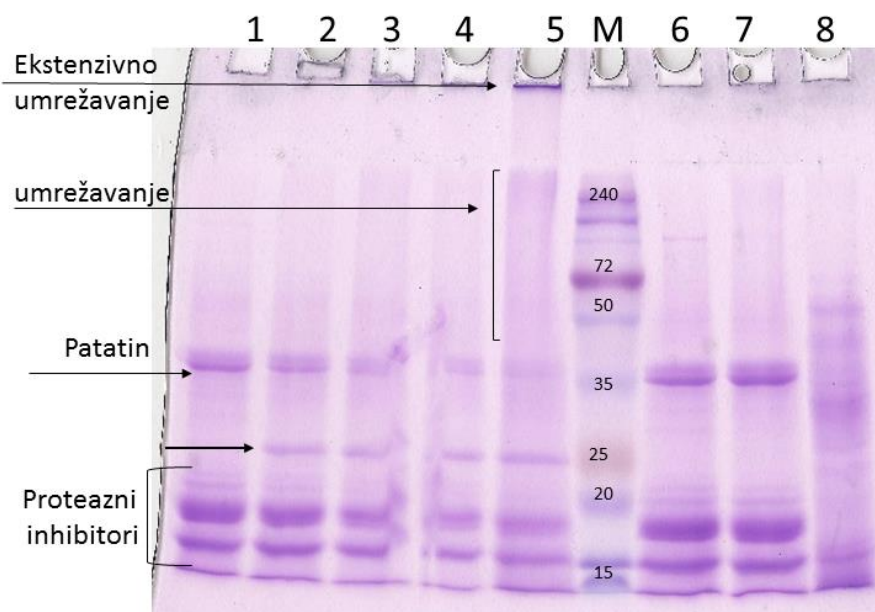
Ispitivana je sposobnost solubilnih POX iz korijena kukuruza i pasulja da umreže proteine krompira. Rastvor sa proteinima krompira sa i bez dodatka *crude* solubilnog ekstrakta pasulja i kukuruza su inkubirani 5 h (i 12 h), sa i bez dodatka H₂O₂ i rezultati su prikazani na Slikama 23-25.



Slika 23. SDS-PAGE POX-katalizovanog umrežavanja proteina krompira sa sPOXb iz pasulja sa dodatkom H₂O₂. M- Markeri poznatih molekularskih masa. 1-5: proteini krompira sa sPOXb nakon 0, 60, 180, 300 minuta i 12h inkubacije. 6-7: proteini krompira sa

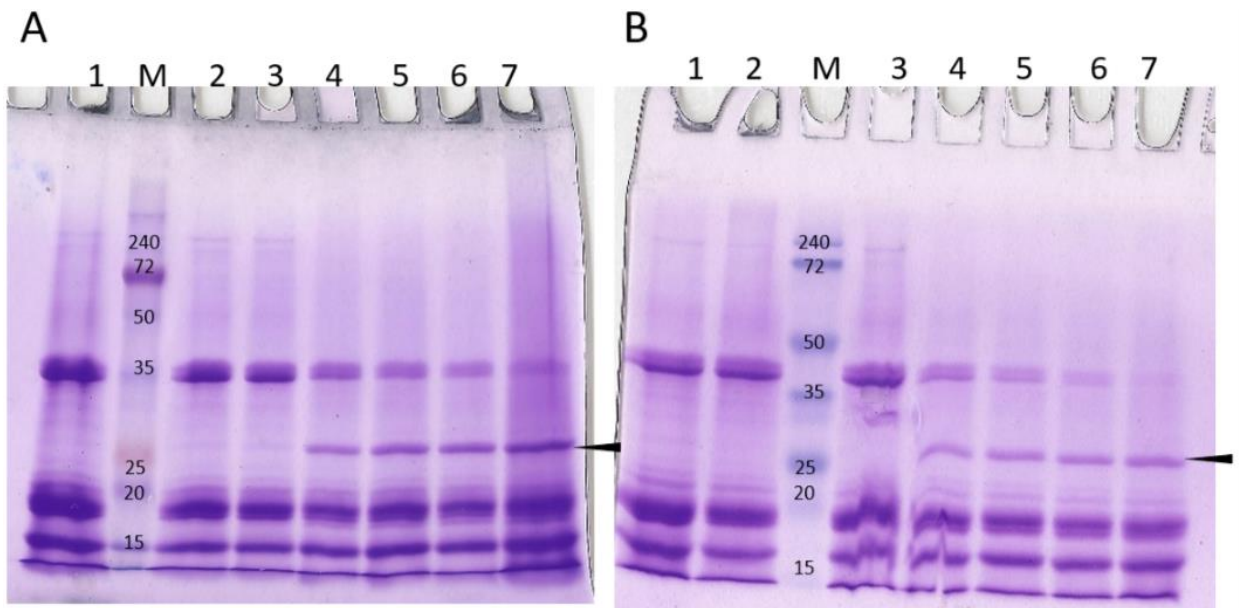
dotatkom H₂O₂ u odsustvu sPOXb nakon 0 i 300 minuta inkubacije. 8: ekstrakt sPOXb iz pasulja.

Analiza SDS-PAGE pokazala je formiranje fragmenata visoke molekulske mase nakon 60 minuta od dodavanja sPOX kukuruza i pasulja i H₂O₂, što je praćeno istovremenim opadanjem intenziteta proteinskih monomernih traka, naročito patatina (Slika 23, 24).



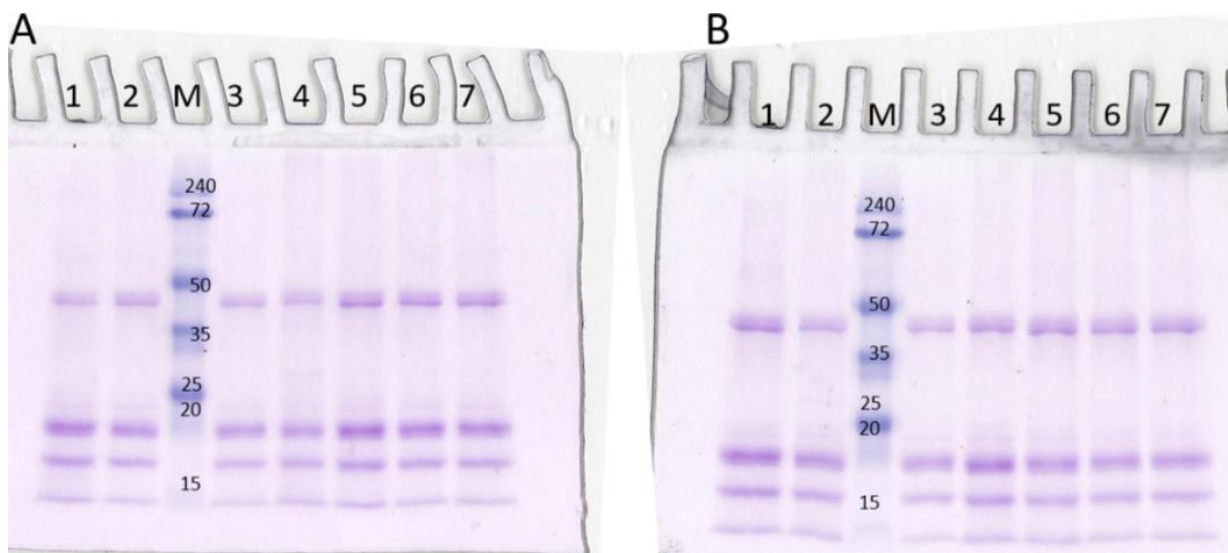
Slika 24. SDS-PAGE POX-katalizovanog umrežavanja proteina krompira sa sPOXc iz kukuruza sa dodatkom H₂O₂. M- Markeri poznatih molekulske mase. 1-5: proteini krompira sa sPOXc nakon 0, 60, 180, 300 minuta i 12h inkubacije. 6-7: proteini krompira sa dodatkom H₂O₂ u odsustvu sPOXc nakon 0 i 300 minuta inkubacije. 8: ekstrakt sPOXc iz kukuruza.

Patatin, globularni protein krompira, umrežen je sa POX iz kukuruza i pasulja sa dodatkom H₂O₂ (Slika 24), ali i bez dodatka (Slika 25). Razlog za ovo može biti prisustvo drugih enzima u *crude* ekstraktu. Formiranje novog proteinskog monomera sa oko 25 kDa je primjećeno nakon 1 h inkubacije sa POX iz kukuruza i pasulja sa dodatkom H₂O₂ (Slika 24), ali i bez dodatka (Slika 25).

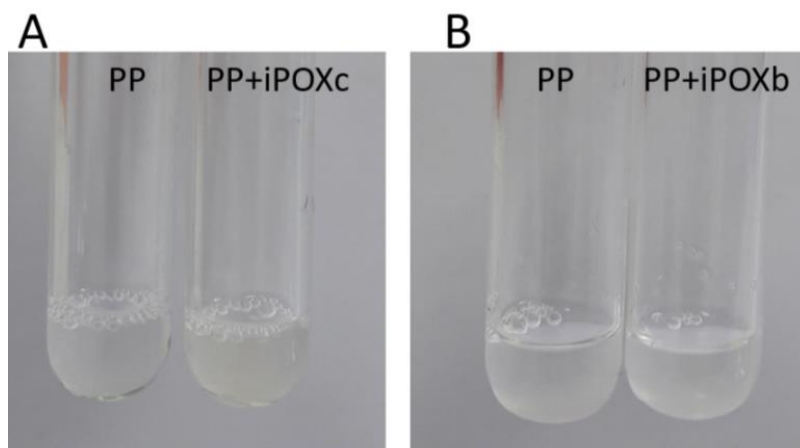


Slika 25. SDS-PAGE POX-katalizovanog umrežavanja proteina krompira proteina sa sPOXb iz pasulja (A) i sPOXc iz kukuruza (B) bez dodatka H_2O_2 . M- Markeri poznatih molekularskih masa. 1-2: proteini krompira bez dodatka peroksidaza nakon 0 i 300 minuta inkubacije; 3-7: proteini krompira sa sPOX nakon 0, 60, 180, 300 minuta i 12h inkubacije.

Slike 23 i 24 pokazale su umrežavanje proteina krompira katalizovano solubilnim peroksidazama iz kukuruza i pasulja sa dodatkom H_2O_2 , ali i bez dodavanja H_2O_2 (Slika 25). Pored toga, ispitivana je sposobnost jonskih POX pasulja i kukuruza u umrežavanju proteina krompira i rezultati su prikazani na Slici 26. Rezultati ukazuju na slabiju sposobnost umrežavanja jonskih POX u odnosu na solubilne POX. Ovo se može objasniti manjom količinom fenola prisutnih u ekstraktu iPOX što je u skladu sa dobijenim rezultatima za K_m i supstratnom specifičnošću (Tabele 5, 6). Nedostatak fenola se može potvrditi i odsustvom pigmentacije u rastvorima proteina krompira sa jonskim frakcijama peroksidaza, na kraju inkubacije, što se može vidjeti na Slici 27.



Slika 26. SDS-PAGE POX-katalizovanog umrežavanja proteina krompira sa jonskim iPOXb iz pasulja (A) i sPOXc iz kukuruza (B) sa dodatkom H₂O₂. M- Markeri poznatih molekulskih masa. 1-2: proteini krompira bez dodatka peroksidaza nakon 0 i 300 minuta inkubacije; 3-7: proteini krompira sa sPOX nakon 0, 60, 180, 300 minuta i 12h inkubacije.

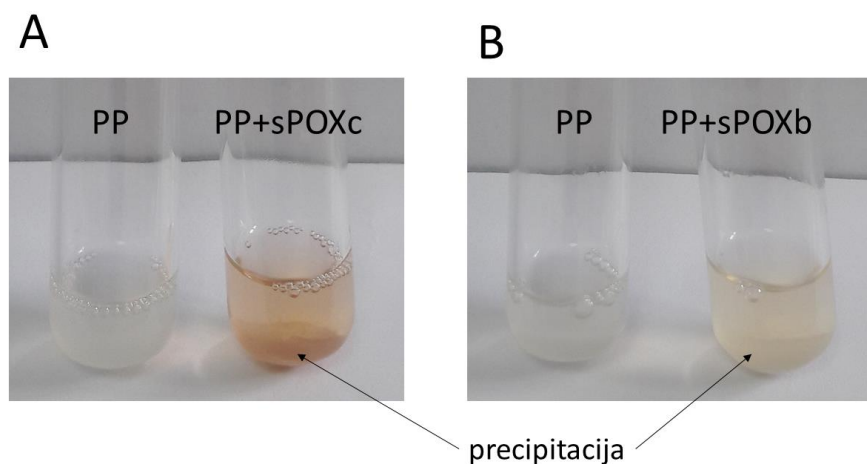


Slika 27. Rastvori proteina krompira (PP) bez i sa jonskim peroksidazama (iPOXc) kukuruza (A); rastvori proteina krompira (PP) bez i sa jonskim peroksidazama (iPOXb) pasulja (B). Uzorci rastvora su fotografisani nakon 300 minuta inkubacije na 37°C.

U prirodi, enzimi iz familije oksidoredukaza, kao što su lakaze, peroksidaze i tirozinaze, ne koriste se za umrežavanje proteina i iniciraju samo prvu hemijsku reakciju, te formiraju reaktivnu vrstu koja se spontano polimerizuje sa drugim funkcionalnim grupama, što

dovodi do kovalentnih umrežavanja (Isaschar-Ovdat i Fishman, 2018). Generalno, ovi enzimi su pokazali dobru sposobnost umrežavanja proteina sa niskim stepenom složenosti, kao što je kazein, ali proteini sa složenom strukturom ne podliježu umrežavanju i zahtijevaju dodavanje molekula male molekulske mase (fenola ili kafeične kiseline) kao medijatora (Isaschar-Ovdat i Fishman, 2018). Dobijeni rezultati pokazali su da je patatin krompira umrežen sa solubilnim peroksidazama iz kukuruza i pasulja i bez dodavanja i sa kontinuiranim dodavanjem H_2O_2 . Proteini krompira sa manjim molekulskim masama, kao što su inhibitori proteaza takođe su umreženi (Slike 23-25). Umrežavanje bez dodatka H_2O_2 može biti posljedica prisustva drugih enzima u sirovom ekstraktu solubilne frakcije pasulja i kukuruza. S druge strane, poznata je sposobnost peroksidaza da katalizuje nastanak H_2O_2 u prisustvu dovoljne količine reduktanata (Elstner i Heupel, 1976; Chen i Schopfer, 1999; Kukavica i sar., 2009) što može biti razlog za nastanak umrežavanja.

Postepeno dodavanje H_2O_2 može dodatno poboljšati efikasnost enzima u reakciji umrežavanja, usljed promjena u okolnim uslovima koji utiču na konformaciju proteina (Heijins i sar., 2010). Prema literaturnim podacima poznato je da neki proteini mogu do neke mjere polimerizovati u prisustvu samo H_2O_2 (Færgemand i sar., 1998), međutim, nije bila primjećena polimerizacija proteina krompira uz postepeno dodavanje H_2O_2 (Slike 23-25).

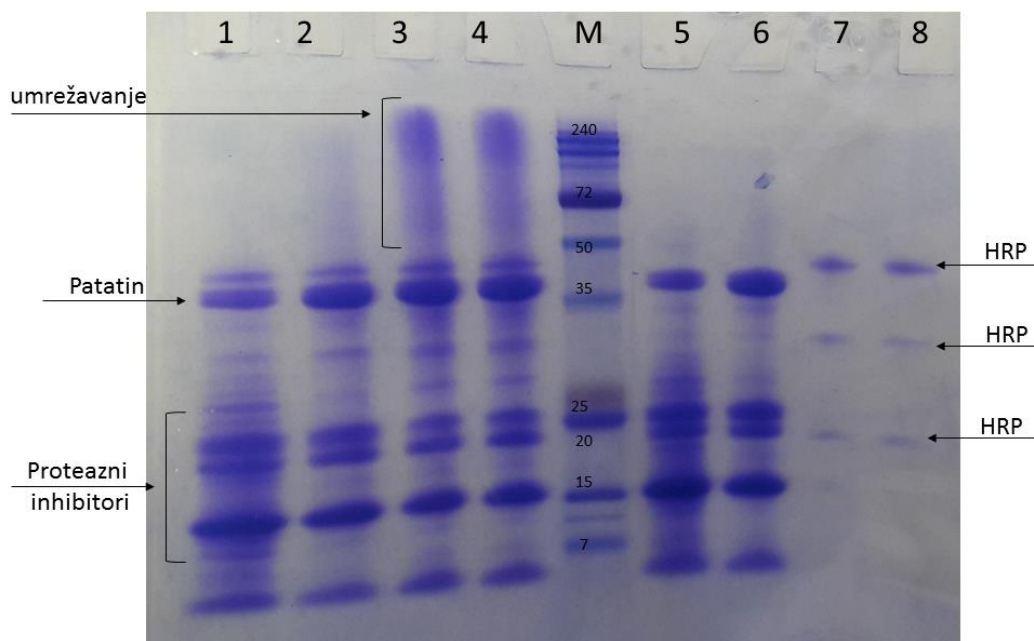


Slika 28. Rastvori proteina krompira (PP) bez i sa dodatkom solubilnih peroksidaza (sPOXc) kukuruza (A); rastvori proteina krompira (PP) bez i sa dodatkom solubilnih peroksidaza (sPOXb) pasulja. Uzorci rastvora su fotografisani nakon 300 minuta inkubacije na $37^{\circ}C$.

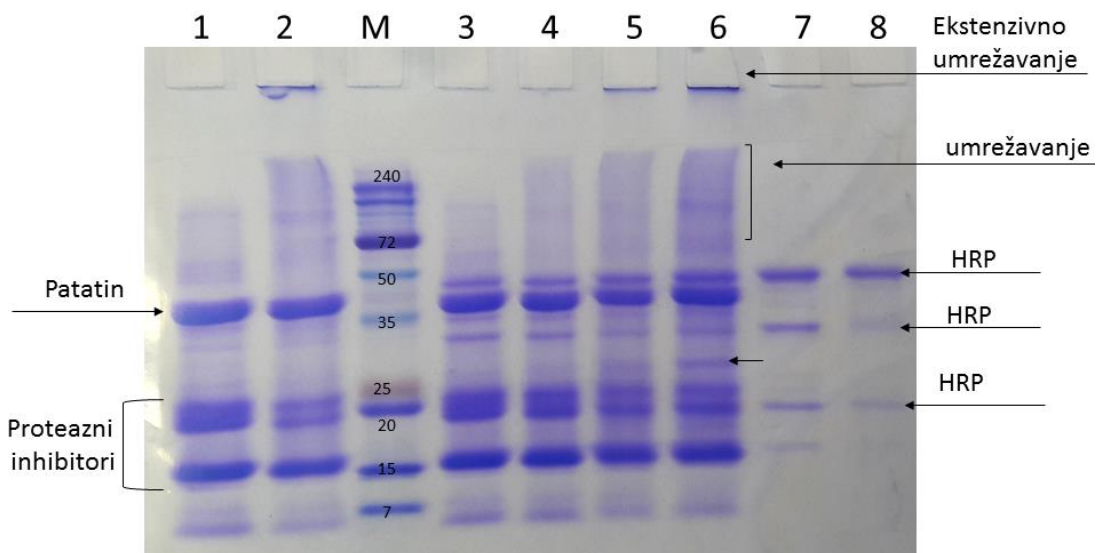
Kada je umrežavanje proteina krompira urađeno sa solubilnim peroksidazama, uočena je pigmentacija upravo u rastvoru sa umreženim proteinima, nakon čega je uslijedilo taloženje (precipitacija) umreženih produkata (Slika 28).

Uprkos činjenici da fenolni medijatori nisu dodati u reakcionu smjesu proteina krompira i solubilnih peroksidaza, zbog upotrebe *crude* ekstrakta iz korijena pasulja i kukuruza i mogućeg prisustva fenola, kao što je kafeična kiselina (Halliwell, 1978; Galeazzi i sar., 1990; Jiang i Miles, 1993; Šukalović i sar., 2003) moguć je dodatni uticaj na intenzivno umrežavanje proteina krompira. Među solubilnim i jonskim POX pasulja i kukuruza, najveća supstratna specifičnost je pronađena kada je kafeična kiselina upotrebljena kao supstrat u poređenju sa pirogalolom, *p*-kumaričnom kiselinom i CGA. To bi moglo objasniti reakciju umrežavanja bez prisustva H₂O₂, koji se može generisati kroz oksidativnu aktivnost peroksidaze u prisustvu fenolnih jedinjenja (Halliwell, 1978). Ranije studije su takođe pokazale je da POX poseduje kapacitet za proizvodnju H₂O₂ dok oksiduje različite vrste reduktanata, uključujući i fenole u prisustvu određenih količina jona metala (Halliwell, 1978; Jiang i Miles, 1993; Kukavica i sar., 2009; Hadži-Tašković Šukalović i sar., 2015). Drugi način na koji se može objasniti prisustvo H₂O₂ je usljed autooksidativne sposobnosti fenola u apoplastu, uključujući i ćelijski zid, gdje H₂O₂ može nastati redukcijom O₂ (Takahama, 2004; Kukavica i sar., 2009).

Da bi se uporedila sposobnost solubilnih POX frakcija iz korijena pasulja i kukuruza u umrežavanju proteina krompira, kao i uloga fenolnih medijatora, komercijalna peroksidaza iz rena (HRP) je korištena za umrežavanje proteina krompira sa dodatkom kafeične kiseline (Slika 30) i bez dodatka (Slika 29). Umrežavanje proteina krompira sa dodatkom HRP praćeno postepenim dodavanjem H₂O₂ (Slika 29) bilo je vidljivo nakon 3h inkubacije; međutim, patatin je ostao skoro nepromijenjen u odnosu na rezultate dobijene sa sPOX kukuruza i pasulja (Slika 23, 24).



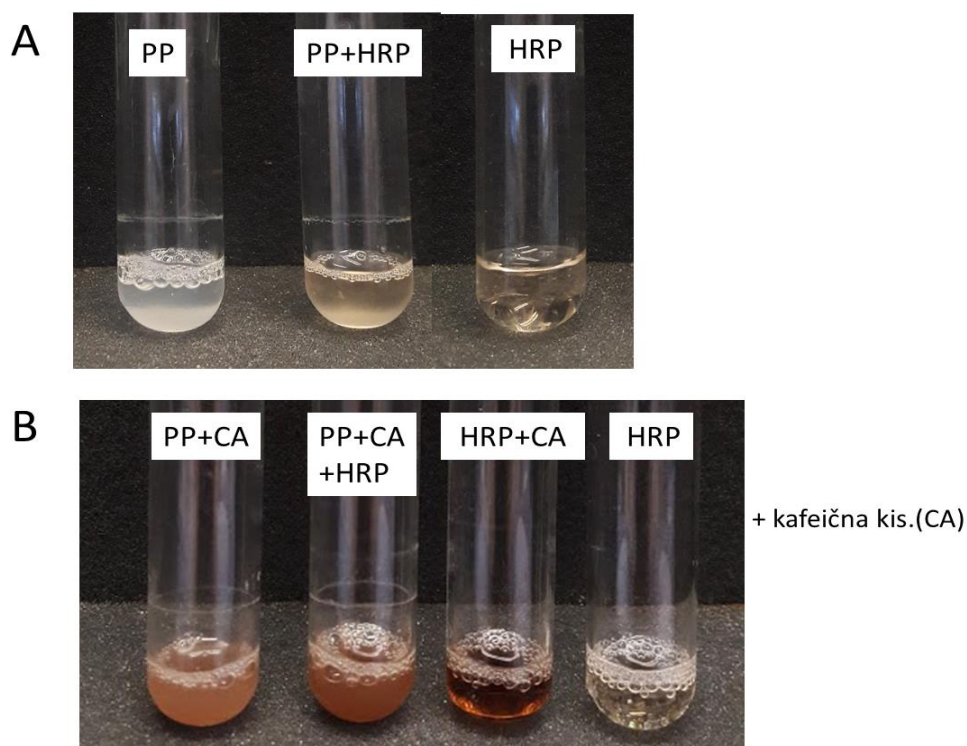
Slika 29. SDS-PAGE HRP-katalizovanog umrežavanja proteina krompira sa dodatkom H_2O_2 . M- Markeri poznatih molekulskih masa. 1-4: proteini krompira sa HRP i H_2O_2 nakon 0, 60, 180 i 300 minuta inkubacije. 5-6: proteini krompira sa dodatkom H_2O_2 u odsustvu HRP nakon 0 i 300 minuta inkubacije. 7-8: HRP sa dodatkom H_2O_2 nakon 0 i 300 minuta inkubacije.



Slika 30. SDS-PAGE HRP-katalizovanog umrežavanja proteina krompira sa dodatkom H_2O_2 u prisustvu kafeične kiseline (2 mM). M- Markeri poznatih molekulskih masa. 1-2: proteini krompira sa kafeičnom kiselinom (i dodatkom H_2O_2) u odsustvu HRP nakon 0 i

300 minuta inkubacije. 3-6: proteini krompira sa HRP (i dodatkom H₂O₂) i kafeičnom kiselinom nakon 0, 60, 180 i 300 minuta inkubacije. 7-8: HRP u prisustvu kafeične kiseline (i dodatkom H₂O₂) nakon 0 i 300 minuta inkubacije.

Kada je dodata kafeična kiselina, nakon 3h inkubacije primjećeno je intenzivno umrežavanje proteina krompira, praćeno formiranjem proteinskog monomera (oko 25 kDa) i polimera visokih molekularnih masa, ali bez smanjenja intenziteta trake patatina (Slika 30). Dodatak kafeične kiseline doveo je i do umrežavanja HRP (Slika 30).



Slika 31. Rastvori proteina krompira (PP) bez i sa HRP, kao i rastvor HRP (A); 2 mM kafeične kiseline (CA) je dodata svim rastvorima: rastvoru proteina krompira (PP) bez ili sa HRP, kao i rastvoru koji sadrži samo HRP. Kontrolni rastvor HRP bez dodatka kafeične kiseline je također prikazan na slici. Uzorci rastvora su fotografisani nakon 300 minuta inkubacije na 37°C.

Osim toga, na kraju inkubacije došlo je do formiranja tamnog pigmenta u rastvorima sa kafeičnom kiselinom i neumreženim, ali i umreženim proteinima krompira, kao i u rastvoru HRP sa dodatkom kafeične kiseline (Slika 31B). Rastvor sa HRP bez kafeične

kiseline ostao je nepromijenjen (Slika 31A). Tamna pigmentacija u rastvoru umreženog proteina krompira na kraju inkubacije ukazuje na prisustvo fenolnih jedinjenja koja formiraju melanoidne molekule, što je prethodno publikovano (Galeazzi i sar., 1990).

Da bi se razjasnila uloga fenolnih medijatora u umrežavanju proteina krompira katalizovano peroksidazama, poređeni su rezultati na SDS-PAGE gelovima dobijeni sa dodatkom komercijalne peroksidaze (HRP) u prisustvu i bez prisustva kafeične kiseline, praćeni postepenim dodavanjem H₂O₂. Pored formiranja umreženih proteina visokih molekularnih masa, uočeno je i umrežavanje inhibitora proteaza katalizovano sa HRP i u prisustvu i bez dodatka kafeične kiseline, dok je globularni protein patatin ostao nepromijenjen. Dodatak kafeične kiseline indukovao je samo-umreženje HRP, ali takođe i umrežavanje proteina krompira u odsustvu enzima. Ovo se može objasniti činjenicom da je protein krompira više podložan oksidaciji vodonik peroksidom u prisustvu kafeične kiseline, što je dovelo do formiranja umrežavanja proteina i nastanka biopolimera. Ranije je pokazano za proteine kikirikija, da kafeična kiselina može biti lako oksidovana derivatima hinona, što je dovelo do umrežavanja proteina kikirikija u odsustvu enzima (Chung i sar., 2005). Pored toga, poznato je da fenolna jedinjenja reaguju u uslovima oksidacije i formiraju reaktivne hinone koji u interakciji sa hidroksilnim, sulfhidrilnim ili amino grupama u proteinskom lancu dovode do kovalentnih veza (Thalmann i Lötzbeyer, 2002; Buchert i sar., 2010; Heck i sar., 2013; Isaschar-Ovdat i Fishman, 2018) i umrežavanja proteina (Strauss i Gibson, 2004; Prodpran i sar., 2012). Ovo može objasniti reakciju umrežavanja proteina krompira u odsustvu enzima. Prisustvo kafeične kiseline zajedno sa HRP indukovalo je pojavu novog monomera sa molekulskom masom od 25 kDa, što je u skladu sa rezultatima dobijenim kada je protein krompira umrežen sa solubilnim peroksidazama iz kukuruza i pasulja.

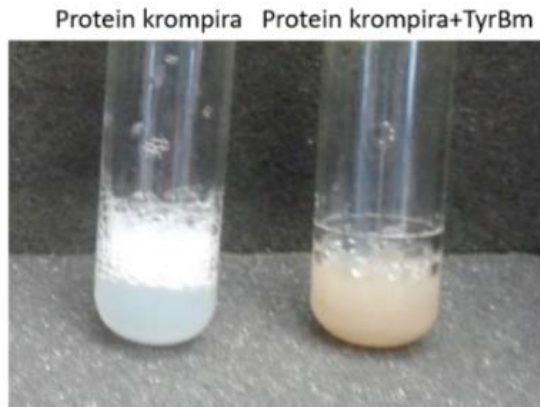
Druge studije su pokazale da u prisustvu kafeične kiseline, druga oksidoreduktaza, tirozinaza može da indukuje umrežavanje α -laktalbumin, β -laktoglobulin i lizozoma, dok je u odsustvu kafeične kiseline samo umrežavanje α -laktalbumin detektovano (Thalmann i Lötzbeyer, 2002). Slični rezultati su pokazali umrežavanje sojinog glicinina bakterijskom tirozinazom, u prisustvu različitih fenolnih jedinjenja (Isaschar-Ovdat i sar., 2015). U pomenutoj studiji kafeična kiselina je dovela do najvećeg procenta umrežavanja vjerovatno zbog visoke difenolazne aktivnosti tirozinaze u prisustvu kafeične kiseline u poređenju sa monofenolaznom aktivnošću sa *p*-kumaričnom kiselinom (Isaschar-Ovdat i

sar., 2015). Pored kafeične kiseline, ferulična kiselina se može prevesti u poluhinonski radikal nakon oksidacije sa H_2O_2 u reakciji koju katalizuje peroksidaza i dovesti do stvaranja polimera (Oudgenoeg i sar., 2001).

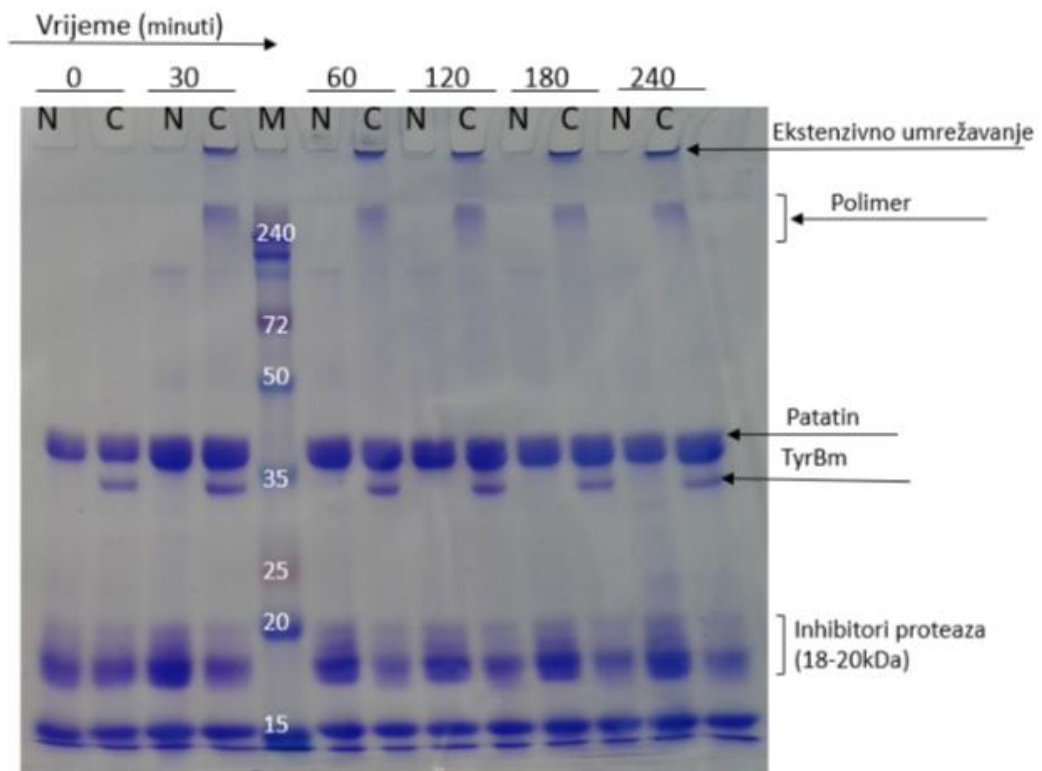
S druge strane, u različitim studijama negativne posljedice uvođenja fenolnih medijatora u reakcije umrežavanja su detektovane. S tim u skladu uvođenje fenolnog medijatora u reakciji umrežavanja sojinog glicinina katalizovanog tirozinazom dovelo je do stvaranja neželjenih proizvoda u obliku velikih umreženih kompleksa i tamne pigmentacije umrežene disperzije (Isaschar-Ovdat i sar., 2015). Uloga mogućeg prisustva fenolnih jedinjenja u enzimskom ekstraktu iz korijena pasulja i kukuruza doprinijela je umrežavanju proteina krompira, a posebno, umrežavanju globularnog proteina, patatina preko oksidovanog fenolnog molekula i aminskog ostatka u patatinu. S druge strane, na osnovu dobijenih i prezentovanih rezultata, može se zaključiti da su u odsustvu fenolnog medijatora, solubilne peroksidaze iz korijena pasulja i kukuruza katalizovale hidroksilaciju tirozinskih ostataka u reaktivni hinonski oblik i samim tim dovele do nastanka reaktivne grupe za reakciju umrežavanja proteina krompira. S druge strane, s obzirom da patatin ima više lizinskih (20 ostataka) nego tirozinskih (16 ostataka) ostataka (PDB kod 4pka: <https://www.rcsb.org/structure/4pka> od *Solanum cardiophyllum* sa 88% identiteta sekvence sa *S.tuberosum* patatinom), poznato je da u prisustvu fenolnih medijatora, umrežavanje može nastati i preko lizinskih ostataka (Hilhorst i sar., 1999; Boeriu i sar., 2004) što može objasniti intenzivno umrežavanje patatina.

5.2.3. TyrBm-katalizovano umrežavanje proteina krompira

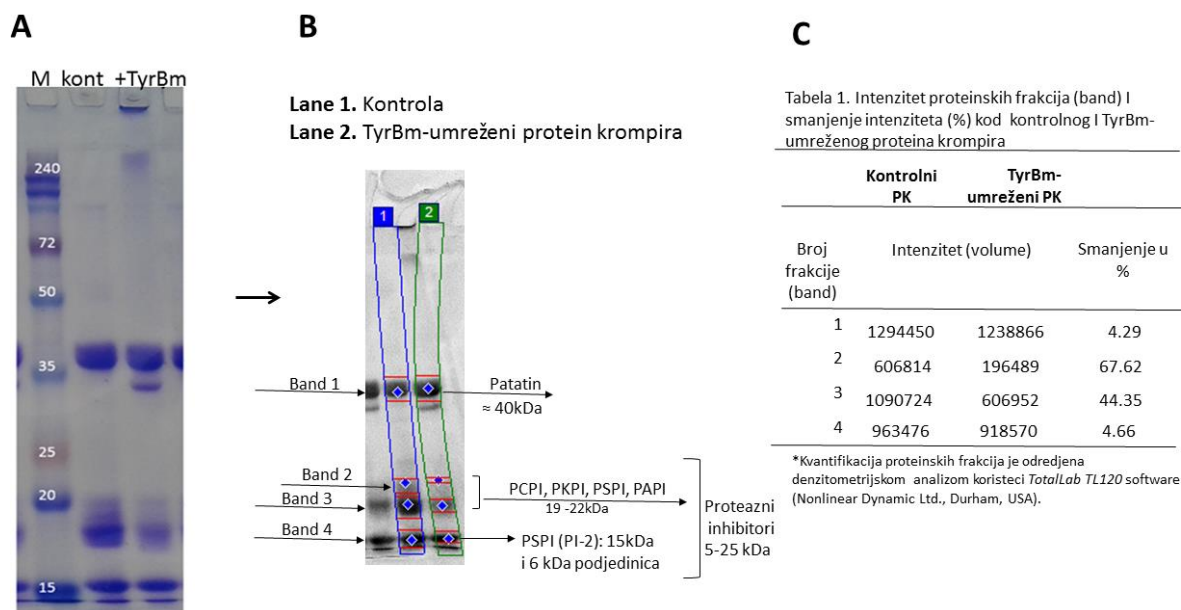
TyrBm je inkubiran sa rastvorenim proteinom krompira i nakon inkubacije uočena je pigmentacija usljed stvaranja melanoidne strukture u umreženom proteinu (Slika 32). Analiza SDS-PAGE pokazala je formiranje fragmenata visoke molekulske mase nakon 30 minuta od dodavanja enzima u rastvor proteina krompira, što je praćeno istovremenim smanjenjem proteinskih monomernih traka (Slika 33). Prema dobijenim rezultatima, patatin je loš supstrat za TyrBm, jer je intenzitet proteinske trake ostao konstantan s vremenom, dok su inhibitori proteaza sa molekulskom masom ~ 20 kDa veoma brzo umreženi sa TyrBm, što pokazuje smanjenje intenziteta proteinskih traka na SDS-PAGE gelu u toku reakcije (Slika 33).



Slika 32. Rastvor proteina krompira sa (i bez) TyrBm nakon 240 minuta inkubacije na 37°C.



Slika 33. SDS-PAGE gel neumreženog (N) i TyrBm-umreženog proteina krompira (C) tokom 240 minuta inkubacije na 37°C. M- Markeri poznatih molekulskih masa.

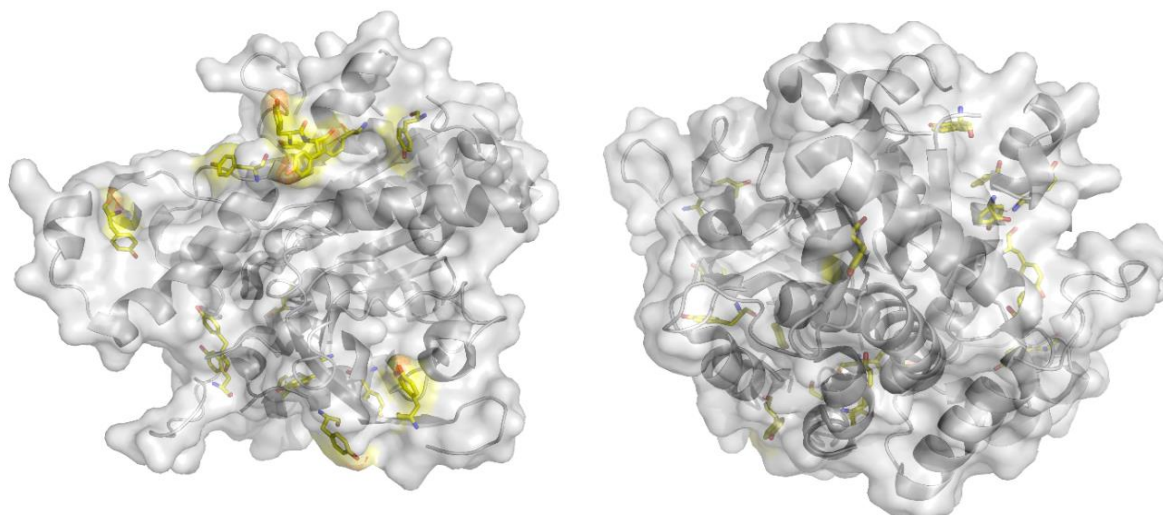


Slika 34. SDS-PAGE gel sa proteinom krompira i TyrBm-umreženim proteinom krompira (A), gel nakon obrade u programu TotalLab (B) sa rezultatima prikazanim u tabeli (C). PK-protein krompira.

SDS-PAGE gel pokazuje trake neumreženog i TyrBm-umreženog proteina krompira nakon 240 minuta (Slika 33, 34A) i obradu gelova u TotalLab-u (Slika 34B). Sa slike 34C može se vidjeti smanjenje intenziteta za dva inhibitora proteaze (18-20 kDa) u TyrBm-umreženom proteinu krompira za više od 60% i 40%. Međutim, pošto je korištena mješavina proteina krompira, mogućnost da se precizno definiše količina specifičnog inhibitora proteaza je onemogućena. Prema literaturi, proteini krompira sadrže 50% inhibitora proteaza u odnosu na druge frakcije proteina, što može varirati u zavisnosti od stanja skladištenja, stadijuma razvoja i različite sorte (Løkra i sar., 2008; Løkra i sar., 2009). Prema tome, denzitometrijskom analizom možemo pretpostaviti da je 50% inhibitora proteaze sa molekulskom masom oko 20 kDa umreženo sa TyrBm (koncentracija dodatnog enzima bila je 25 puta niža od koncentracije proteina /supstrata krompira).

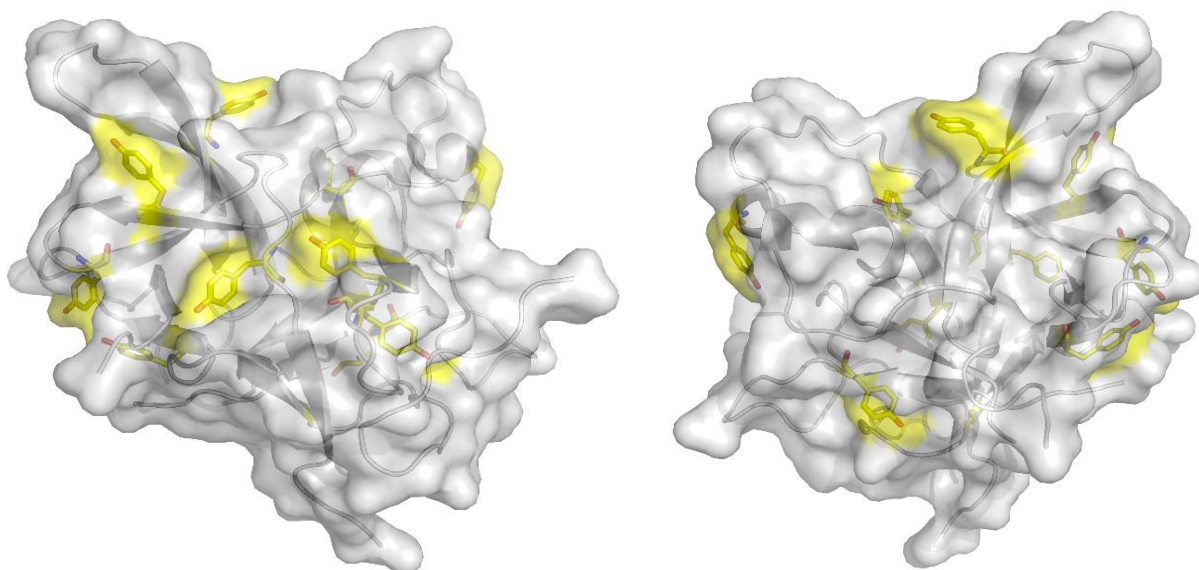
Da bi se dobio jasniji uvod u mehanizam umrežavanja proteina krompira sa TyrBm, ali i peroksidazama, jer oba enzima mogu da oksiduju tirozinske nastavke, za diskusiju i pojašnjenje efekta korištene su kristalne strukture pojedinih frakcija proteina krompira. Kako nema kristalne strukture za patatin iz krompira (*Solanum tuberosum*), kristalna struktura patatina iz *Solanum cardiophyllum* (PDB kod 4PKA; 88% identiteta sekvence sa

S. tuberosum patatinom) je korištena. Može se vidjeti na Slici 35 da se većina ostataka tirozina nalazi unutar globularne strukture koja može objasniti nisku dostupnost tirozinskih ostataka za aktivno mjesto tiroznaza.

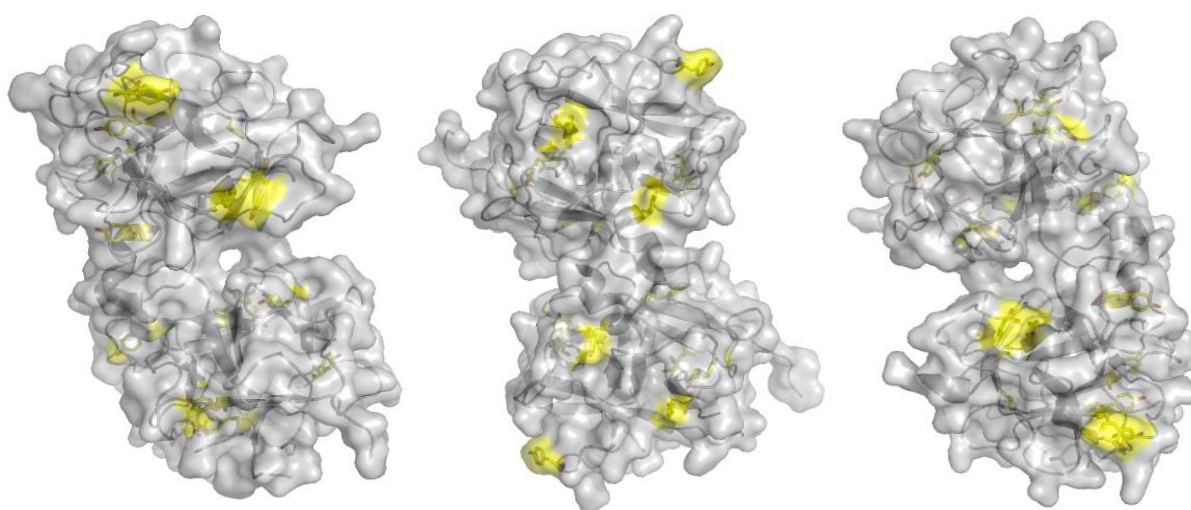


Slika 35. Struktura patatina (PDB kod 4pka: <https://www.rcsb.org/structure/4pka>) *Solanum cardiophyllum* (88% identitet sekvence sa *S.tuberosum* patatinom). Površina proteina je siva. Ostaci tirozina (16 ostataka) su žuti i hidroksilna grupa je obojena crvenom bojom, dok je amino grupa obojena plavom bojom. Protein je prikazan sa dvije različite strane. Predstavljene strukture patatina su generisane pomoću PyMOL-a (<http://www.pymol.org/>).

Za razliku od patatina, globularnog proteina, kristalna struktura za proteazne inhibitore proteina krompira postoji u PDB bazi. Strukture inhibitora cistein proteaze kod *S. tuberosum* PCPI (PDB kod 5DVH) i katepsin D inhibitora (PDB kod 5DZU) imaju mnoge ostatke tirozina na površini proteina, koji su pozicionirani ka spoljašnjoj sredini, što ukazuje da imaju veću dostupnost za TyrBm (Slika 36, 37).

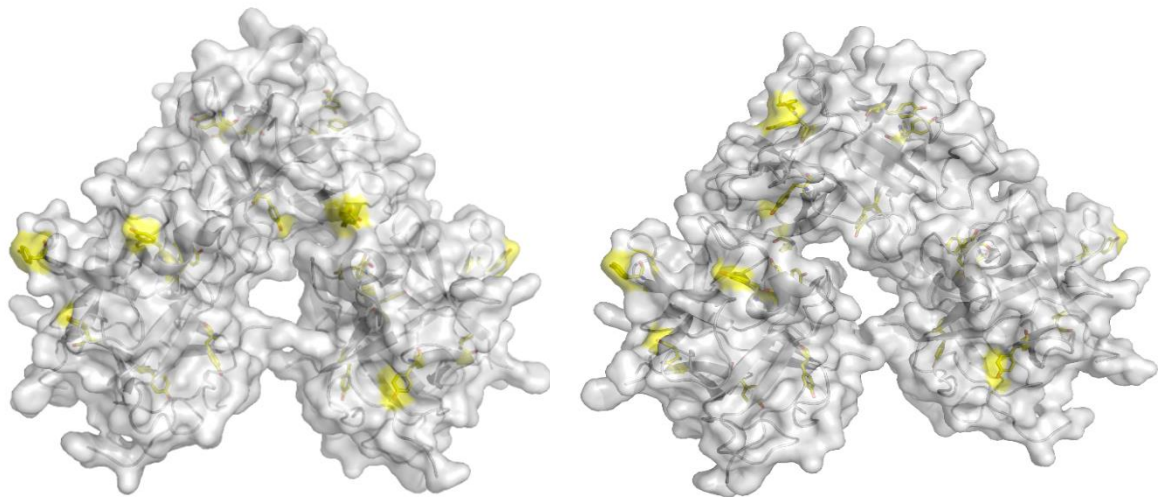


Slika 36. Struktura krompirovog (*Solanum tuberosum*) Kunitz-tip cistein proteaznog inhibitora PCPI-3 (PDB kod 5dvh: <https://www.rcsb.org/structure/5dvh> (monomer, 20 kDa) krompira. Površina proteina je siva. Ostaci tirozina (11 ostataka) su žuti i hidroksil grupa je obojena crvenom bojom. Protein je prikazan sa dvije različite strane. Predstavljene strukture Kunitz-tip inhibitor cistein proteaza PCPI-3 su generisane pomoću PyMOL-a (<http://www.pymol.org/>)



Slika 37. Struktura (*Solanum tuberosum*) katepsina D inhibitora (PDB kod 5dzu: <https://www.rcsb.org/structure/5dzu>) iz krompira. Površina proteina je siva. Ostaci tirozina

(16 ostataka) su žuti i hidroksil grupa je obojena crvenom bojom. Protein je prikazan sa tri različite strane. Predstavljene strukture katepsin D inhibitora su generisane pomoću PyMOL-a (<http://www.pymol.org/>)



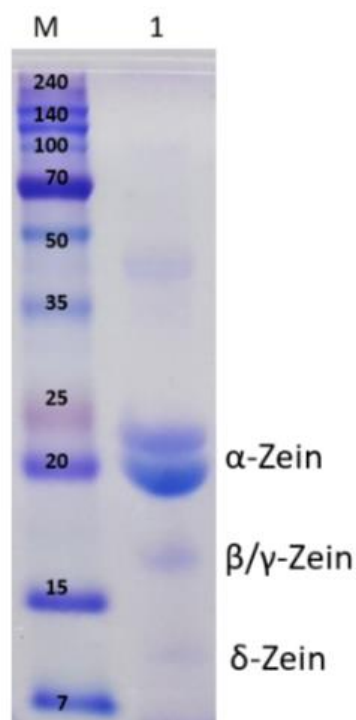
Slika 38. Struktura inhibitora serine proteaza krompira (*Solanum tuberosum*) (PDB kod 3tc2: <https://www.rcsb.org/structure/3tc2>) (pentamer, 39 kDa). Površina proteina je siva. Ostaci tirozina (21 ostatak) su žuti i hidroksilna grupa je obojena crvenom bojom. Predstavljene strukture inhibitora serinske proteaze su generisane pomoću PyMOL-a (<http://www.pymol.org/>)

Prema prethodno diskutovanim rezultatima, inhibitori serin proteaza krompira nisu bili umreženi sa TyrBm, vjerovatno jer je u pitanju pentamerni protein čija struktura se može vidjeti na Slici 38.

Proteomiks analiza inhibitora proteaza sa molekulskom masom ~ 20 kDa potvrdila je da su zaista najobimnije frakcije koje su umrežene sa TyrBm pripadale PCPI, katepsin D inhibitoru i drugim inhibitorima proteina Kunitz. Ranije je pokazano da polimerizacija inhibitora proteaza može uticati na digestiju proteina krompira (Liener, 1994).

5.2.4. Prečišćavanje i karakterizacija model proteina kukuruza-zeina

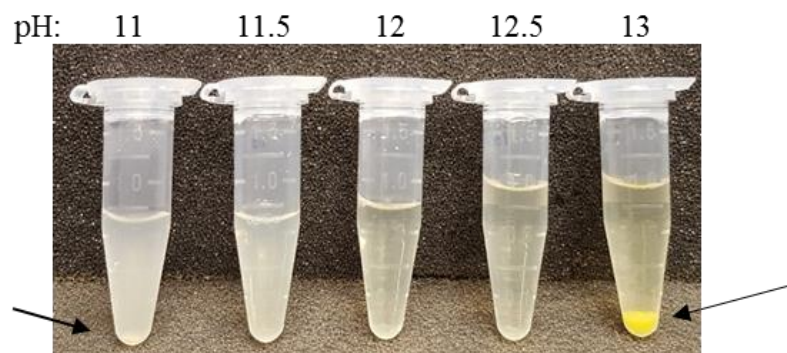
Izolacija i prečišćavanje zeina iz CGM izvedena je prema metodi Matsushima i saradnika (Matsushima i sar., 1997) korištenjem ekstrakcije sa 2-propanolom, taloženjem sa NaCl, zatim ekstrakcijom sa 90% etanolom i dijalizom. Identifikacija i kvantifikacija frakcija proteina zeina urađena je pomoću SDS-PAGE (Slika 39).



Slika 39. SDS-PAGE profil ekstrahovanog zeina (A): M- Marker sa standardnim molekulskim masama, traka 1: zein (pH 11,5) poslije dijalize.

Protein zein je ekstrahovan iz brašna kukuruznog glutena - CGM (engl., *corn gluten meal*) i prema SDS-PAGE analizi ima visok stepen čistoće (Slika 39). Zein je podijeljen, na osnovu rastvorljivosti, molekulske mase i strukture u četiri različite frakcije; α , β , γ i δ (Ni i Dumont, 2017). Sve četiri frakcije se mogu jasno razlikovati na SDS-PAGE gelu (Slika 39). Glavni zein-protein je α -zein (80-85%) koji se sastoji od dva proteina sa molekulskom masom od 22 i 24 kDa što je i najobimnija frakcija u prečišćenom zeinu iz CGM. β -zein (~10%) se sastoji od jedne subjedinice sa molekulskom masom od 17 kDa, γ -zein (10-15%) sastoji se od dvije subjedinice γ 1 (27 kDa) i γ 2 (18 kDa). U nativnom zeinu, β i γ zein su povezani disulfidnim vezama i manje su hidrofobni od α -zeina (Paraman i Lamsal, 2011). δ -zein se sastoji od jedne subjedinice molekulske mase od 10 kDa (Huang i sar., 2004).

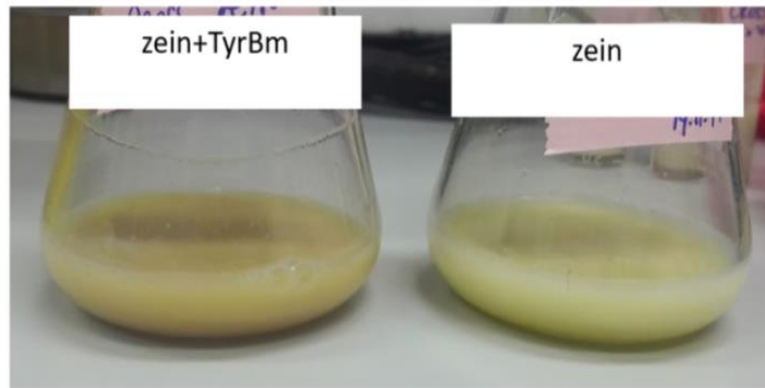
Prema elementarnoj analizi, koncentracija zeina određena je kao 86%. Slični rezultati za zein izolovan iz CGM-a prethodno su objavljeni sa 82% do 87,6% (Paraman & Lamsal, 2011; Wu, Myers, & Johnson, 1997). Kao što je ranije pomenuto, rastvorljivost zeina je ograničena na alkalne pH i vodene alkohole (Shukla i Cheryan, 2001). Rastvorljivost prečišćenog zeina u puferu je moguća u pH opsegu od 11,5-12,5 (Slika 40).



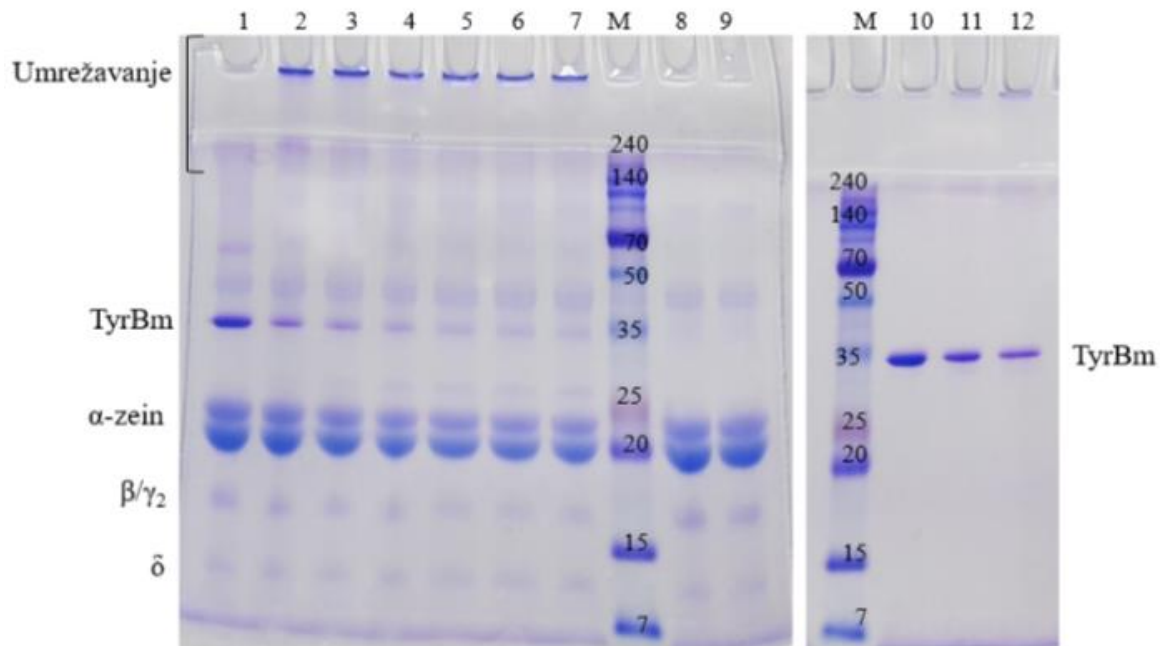
Slika 40. Rastvorljivost zeina u puferima (25 mM) u opsegu pH 11-13. Crne strelice označavaju nerastvorljive frakcije proteina.

5.2.5. TyrBm-katalizovano umreženje zeina

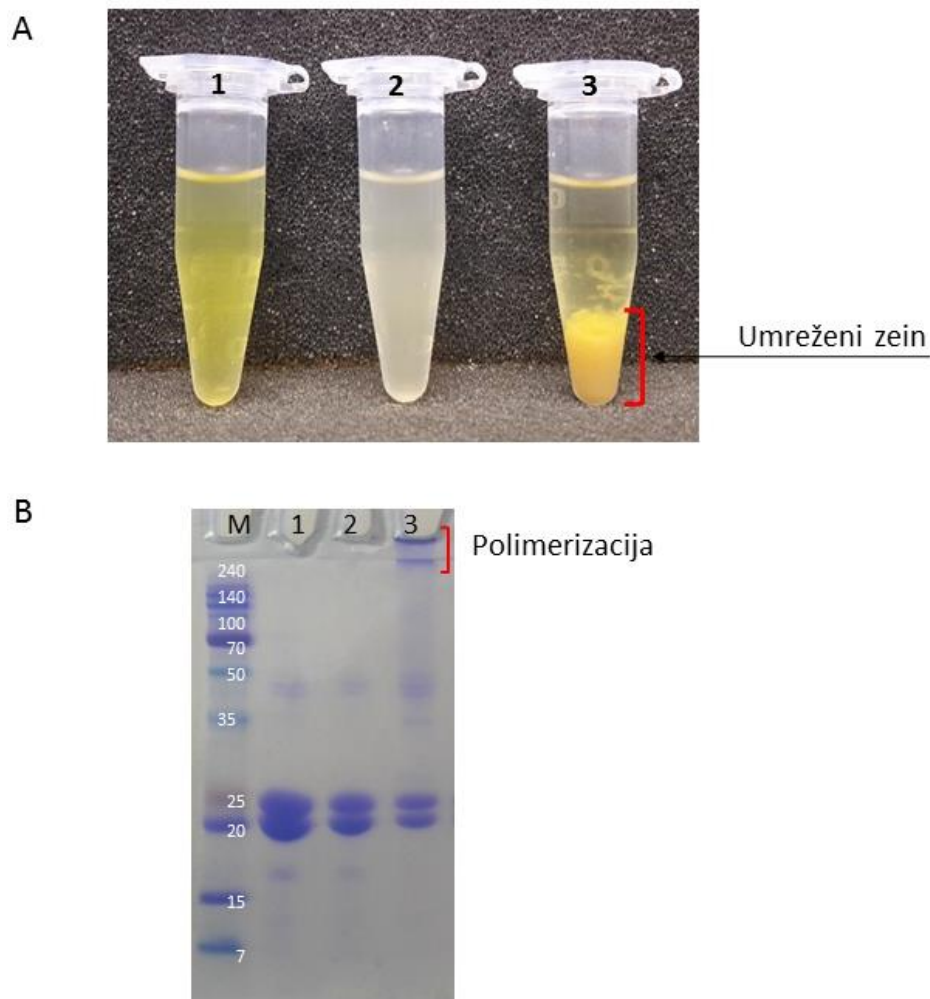
Rastvor zeina u alkalnom puferu (Tris-HCl 50 mM, pH 10) je inkubiran sa TyrBm u određenom vremenskom periodu, a brzina i stepen umrežavanja je praćen pomoću SDS-PAGE (Slika 42). Uočena je blaga pigmentacija rastvora zeina sa TyrBm nakon inkubacije (Slika 41). Formiranje fragmenata visoke molekulske mase praćeno je smanjenjem intenziteta proteinskih monomernih traka i nakon samo 30 minuta inkubacije (Slika 42). α -zeini su najbolji supstrati za TyrBm, praćeni β/γ_2 i δ zein frakcijama. Samo-polimerizacija TyrBm je takođe vidljiva iz kontrolne reakcije (bez zeina) (Slika 42).



Slika 41. Rastvor zeina sa TyrBm i bez TyrBm, nakon inkubacije na 37°C tokom 240 minuta.



Slika 42. SDS-PAGE profili TyrBm-polimerizovanog zeina. M- Markeri poznatih molekulskih masa. 1-7: zein sa TyrBm poslije 0, 30, 90, 120, 180, 240 i 300 minuta inkubacije; 8-9: zein bez TyrBm nakon 0 i 300 minuta inkubacije; 10-12: TyrBm bez zeina poslije 0, 120 i 300 minuta inkubacije.

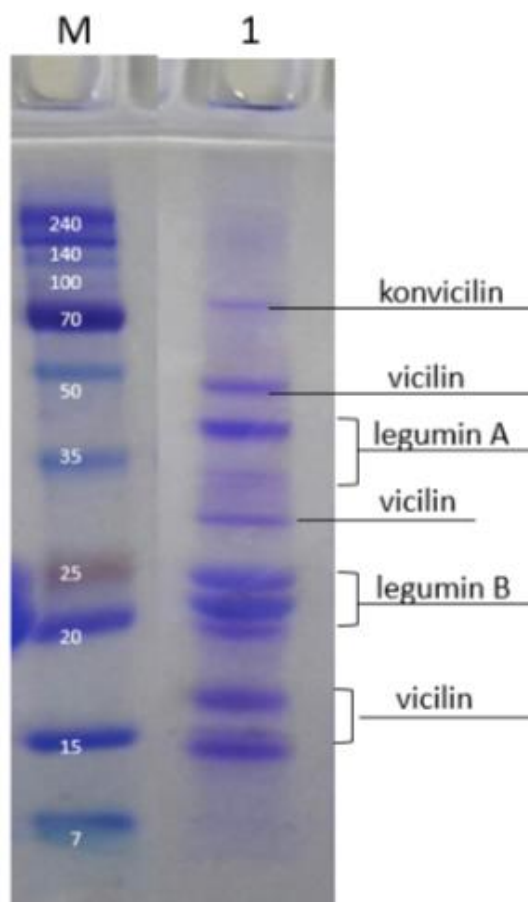


Slika 43. A) Rastvorljivost liofilizovanog nativnog zeina (10 mg/mL) u 90% etanolu nakon 48h (1), liofilizovanog neumreženog zeina (2) i liofilizovanog TyrBm-umreženog zeina nakon 5 sati inkubacije (3). B) SDS-PAGE nativni zein (1), neumrežen zein (2) i TyrBm- umreženi zein (3), M- Markeri poznatih molekulskih masa.

Neumreženi zein i TyrBm-umreženi zein na kraju enzimske reakcije liofilizovani su i nakon toga rastvoreni u etanolu (Slika 43). Nativni netretirani zein, kao i neumreženi zein, rastvoreni su u etanolu i posmatrani više od dva dana. Netretirani zein je pokazao trenutnu i kompletnu rastvorljivost u etanolu, dok se TyrBm-umreženi zein momentalno istaložio (Slika 43A), što dalje potvrđuje da je zein uspješno umrežen sa TyrBm i da je nerastvorljiv, što je odlika većina umreženih proteina. Ovo je potvrđeno i na SDS-PAGE gelu (Slika 43B) kao evidentno smanjenje inteziteta traka α -zeina.

5.2.6. Karakterizacija model proteina graška

Karakterizacija komercijalnog koncentrata proteina graška izvršena je korištenjem SDS-PAGE (Slika 44), koja prikazuje tipični proteinski profil proteina graška (Barac i sar., 2010; Boye i sar., 2010).



Slika 44. SDS-PAGE profil rastvorljivog koncentrata graška. M- Marker poznatih molekulskih masa, koncentrat proteina graška (pH 10) (1).

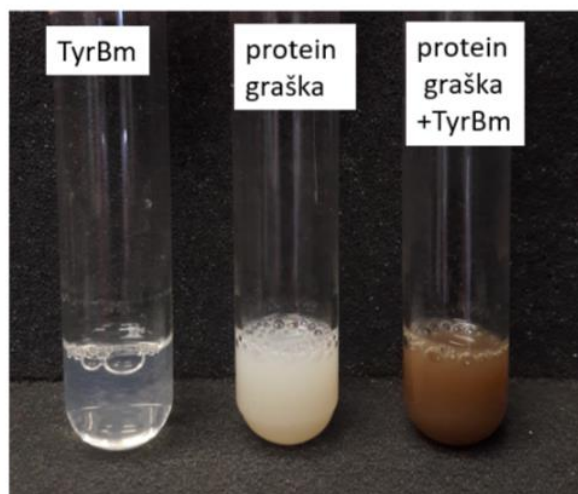
Sjeme graška sadrži između 20-30% težine ukupnih proteina sastavljenih od 7S/11S globulina (50-60% ukupnog) i albumin 2S (15-25%) (Barac i sar., 2010). Heksamerni homo-oligomer, legumin (11S) i trimeri vicilin/konvicilin (7S) su glavne globularne proteinske frakcije. Legumin (~360-400 kDa) ima svaku subjedinicu (~60 kDa) sastavljenu od kiselih (38-40 kDa) i bazinih polipeptida (19-22 kDa) povezanih jednom disulfidnom vezom (Barac i sar., 2010; Boye i sar., 2010). Subjedinica legumina ima približno četiri metioninska ostatka i između 2-7 cisteinskih aminokiselinskih ostataka. Vicilin 7S je trimerni protein sa molekulskom masom ~ 150 kDa kojem nedostaje

aminokiselina sumpora i stoga ne može formirati disulfidne veze. Vicilinske subjedinice mogu varirati tako da su nađene frakcije sa različitim molekulskim masama ~ 47 kDa, ~ 50 kDa, ~ 34 kDa i ~ 30 kDa (Barac i sar., 2010). Neke od 50-kDa subjedinica vicilina zbog posttranslacione proteolize ubrzo nakon biosinteze dovode do nastanka skraćenih peptida (u rasponu od 12,5 do 33 kDa) ali ostaju i dalje povezani sa neoštećenim subjedinicama u izvornom 150 kDa oligomeru (Pedrosa i sar., 2000; Barac i sar., 2010). Konvicilin (~990 kDa), treći protein za skladištenje, sa molekulskom masom od ~71 kDa. Na SDS-PAGE gelu jasno se mogu vidjeti proteinske frakcije konvicilina (~70 kDa), legumin A (40 kDa), legumin B (20 kDa) i vicilin (50 kDa, 30-35 kDa, ispod 20 kDa) (Slika 44).

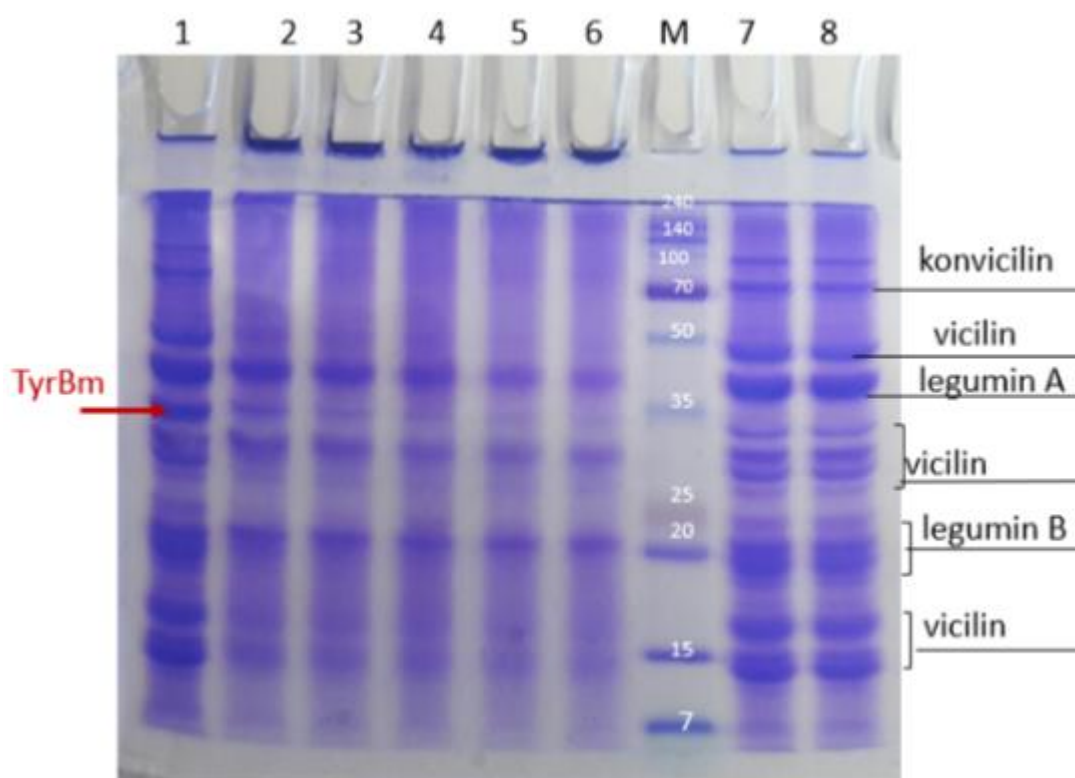
5.2.7. TyrBm-katalizovano umrežavanje proteina graška

U svim eksperimentima korištene su rastvorljive proteinske frakcije uzete iz supernatanta proteina. Visoka rastvorljivost proteina je poželjna za optimalnu funkcionalnost u cilju bolje dostupnosti proteina za umrežavanje. Rastvorljivost proteina graška se poboljšava u alkalnom okruženju i na njega takođe utiče genotip graška (odnos vicilina i legumina), metoda ekstrakcije proteina i vrsta pufera sa i bez soli (Peng i sar., 2016).

Sposobnost TyrBm da katalizuje umrežavanje proteina graška je ispitana i rezultati su prikazani na SDS-PAGE (Slika 46). Na kraju inkubacije, takođe je uočena pigmentacija u TyrBm-umreženom proteinu graška, što ukazuje na formiranje melanoidnih jedinjenja (Slika 45). Formiranje biopolimera iz frakcija proteina graška bila je brza i primijećeno je formiranje visokomolekulskih traka u roku od 30 minuta od dodavanja enzima (Slika 46).



Slika 45. Rastvor proteina graška bez TyrBm i sa TyrBm nakon inkubacije na 37°C tokom 240 minuta. Prikazana je epruveta koja sadrži samo rastvor TyrBm.



Slika 46. SDS-PAGE gel TyrBm-polimerizovanog proteina graška: M- Markeri poznatih molekulskih masa. 1-6: proteini graška sa TyrBm poslije 0, 30, 60, 120, 180 i 240 minuta inkubacije. 7-8: proteini graška bez TyrBm poslije 0 i 240 minuta inkubacije.

Smanjenje intenziteta proteinskih traka s vremenom je bilo najočiglednije kod vicilin/konvicilin frakcija i frakcija niske molekulske mase vicilina (ispod 20 kDa), što ukazuje da su ove frakcije bile umrežene pomoću TyrBm i da su ove frakcije dobri supstrati za TyrBm (Slika 46). Konvicilin i legumin A obiluju sa više ostataka tirozina nego vicilin (50 kDa) i legumin B (poređenje proteinske sekvence u UniProtKB: P13915-konvicilin, P15838-legumin A, P13918-vicilin i P14594-legumin B), stoga se očekuje da budu bolji supstrati za tirozinazu. Međutim, frakcija vicilina sa molekulskom masom od oko 32 kDa i frakcije legumina A/B bile su umrežene, ali u manjoj mjeri u poređenju sa konvicilinom i drugim vicilin frakcijama (50 kDa, 34 kDa, 30 kDa, ispod 20 kDa) koje su se potpuno izgubile pred kraj inkubacije (Slika 46). Ne samo broj ostataka tirozina, već i dostupnost i položaj ostataka u visoko složenoj globularnoj strukturi proteina u odnosu na enzim ključan je za enzimsku katalizu (Isaschar-Ovdat i Fishman, 2017). Isti trend umrežavanja proteina graška, u smislu iščežavanja istih proteinskih frakcija usljed umrežavanja, pronađen je i kad je korišten enzim iz grupe transferaza, transglutaminaza (Djoullah i sar., 2018). Prema nekoliko autora, frakcije vicilina od 31/33 kDa i frakcije legumina B nije bilo moguće umrežiti sa transglutaminazom bez prethodnog hemijskog ili termičkog tretmana (Djoullah i sar., 2018), dok su bez obzira na prethodni hemijski ili termički tretman frakcije vicilina sa nižim molekulskim masama (ispod 20 kDa) bile i dalje nepromijenjene pod uticajem enzima (Sun i Arntfield, 2011; Ribotta i sar., 2012). Prema dobijenim rezultatima, frakcije proteina graška sa niskom molekulskom masom bile su dobri supstrati za TyrBm. Naime, frakcije proteina graška izgleda da su bolji supstrati za TyrBm, u poređenju sa frakcijama proteina krompira. Proteini krompira imaju nešto veću količinu aromatičnih aminokiselina (fenilalanina i tirozina) u poređenju sa proteinima graška (Alting i sar., 2011; Arntfield i Maskus, 2011), međutim čini se da su tirozinski ostaci dostupniji aktivnom mjestu TyrBm u proteinima graška nego kod proteina krompira (Glusac i sar., 2017). Svi nastali biopolimeri su imali molekulsku masu veću od 240 kDa i nisu mogli ući u gel (Slika 46).

6. ZAKLJUČAK

Peroksidaze Klase III (POX, EC 1.11.1.7), solubilne i jonski vezane za ćelijski zid iz korijena kukuruza (*Zea mays* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) djelimično su prečišćene i biohemijski okarakterisane.

Rezultati masene spektrometrije pokazali su prisustvo 18 solubilnih POX u korijenu kukuruza sa molekulskim masama u opsegu od 33,1-38,7 kDa i sa pI vrijednostima u opsegu od 6,06-8,90. Kod pasulja je detektovan znatno manji broj POX, svega 5 sa molekulskim masama od 35,2-38 kDa i sa pI vrijednostima u opsegu od 5,08-8,75. Dužina aminokiselinske sekvence solubilnih peroksidaza pasulja i kukuruza dobijena LC-MS/MS bila je od 320-367 aminokiselina za solubilne peroksidaze kukuruza, dok je sPOX bio u opsegu od 329-348, što je uobičajena dužina polipeptidnih lanaca Klase III sekretornih peroksidaza. Djelimično prečišćene solubilne i jonski vezane peroksidaze iz korijena kukuruza i pasulja odlikovale su se razlikama u broju izoformi kao i širokim rasponom molekulskih masa izoformi. Gelovi za modifikovanu SDS-PAGE obojeni sa 1 mM 3,3-diaminobenzidinom (DAB) pokazali su 5 različitih peroksidaznih izoformi za sve prečišćene frakcije, osim za solubilnu frakciju pasulja koja je imala 6 peroksidaznih izoformi. Uobičajene izoforme peroksidaza od oko 45 i 38 kDa, kao i izoforme sa molekulskom masom većom od 130 kDa, bile su prisutne u svim izolatima. U svim frakcijama kukuruza i pasulja su identifikovane tipične izoforme u opsegu od 28-60 kDa. Izoforme sa molekulskim masama oko 78 i 50 kDa detektovane su u svim peroksidaznim frakcijama osim u jonskoj frakciji pasulja. Nativnom elektroforezom detektovano je pet peroksidaznih izoformi u solubilnoj proteinskoj frakciji korijena pasulja i 3 peroksidazne izoforme u jonski vezanoj frakciji za ćelijski zid pasulja. U solubilnoj proteinskoj frakciji korijena kukuruza 8 POX izoformi je detektovano, a u frakciji vezanoj za ćelijski zid četiri POX izofome.

Prema vrijednostima K_m , sve peroksidaze su pokazale niži afinitet za pirogalol nego za H_2O_2 , naročito frakcije POX izolovane iz pasulja. Kada je H_2O_2 korišten kao supstrat, vrijednosti K_m nisu se razlikovale između solubilnih i jonskih POX, za obe biljke. POX izolovane iz pasulja odlikovao je niži afinitet (veći K_m) za oba supstrata nego POX izolovane iz kukuruza, u datim uslovima.

Najveća supstratna specifičnost izmjerena je sa kafeičnom kiselinom i za solubilne i za jonske peroksidaze, izolovane iz korijena pasulja i kukuruza.

Drugi cilj ove disertacije bio je ispitati sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla, kao što su proteini krompira, sa solubilnim i jonskim peroksidazama kukuruza i pasulja. Dobijeni rezultati SDS-PAGE gelova, pokazali su da su solubilne frakcije peroksidaza, kukuruza i pasulja, umrežile globularni protein iz krompira, patatin, kao i druge frakcije proteina krompira. Umrežavanje je bilo moguće u prisustvu solubilnih peroksidaza, kukuruza i pasulja, sa dodatkom i bez dodatka H₂O₂. Jonski vezane peroksidaze za ćelijski zid pokazale su slabiju sposobnost umrežavanja proteina krompira. Po prvi put je pokazano da je globularni protein, patatin umrežen sa peroksidazama iz kukuruza i pasulja, dok je slabo umrežavanje uočeno sa tirozinazom iz *Bacillus megaterium*. Uprkos činjenici da patatin ima 16 tirozinskih rezidua, većina tirozinskih ostataka je smještena u unutrašnju strukturu proteina, što je otežalo umrežavanje sa tirozinazom. Dodatne analize sprovedene u cilju boljeg određivanja mehanizma umrežavanja su pokazale da su fenolna jedinjenja iz prečišćenog ekstrakta peroksidaza, kukuruza i pasulja, poslužila kao medijator u reakciji umrežavanja proteina krompira. Važno je napomenuti da peroksidaze u prisustvu fenolnih medijatora mogu da umrežavaju proteine i preko lizinskih i cistenskih ostataka, a s obzirom da patatin ima 20 ostataka lizina, intenzivno umrežavanje patatina moglo je nastati i preko lizina, a ne samo preko tirozina. Stoga, na osnovu dobijenih rezultata, predložena su dva moguća mehanizma za umrežavanje patatina sa solubilnim peroksidazama iz korijena pasulja i kukuruza u odsustvu fenolnog medijatora i u prisustvu fenolnog medijatora. Mehanizam umrežavanja patatina u odsustvu fenolnog medijatora vjerovatno se vrši preko hidrosilacije tirozinskih ostataka u reaktivne hinonske oblike i na taj način se stvara reaktivna grupa za reakciju umrežavanja proteina krompira. U prisustvu fenolnog medijatora, mehanizam umrežavanja patatina se dešava vjerovatno preko oksidovanog fenolnog molekula i aminskog ostatka u patatinu.

Polifenoloksidaza ili tirozinaze (EC 1.14.18.1) iz korijenja kukuruza i pasulja su takođe djelimično prečišćene i okarakterisane. LC-MS/MS analiza je pokazala odsustvo tirozinaza iz solubilnog proteinskog ekstrakta korijena pasulja, dok su u solubilnom proteinskom ekstraktu korijena kukuruza detektovane dvije polifenoloksidaze sa niskim stepenom sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci kada su poređene sa polifenoloksidazama iz kukuruza (iz baze Uniprot). Detektovane polifenoloksidaze u korijenu kukuruza imale su

molekulsku masu od 65,5 kDa (pI 7,97) i 70,9 kDa (pI 7,30). Izmjerena enzimska aktivnost za obe tirozinaze je bila izuzetno niska, stoga je u daljem radu vezanom za umrežavanje proteina korištena rekombinantna tirozinaza bakterijskog porijekla, izolovana iz *Bacillus megaterium* (TyrBm).

Ispitana je sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla, već spomenutog proteina krompira, ali i proteina graška i hidrofobnog proteina zeina, izolovanog iz kukuruza sa TyrBm. Proteini krompira i kukuruza su prečišćeni u laboratoriji i korišteni u daljem radu, dok su komercijalno dostupni koncentracije proteina graška korišteni. Za razliku od djelimično prečišćenih peroksidaza, TyrBm nije umrežio patatin, dok su proteini krompira manje molekulske mase bili umreženi i predstavljaju dobre supstrate za TyrBm. TyrBm je pokazao dobru sposobnost umrežavanja hidrofobnog proteina zeina u alkalnoj sredini, što je posljedica velikog broja tirozinskih ostataka u zeinu i dobre dostupnosti ostataka aktivnom mjestu tirozinaze. Proteini graška, takođe rastvorljivi u alkalnoj sredini su umreženi sa TyrBm, posebno proteinske frakcije vicilina i konvicilina, kao i frakcije sa malim molekulskim masama. Iako proteini graška imaju manje ostataka tirozina, bolji su supstrati za TyrBm u odnosu na proteine krompira. Stoga, može se zaključiti da ne samo broj ostataka, već i dostupnost i položaj aminokiselinskih ostataka u terciarnoj strukturi proteina u odnosu na enzim ključan za enzimsku katalizu. Dobijeni rezultati ukazuju na različit mehanizam umrežavanja istih proteina sa dva različita oksidoreduktazna enzima, peroksidazama i tirozinazama.

Enzimski katalizovano umrežavanje globularnih proteina omogućava dodatni uvid u protein-protein interakciju, stoga dobijeni rezultati mogu biti korisni kako za prečišćavanje peroksidaze iz korijena kukuruza i pasulja, tako i za aplikacije u modifikaciji biofizičke strukture proteina, putem reakcija enzimski katalizovanog umrežavanja.

Rezultati ove doktorskoj disertacije o biohemijskim karakteristikama peroksidaza iz korijena kukuruza i pasulja, te bakterijskoj tirozinazi i njihovim sposobnostima umrežavanja odabranih biljnih proteina pružaju informacije koje bi pomogle u unaprijeđenju kreiranja novih životno važnih proizvoda u oblastima biohemije i biotehnologije.

7. LITERATURA

- Abdel-Raheem, A., & Shearer, C. (2002). Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity*, *11*, 1-9.
- Alting, A. C., Pouvreau, L., Giuseppin, M. L. F., & van Nieuwenhuijzen, N. H. (2011). 12 - Potato proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Food Proteins* (pp. 316-334). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Arntfield, S. D., & Maskus, H. D. (2011). 9 - Peas and other legume proteins. In *Handbook of Food Proteins* (pp. 233-266): Woodhead Publishing.
- Baier, A. K., & Knorr, D. (2015). Influence of high isostatic pressure on structural and functional characteristics of potato protein. *Food Research International*, *77*, Part 4, 753-761.
- Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O., & Ristic, N. (2010). Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(12), 4973-4990.
- Barcelo, A. R., Ros, L. V., & Carrasco, A. E. (2007). Looking for syringyl peroxidases. *Trends in Plant Science*, *12*(11), 486-491.
- Bartova, V., & Barta, J. (2009). Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol or ferric chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(19), 9028-9034.
- Bestwick, C. S., Brown, I. R., & Mansfield, J. W. (1998). Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology*, *118*(3), 1067-1078.
- Boeriu, C. G., Bravo, D., Gosselink, R. J. A., & van Dam, J. E. G. (2004). Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, *20*(2), 205-218.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, *43*(2), 414-431.
- Buchert, J., Ercili Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., Mattinen, M., Boer, H., Partanen, R., Selinheimo, E., Lantto, R., & Kruus, K. (2010). Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annual Review of Food Science and Technology*, *1*, 113-138.
- Bull, A., & Carter, B. (1973). The isolation of tyrosinase from *Aspergillus nidulans*, its kinetic and molecular properties and some consideration of its activity in vivo. *Microbiology*, *75*(1), 61-73.

- Chen, S. X., & Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 260(3), 726-735.
- Cheng, Y., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2010). Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 120(1), 101-108.
- Chung, S.-Y., Kato, Y., & Champagne, E. T. (2005). Polyphenol oxidase/caffeic acid may reduce the allergenic properties of peanut allergens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2631-2637.
- Claus, H., & Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 3-14.
- Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J., & Tumer, N. (2001). Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 652-657.
- Cosio, C., & Dunand, C. (2008). Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 391-408.
- Dalfard, A. B., Khajeh, K., Soudi, M. R., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., & Sajedi, R. H. (2006). Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1409-1416.
- David, S., & Livney, Y. D. (2016). Potato protein based nanovehicles for health promoting hydrophobic bioactives in clear beverages. *Food Hydrocolloids*, 57, 229-235.
- Deepa, S., & Arumughan, C. (2002). Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61(5), 503-511.
- Dhayal, S. K., Gruppen, H., de Vries, R., & Wierenga, P. A. (2014). Controlled formation of protein nanoparticles by enzymatic cross-linking of alpha-lactalbumin with horseradish peroxidase. *Food Hydrocolloids*, 36, 53-59.
- Dhayal, S. K., Sforza, S., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2015). Peroxidase induced oligo-tyrosine cross-links during polymerization of alpha-lactalbumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 12(10), 15.
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Oberoi, H. S., Spier, M. R., & Brar, S. K. (2016). Chapter 2 - Agricultural-based protein by-products: Characterization and applications. In G. S. Dhillon (Ed.), *Protein Byproducts* (1st ed., pp. 21-36): Academic Press.
- Djoullah, A., Husson, F., & Saurel, R. (2018). Gelation behaviors of denaturated pea albumin and globulin fractions during transglutaminase treatment. *Food Hydrocolloids*, 77, 636-645.
- Dragišić Maksimović, J., Maksimović, V., Živanović, B., Hadži-Tašković Šukalović, V., & Vuletić, M. (2008). Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize

- root and leaf apoplast, and their association with growth. *Plant Science*, 175(5), 656-662.
- Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B., Regalado, C., & Whitaker, J. R. (2000). Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* DC) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1574-1579.
- Elstner, E. F., & Heupel, A. (1976). Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta*, 130(2), 175-180.
- Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M., & Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*, 47(12), 1749-1760.
- Færgemand, M., Otte, J., & Qvist, K. B. (1998). Cross-Linking of whey proteins by enzymatic oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1326-1333.
- Fairhead, M., & Thony-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology*, 29(2), 183-191.
- Fairhead, M., & Thöny-Meyer, L. (2010). Cross-linking and immobilisation of different proteins with recombinant *Verrucomicrobium spinosum* tyrosinase. *Journal of Biotechnology*, 150(4), 546-551.
- Ferreres, F., Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A., Pereira, D. M., Valentao, P., Andrade, P. B., Duarte, P., Barcelo, A. R., & Sottomayor, M. (2011). Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair? *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2841-2854.
- Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 6-29.
- Galeazzi, L., Groppa, G., & Giunta, S. (1990). Mueller-Hinton broth undergoes visible oxidative color changes in the presence of peroxidase and hydrogen peroxide. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(9), 2145-2147.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., & Escribano, J. (2003). Tyrosinase inhibitory activity of cucumber compounds: enzymes responsible for browning in cucumber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7764-7769.
- Gerrard, J. A., Meade, S. J., Miller, A. G., Brown, P. K., Yasir, S. B., Sutton, K. H., & Newberry, M. P. (2005). Protein cross-linking in food. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 012.
- Glusac, J., Isaschar-Ovdat, S., Kukavica, B., & Fishman, A. (2017). Oil-in-water emulsions stabilized by tyrosinase-crosslinked potato protein. *Food Research International*, 100, 407-415.

- Goldfeder, M., Egozy, M., Shuster Ben-Yosef, V., Adir, N., & Fishman, A. (2012). Changes in tyrosinase specificity by ionic liquids and sodium dodecyl sulfate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(5), 1953-1961.
- Goldfeder, M., Kanteev, M., Isaschar-Ovdat, S., Adir, N., & Fishman, A. (2014). Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nature Communications*, 5.
- Grand View Research. (2015). Pea protein market by type (isolates, concentrates, textured), application, textured pea protein by form (dry, wet), & by region - global trends & forecast to 2020. <http://www.researchandmarkets.com/research/b8x63n/pea_protein>.
- Gray, J. S., & Montgomery, R. (2003). Purification and characterization of a peroxidase from corn steep water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1592-1601.
- Hadži-Tašković Šukalović, V., Vuletić, M., Marković, K., Cvetic Antić, T., & Vučinić, Ž. (2015). Comparative biochemical characterization of peroxidases (class III) tightly bound to the maize root cell walls and modulation of the enzyme properties as a result of covalent binding. *Protoplasma*, 252(1), 335-343.
- Halaouli, S., Asther, M., Kruus, K., Guo, L., Hamdi, M., Sigoillot, J. C., Asther, M., & Lomascolo, A. (2005). Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 332-343.
- Halliwell, B. (1978). Lignin synthesis: The generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta*, 140(1), 81-88.
- Hamed, R. R., Maharem, T. M., Abel Fatah, M. M., & Ataya, F. S. (1998). Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots. *Phytochemistry*, 48(8), 1291-1294.
- Heck, T., Faccio, G., Richter, M., & Thöny-Meyer, L. (2013). Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 461-475.
- Heijns, W. H., Wierenga, P. A., van Berkel, W. J. H., & Gruppen, H. (2010). Directing the oligomer size distribution of peroxidase-mediated cross-linked bovine alpha-lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5692-5697.
- Heijns, W. H., Dekker, H. L., de Koning, L. J., Wierenga, P. A., Westphal, A. H., de Koster, C. G., Gruppen, H., & van Berkel, W. J. (2011). Identification of the peroxidase-generated intermolecular dityrosine cross-link in bovine alpha-lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 444-449.
- Heijns, W. H., Wierenga, P. A., Janssen, A. E. M., van Berkel, W. J. H., & Gruppen, H. (2010). In-line quantification of peroxidase-catalyzed cross-linking of alpha-lactalbumin in a microreactor. *Chemical Engineering Journal*, 157(1), 189-193.

- Hilhorst, R., Dunnewind, B., Orsel, R., Stegeman, P., Vliet, Gruppen, H., & Schols, H. A. (1999). Baking performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. *Journal of Food Science*, *64*, 808-813.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, *42*(5), 462-468.
- Ho, K.-K. (1999). Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, ArandaChristine 130'. *Plant Physiology and Biochemistry*, *37*(11), 841-848.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Liers, C., & Lundell, T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(3), 871-897.
- Holzappel, C., Shahrokh, P., & Kafkewitz, D. (2010). Polyphenol oxidase activity in the roots of seedlings of Bromus (Poaceae) and other grass genera. *American Journal of Botany*, *97*(7), 1195-1199.
- Isaschar-Ovdat, S., & Fishman, A. (2017). Mechanistic insights into tyrosinase-mediated crosslinking of soy glycinin derived peptides. *Food Chemistry*, *232*, 587-594.
- Isaschar-Ovdat, S., & Fishman, A. (2018). Crosslinking of food proteins mediated by oxidative enzymes – A review. *Trends in Food Science & Technology*, *72*, 134-143.
- Isaschar-Ovdat, S., Rosenberg, M., Lesmes, U., & Fishman, A. (2015). Characterization of oil-in-water emulsions stabilized by tyrosinase-crosslinked soy glycinin. *Food Hydrocolloids*, *43*, 493-500.
- Ito, M., & Oda, K. (2000). An organic solvent resistant tyrosinase from Streptomyces sp. REN-21: purification and characterization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *64*(2), 261-267.
- Jamet, E., Albenne, C., Boudart, G., Irshad, M., Canut, H., & Pont-Lezica, R. (2008). Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics*, *8*(4), 893-908.
- Jiang, Y., & Miles, P. W. (1993). Generation of H₂O₂ during enzymic oxidation of catechin. *Phytochemistry*, *33*(1), 29-34.
- Jukanti, A. (2017). *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants*. Springer Singapore: Springer.
- Juvonen, K. R., Karhunen, L. J., Vuori, E., Lille, M. E., Karhu, T., Jurado-Acosta, A., Laaksonen, D. E., Mykkänen, H. M., Niskanen, L. K., & Poutanen, K. S. (2011). Structure modification of a milk protein-based model food affects postprandial intestinal peptide release and fullness in healthy young men. *British Journal of Nutrition*, *106*(12), 1890-1898.
- Kanteev, M., Goldfeder, M., Chojnacki, M., Adir, N., & Fishman, A. (2013). The mechanism of copper uptake by tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *18*(8), 895-903.

- Katz, E., & Betancourt, A. (1988). Induction of tyrosinase by L-methionine in *Streptomyces antibioticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(12), 1297-1303.
- Kennedy, A. R. (1998). Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 78(3), 167-209.
- Knorr, D., Kohler, G. O., & Betschart, A. A. (1977). Potato protein concentrates: The influence of various methods of recovery upon yield, compositional and functional characteristics *Journal of Food Processing and Preservation*, 1(3), 235-247.
- Köktepe, T., Altın, S., Tohma, H., Gülçin, İ., & Köksal, E. (2017). Purification, characterization and selected inhibition properties of peroxidase from haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Food Properties*, 20(sup2), 1944-1953.
- Komarnytsky, S., Cook, A., & Raskin, I. (2011). Potato protease inhibitors inhibit food intake and increase circulating cholecystokinin levels by a trypsin-dependent mechanism. *International Journal of Obesity*, 35(2), 236-243.
- Kukavica, B. M., Mojovic, M., Vuccinic, Z., Maksimovic, V., Takahama, U., & Jovanovic, S. V. (2009). Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant Cell Physiology*, 50(2), 304-317.
- Kukavica, B. M., Veljović-Jovanović, S. D., Menckhoff, L., & Luthje, S. (2012). Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *Journal of Experimental Botany*, 63(12), 4631-4645.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Laugesen, S., Bak-Jensen, K. S., Häggglund, P., Henriksen, A., Finnie, C., Svensson, B., & Roepstorff, P. (2007). Barley peroxidase isozymes: expression and post-translational modification in mature seeds as identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 268(2-3), 244-253.
- Laveda, F., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., & Sánchez-Ferrer, A. (2000). Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379(1), 1-6.
- Lawton, J. W. (2002). Zein: A history of processing and use. *Cereal Chemistry Journal*, 79(1), 1-18.
- Lerch, K. (1983). Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 52(2), 125-138.
- Lerch, K., & Ettliger, L. (1972). Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *European Journal of Biochemistry*, 31(3), 427-437.
- Liedl, B. E., Kosier, T., & Desborough, S. L. (1987). HPLC isolation and nutritional value of a major tuber protein. *American Potato Journal*, 64(10), 545-557.

- Liener, I. E. (1994). Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(1), 31-67.
- Lige, B., Ma, S., & van Huystee, R. B. (2001). The effects of the site-directed removal of N-glycosylation from cationic peanut peroxidase on its function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 386(1), 17-24.
- Liszkay, A., Kenk, B., & Schopfer, P. (2003). Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217(4), 658-667.
- Liu, Y., Hong, L., Kempf, V. R., Wakamatsu, K., Ito, S., & Simon, J. D. (2004). Ion-exchange and adsorption of Fe (III) by Sepia melanin. *Pigment Cell Research*, 17(3), 262-269.
- Liu, Y., Shi, J., & Langrish, T. (2006). Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering Journal*, 120(3), 203-209.
- Liyanage, R., Han, K.-H., Watanabe, S., Shimada, K.-i., Sekikawa, M., Ohba, K., Tokuji, Y., Ohnishi, M., Shibayama, S., Nakamori, T., & Fukushima, M. (2008). Potato and soy peptide diets modulate lipid metabolism in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(4), 943-950.
- Løkra, S., Helland, M. H., Claussen, I. C., Strætkvern, K. O., & Egelanddal, B. (2008). Chemical characterization and functional properties of a potato protein concentrate prepared by large-scale expanded bed adsorption chromatography. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 1089-1099.
- Løkra, S., Schüller, R. B., Egelanddal, B., Engebretsen, B., & Strætkvern, K. O. (2009). Comparison of composition, enzyme activity and selected functional properties of potato proteins isolated from potato juice with two different expanded bed resins. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 906-913.
- López-Serrano, D., Solano, F., & Sanchez-Amat, A. (2004). Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene*, 342(1), 179-187.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). *Fruit phenolics*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Marinova, K., Pourcel, L., Weder, B., Schwarz, M., Barron, D., Routaboul, J. M., Debeaujon, I., & Klein, M. (2007). The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺ -antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell*, 19(6), 2023-2038.
- Matheis, G., & Whitaker, J. R. (1984). Peroxidase-catalyzed cross linking of proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 3(1), 35-48.

- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., & Sugiyama, M. (2006). Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8981-8990.
- Matsushima, N., Danno, G.-i., Takezawa, H., & Izumi, Y. (1997). Three-dimensional structure of maize α -zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1339(1), 14-22.
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331.
- Mayer, A. M., & Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18(2), 193-215.
- McMahon, A. M., Doyle, E. M., Brooks, S., & O'Connor, K. E. (2007). Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1435-1441.
- Mika, A., Boenisch, M. J., Hopff, D., & Luthje, S. (2010). Membrane-bound guaiacol peroxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors. *Journal of Experimental Botany*, 61(3), 831-841.
- Mika, A., Buck, F., & Luthje, S. (2008). Membrane-bound class III peroxidases: identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *Journal of Proteomics*, 71(4), 412-424.
- Mika, A., & Luthje, S. (2003). Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology*, 132(3), 1489-1498.
- Mohammadi, M., & Kazemi, H. (2002). Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162(4), 491-498.
- Morimoto, S., Tateishi, N., Inuyama, M., Taura, F., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (1999). Identification and molecular characterization of novel peroxidase with structural protein-like properties. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26192-26198.
- Mujer, C. V., Mendoza, E. M. T., & Ramirez, D. A. (1983). Coconut peroxidase isoenzymes: isolation, partial purification and physicochemical properties. *Phytochemistry*, 22(6), 1335-1340.
- Ni, N., & Dumont, M.-J. (2017). Protein-based hydrogels derived from industrial byproducts containing collagen, keratin, zein and soy. *Waste and Biomass Valorization*, 8(2), 285-300.
- Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M. J., & Aubert, S. Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(2), 109-157.

- Nieto, G., Castillo, M., Xiong, Y. L., Alvarez, D., Payne, F. A., & Garrido, M. D. (2009). Antioxidant and emulsifying properties of alcalase-hydrolyzed potato proteins in meat emulsions with different fat concentrations. *Meat Science*, 83(1), 24-30.
- Onsa, G. H., bin Saari, N., Selamat, J., & Bakar, J. (2004). Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chemistry*, 85(3), 365-376.
- Oudgenoeg, G., Hilhorst, R., Piersma, S. R., Boeriu, C. G., Gruppen, H., Hessing, M., Voragen, A. G., & Laane, C. (2001). Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid. *J Agric Food Chem*, 49(5), 2503-2510.
- Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. (2011). Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 168-173.
- Paraman, I., & Lamsal, B. P. (2011). Recovery and characterization of α -zein from corn fermentation coproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3071-3077.
- Partanen, R., Torkkeli, M., Hellman, M., Permi, P., Serimaa, R., Buchert, J., & Mattinen, M.-L. (2011). Loosening of globular structure under alkaline pH affects accessibility of β -lactoglobulin to tyrosinase-induced oxidation and subsequent cross-linking. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2), 131-138.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255-265.
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., & Dunand, C. (2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65(13), 1879-1893.
- Passardi, F., Penel, C., & Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci*, 9(11), 534-540.
- Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C., & Dunand, C. (2006). Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta*, 223(5), 965-974.
- Patel, A. R., Bouwens, E. C. M., & Velikov, K. P. (2010). Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12497-12503.
- Patel, A. R., Heussen, P. C. M., Hazekamp, J., Drost, E., & Velikov, K. P. (2012). Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food Chemistry*, 133(2), 423-429.
- Patel, A. R., & Velikov, K. P. (2014). Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(5), 450-458.

- Pedrosa, C., De Felice, F. G., Trisciuzzi, C., & Ferreira, S. T. (2000). Selective neoglycosylation increases the structural stability of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382(2), 203-210.
- Peng, W., Kong, X., Chen, Y., Zhang, C., Yang, Y., & Hua, Y. (2016). Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. *Food Hydrocolloids*, 52, 301-310.
- Pinto, M. S., Siqueira, F. P., Oliveira, A. E., & Fernandes, K. V. (2008). A wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Phytochemistry*, 69(12), 2297-2302.
- Pots, A. M., Gruppen, H., Hessing, M., van Boekel, M. A. J. S., & Voragen, A. G. J. (1999). Isolation and characterization of patatin isoforms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4587-4592.
- Pouvreau, L., Gruppen, H., Piersma, S. R., van den Broek, L. A. M., van Koningsveld, G. A., & Voragen, A. G. J. (2001). Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2864-2874.
- Pouvreau, L., Gruppen, H., van Koningsveld, G., van den Broek, L. A., & Voragen, A. G. (2005). Conformational stability of the potato serine protease inhibitor group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3191-3196.
- Pouvreau, L., Gruppen, H., van Koningsveld, G. A., van den Broek, L. A. M., & Voragen, A. G. J. (2003). The most abundant protease inhibitor in potato tuber (Cv. Elkana) is a serine protease inhibitor from the Kunitz family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5001-5005.
- Prodpran, T., Benjakul, S., & Phatcharat, S. (2012). Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 774-782.
- Racusen, D., & Weller, D. L. (1984). Molecular-weight of patatin, a major potato-tuber protein. *Journal of Food Biochemistry*, 8(2), 103-107.
- Ralet, M.-C., & Guéguen, J. (2000). Fractionation of potato proteins: solubility, thermal coagulation and emulsifying properties. *LWT - Food Science and Technology*, 33(5), 380-387.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Grabber, J. H., & Steinhart, H. (2004). Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 79-96.
- Regalado, C., Arvizu, O. P., Garcia-Almendarez, B., & Whitaker, J. (1999). Purification and properties of two acid peroxidases from brussels sprouts (*Brassica oleraceae* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 23(4), 435-450.

- Ribotta, P. D., Colombo, A., & Rosell, C. M. (2012). Enzymatic modifications of pea protein and its application in protein–cassava and corn starch gels. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 185-190.
- Ruiz-Duenas, F. J., Camarero, S., Perez-Boada, M., Martinez, M. J., & Martinez, A. T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 116-122.
- Salvachúa, D., Prieto, A., Martínez, Á. T., & Martínez, M. J. (2013). Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4316-4324.
- Sambrook, J. F., & Russell, W. D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)* (3rd ed. ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saricay, Y., Wierenga, P., & de Vries, R. (2013). Nanostructure development during peroxidase catalysed cross-linking of α -lactalbumin. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 280-288.
- Selinheimo, E., Saloheimo, M., Ahola, E., Westerholm-Parvinen, A., Kalkkinen, N., Buchert, J., & Kruus, K. (2006). Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *The FEBS journal*, 273(18), 4322-4335.
- Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V. S., Adir, N., & Fishman, A. (2011). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *Journal of Molecular Biology*, 405(1), 227-237.
- Sendovski, M., Kanteev, M., Shuster Ben-Yosef, V., Adir, N., & Fishman, A. (2010). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(Pt 9), 1101-1103.
- Serradell, M. d. l. A., Rozenfeld, P. A., Martínez, G. A., Civello, P. M., Chaves, A. R., & Añón, M. C. (2000). Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1421-1427.
- Shukla, R., & Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13(3), 171-192.
- Shuster, V., & Fishman, A. (2009). Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 17(4), 188-200.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

- Strauss, G., & Gibson, S. M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 81-89.
- Strong, P. J., & Claus, H. (2011). Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(4), 373-434.
- Šukalović, V. H.-T., Vuletić, M., & Vučinić, Ž. (2003). Plasma membrane-bound phenolic peroxidase of maize roots: in vitro regulation of activity with NADH and ascorbate. *Plant Science*, 165(6), 1429-1435.
- Šukalović, V. H.-T., Vuletić, M., & Vučinić, Ž. (2005). The role of p-coumaric acid in oxidative and peroxidative cycle of the ionically bound peroxidase of the maize root cell wall. *Plant Science*, 168(4), 931-938.
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2011). Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 25-31.
- Sun, Y., Jiang, L., & Wei, D. (2013). Partial characterization, in vitro antioxidant and antiproliferative activities of patatin purified from potato fruit juice. *Food & Function*, 4(10), 1502-1511.
- Takahama, U. (2004). Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 207-219.
- Thalman, C., & Lötzbeyer, T. (2002). Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *European Food Research and Technology*, 214(4), 276-281.
- Tomšovský, M., & Homolka, L. (2004). Tyrosinase activity discovered in *Trametes spp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 529-530.
- Udenigwe, C. C., Udechukwu, M. C., Yiridoe, C., Gibson, A., & Gong, M. (2016). Antioxidant mechanism of potato protein hydrolysates against in vitro oxidation of reduced glutathione. *Journal of Functional Foods*, 20, 195-203.
- Valueva, T. A., Revina, T. A., Kladnitskaya, G. V., & Mosolov, V. V. (1998). Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and Phytophthora-infected potato tubers. *FEBS Letters*, 426(1), 131-134.
- van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., de Jongh, H. H. J., Wijngaards, G., van Boekel, M. A. J. S., Walstra, P., & Voragen, A. G. J. (2001). Effects of pH and heat treatments on the structure and solubility of potato proteins in different preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4889-4897.
- van Koningsveld, G. A., Walstra, P., Voragen, A. G. J., Kuijpers, I. J., Van Boekel, M. A. J. S., & Gruppen, H. (2006). Effects of protein composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6419-6427.

- Vate, N. K., & Benjakul, S. (2016). Effect of the mixtures of squid ink tyrosinase and tannic acid on properties of sardine surimi gel. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 411-420.
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
- Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., & Menckhoff, L. (2018). Class III Peroxidases: Functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In D. K. Gupta, J. M. Palma & F. J. Corpas (Eds.), *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants* (pp. 269-300). Cham: Springer International Publishing.
- Vikelouda, M., & Kiosseoglou, V. (2004). The use of carboxymethylcellulose to recover potato proteins and control their functional properties. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 21-27.
- Welinder, K. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3), 388-393.
- Welinder, K. G., Justesen, A. F., Kjaersgard, I. V., Jensen, R. B., Rasmussen, S. K., Jespersen, H. M., & Duroux, L. (2002). Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, 269(24), 6063-6081.
- Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A., & Chapelon, C. G. (1996). Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, 43(2), 333-337.
- Xu, R., Teng, Z., & Wang, Q. (2016). Development of tyrosinase-aided crosslinking procedure for stabilizing protein nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 60, 324-334.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., & Ikehara, N. (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology*, 115(4), 1405-1412.
- Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.
- Young, S. A., Guo, A., Guikema, J. A., White, F. F., & Leach, J. E. (1995). Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Physiology*, 107(4), 1333-1341.
- Zeeb, B., McClements, D. J., & Weiss, J. (2017). Enzyme-based strategies for structuring foods for improved functionality. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 21-34.
- Zhang, C., Doherty-Kirby, A., van Huystee, R., & Lajoie, G. (2004). Investigation of cationic peanut peroxidase glycans by electrospray ionization mass spectrometry. *Phytochemistry*, 65(11), 1575-1588.
- Zhao, J. (2015). Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in Plant Science*, 20(9), 576-585.

Biografija autora

Jovana Glušac je rođena u Sanskom Mostu, 21. septembra 1981. godine. Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Banjoj Luci, odsjek Biologija upisala je školske 2000/01. godine. Diplomirala je 2007. godine sa prosečnom ocenom 8,4 i ocjenom 10 na diplomskom radu. Magistarske studije je upisala na istom fakultetu 2008/09 i odbranila magistarski rad 24.12.2011. godine.

Od februara 2008. do 2016. godine bila je zaposlena u Visokoj medicinskoj školi u Prijedoru kao asistent i predavač.

Od novembra 2015.godine do danas je na studijskom boravku na Department of Biotechnology and Food Engineering, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.

Učestvovala je na kraćem studijskom boravku na Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR (Milano, Italija) u cilju realizacije projekta bilateralne saradnje, 2017.godine, kao i na Department of Experimental Physiology, Medical University of Lodz (Poljska) 2011. godine.

Objavila je nekoliko naučnih radova u međunarodnim časopisima.

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
 FAKULTET: PRIRODNO-MATEMATIČKI



РЕПУБЛИКА СРПСКА
 УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
 Природно-математички факултет
 Број: 19-3629/18
 Датум: 13. 11. 2018. год.
 БАЊА ЛУКА

IZVJEŠTAJ
o ocjeni urađene doktorske disertacije

I PODACI O KOMISIJI

1) Nastavno-naučno vijeće Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci je na sjedinici održanoj 24.10.2018. godine donijelo Odluku broj 19/3.3419/18 kojom je imenovalo Komisiju za pregled, ocjenu i odbranu urađene doktorske disertacije. Komisija je trebala da napiše Izvještaj o ocjeni urađene doktorske disertacije "Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama", kandidatkinje mr Jovane Glušac

2) Komisija:

- dr Zoran Kukrić redovni profesor, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, Tehnološki fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, predsjednik
- dr Siniša Škondrić, docent, uža naučna oblast: Biljne nauke, botanika, Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, član
- dr Biljana Kukavica, vanredni profesor, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, mentor-član

1) Navesti datum i organ koji je imenovao komisiju;

2) Navesti sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, naučno-nastavnog zvanja, naziva uže naučne oblasti za koju je izabran u zvanje i naziva univerziteta/fakulteta/instituta na kojem je član komisije zaposlen.

II PODACI O KANDIDATU

1) Jovana, Rodoljub, Glušac

2) 21.09.1981. godine, Sanski Most, Bosna i Hercegovina

3) Univerzitet u Banjoj Luci, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program Biologija, magistar bioloških nauka

4) Prirodno-matematički fakultet, „Promjene u antioksidativnom metabolizmu lista čuvarakuće (*Sempervivum tectorum* L.) indukovane teškim metalima i sušom“, Biološke nauke, 24.12.2011. godine

5) Biološke nauke

6) Postupak za sticanje naučnog stepena doktora nauka započet je 2015. godine, prema odredbama člana 148. Zakona o visokom obrazovanju, Studijski program: Biologija

1) Ime, ime jednog roditelja, prezime;

- 2) Datum rođenja, opština, država;
- 3) Naziv univerziteta i fakulteta i naziv studijskog programa akademskih studija II ciklusa, odnosno posljediplomskih magistarskih studija i stečeno stručno/naučno zvanje;
- 4) Fakultet, naziv magistarske teze, naučna oblast i datum odbrane magistarskog rada;
- 5) Naučna oblast iz koje je stečeno naučno zvanje magistra nauka/akademsko zvanje mastera;
- 6) Godina upisa na doktorske studije i naziv studijskog programa.

III UVODNI DIO OCJENE DOKTORSKE DISERTACIJE

- 1) „Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama”
- 2) 16.07.2015. Senat Univerziteta u Banjoj Luci (Odluka broj: 02/04-3.2305-88/15)
- 3) Poglavlje „UVOD” je napisano na dvije stranice (str. 1 i 2) i sadrži kratak osvrt, te definicije i opise osnovnih karakteristika oksidoreduktaznih enzima peroksidaza i tirozinaza, mehanizme umrežavanje proteina koji su katalizovani peroksidazama i tirozinazama, te doprinos i značaj ovakvih istraživanja u cilju dobijanja boljeg uvida u protein-protein interakcije, kao i kreiranje novih životno važnih proizvoda u oblasti biohemije i biotehnologije koji su predmet istraživanja doktorske disertacije. Poglavlje „CILJ ISTRAŽIVANJA” je napisan na jednoj stranici (str. 3) i sadrži jasno formulisane ciljeve istraživanja. Kandidatkinja je u poglavlju „PREGLED LITERATURE” (13 stranica; str. 4-16), koje sadrži šest potpoglavlja, sažeto i jasno opisala biohemijske karakteristike (strukturu, lokalizaciju u ćeliji, specifičnost za supstrate i druge važne karakteristike) oksidoreduktaza: peroksidaza (str. 4-6) i tirozinaza (str. 7-8), te tirozinaza iz *Bacillus megaterium* (str. 8-9). Predstavljen je literaturni pregled o umrežavanju proteina (str. 10-11), te umrežavanju proteina koje je katalizovano peroksidazama i tirozinazama (str. 11-15). Opisani su model proteini koji su odabrani za umrežavanje katalizovano peroksidazama i tirozinazama (str. 15-17). Poglavlje „MATERIJAL I METODE RADA” (20 stranica; str. 17-36) sadrži dva potpoglavlja „Materijal” i „Metode”. Potpoglavlje „Materijal” ima šest manjih potpoglavlja gdje su navedene sve korištene hemikalije (str. 17), uslovi gajenja biljaka (str. 17), bakterijski soj i vektor (str. 18), antibiotici (str. 18), medijumi za rast (str. 18-19), priprema pufera i rastvora (str. 19-23). Potpoglavlje „Metode” ima deset manjih potpoglavlja gdje su opisane sve metode koje su korištene u radu. Opisan je proces prečišćavanja peroksidaza i tirozinaza iz korijena pasulja i kukuruza (str. 24-26). Detaljno su opisane metode za karakterizaciju izolovanih peroksidaza i tirozinaza iz biljnog materijala (str. 27-30), kao što su određivanje koncentracije proteina (str. 31-32), aktivnosti enzima, enzimska kinetika, suspratne specifičnosti, te maseno spektroskopske (LC-MS/MS) analize peroksidaznih i tirozinaznih ekstrakta (str. 32-33). Dat je opis metoda za razdvajanje (nativna elektroforeza) i detektovanje izoformi enzima: peroksidaze i tirozinaze (str. 29-30), kao i metoda za SDS-PAGE elektroforezu (str. 32). Opisani su procesi prečišćavanja i izolovanja model proteina: krompira i kukuruza (zein) (str. 33-34). Detaljno su opisane metode ispitivanja sposobnosti prečišćenih enzima iz korijena kukuruza i pasulja u umrežavanju proteina krompira (str. 34-35). Opisan je postupak dobijanja rekombinantnog enzima tirozinaze iz *Bacillus megaterium* (str. 30-31). Takođe, opisane su metode za ispitivanje sposobnosti rekombinantnog enzima da umrežava model proteine krompira, kukuruza (zein) i graška (str. 35-36). Posljednje potpoglavlje u poglavlju „Materijal i metode rada” opisuje program korišten za statističku obradu dobijenih rezultata. Poglavlje „REZULTATI I DISKUSIJA” (48 stranica; str. 37-84) sadrži pregled dobijenih rezultata koji su predstavljeni tabelarno, grafički i kao slike gelova. Poglavlje ima dva potpoglavlja: „Izolacija i karakterizacija enzima” i „Enzimatski katalizovano umrežavanje model proteina”. U okviru prvog potpoglavlja dati su rezultati izolacije i karakterizacije

peroksidaza i tirozinaza iz korijena kukuruza i pasulja (str. 37-39), rezultati proteomiks analize (LC-MS/MS) enzimskih ekstrakta (str. 39-45), rezultati enzimske kinetike i supstratne specifičnosti enzima (str. 50-57), kao i slike gelova sa razdvojenim enzimskim izoformama (str. 45-49). Predstavljani su rezultati prečišćavanja tirozinaze iz *Bacillus megaterium* (str. 58-59). U drugom potpoglavlju predstavljani su rezultati izolacije model proteina: proteina krompira (str. 60-62), proteina kukuruza (zein) (str. 77-78) i opisani su komercijalni koncentracije proteina graška (str. 81-82). Određene su koncentracije proteina i prikazani su proteinski profili na gelovima. Prikazani su rezultati umrežavanja proteina krompira sa peroksidazama iz korijena kukuruza i pasulja, kao i rezultati umrežavanja dobijeni kada je korištena komercijalna peroksidaza iz hrena (str. 62-71). Prikazani su rezultati umrežavanja proteina krompira (str. 71-76), zeina (str. 78-80) i proteina graška (str. 82-84) sa tirozinazom iz *Bacillus megaterium*. Rezultati umrežavanja su prikazani kao gelovi i upoređeni sa literaturnim podacima. Svi dobijeni rezultati su upoređeni sa relevantnim literaturnim podacima.

Poglavlje „ZAKLJUČAK” (tri stranice; str. 85-87) sadrži pravilno i sistemski navedene zaključke ovog istraživanja, uz jasno navođenje njihovog teorijskog i praktičnog značaja za ispitivanu oblast.

Poglavlje „LITERATURA” (13 stranica; str. 88-100) sadrži 168 abecedno navedenih korištenih referenci.

U numeraciju nisu uključeni „Rezime” i „Summary”, dati na početku rada, poslije naslovnih strana na srpskom i engleskom jeziku, koji adekvatno predstavljaju proširen sažetak ove doktorske disertacije na srpskom i engleskom jeziku.

Takođe, bez uključivanja u numeraciju slijede „Zahvalnica” i „Sadržaj”, prije poglavlja „UVOD”, kao i „Biografija autora” i tri „Izjave” koje su na kraju rada poslije poglavlja „LITERATURA”.

4) Disertacija sadrži 100 numerisanih stranica računarski obrađenog teksta, 7 tabela i 46 slika. Citirane su 168 reference. Disertacija obuhvata sedam poglavlja: Uvod, Cilj istraživanja, Pregled literature, Materijal i metode rada, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura.

1) Naslov doktorske disertacije;

2) Vrijeme i organ koji je prihvatio temu doktorske disertacije

3) Sadržaj doktorske disertacije sa straničenjem;

4) Istaći osnovne podatke o doktorskoj disertaciji: obim, broj tabela, slika, šema, grafikona, broj citirane literature i navesti poglavljia.

IV UVOD I PREGLED LITERATURE

1) Primjena peroksidaza i tirozinaza u različitim biohemijskim i biotehnološkim procesima otvara potrebe za njihovim intenzivnim izučavanjem, kao i traženje novih izvora ovih enzima u živom svijetu. Stoga, prvi cilj je usmjeren ka djelimičnom prečišćavanju i biohemijskoj karakterizaciji enzima peroksidaza i tirozinaza u korijenu kukuruza (*Zea mays* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.). Upravo primjena peroksidaza i tirozinaza će zavistiti od poznavanja strukturnih i biohemijskih karakteristika ovih enzima. Umrežavanje (eng. *cross-linking*) jeste stvaranje jonske ili kovalentne veze između dva polimerna lanca. U biološkom kontekstu, umrežavanje predstavlja reakciju u kojoj se dvije molekule spajaju, a njihova interakcija predstavlja težište istraživanja. Umrežavanje proteina se može postići korištenjem različitih enzima i obično se ostvaruje preko određenih amino kiselina u proteinima (glutamina, lizina, tirozina i cisteina) ili ugljenih hidrata. Poznato je da globularni proteini teško podliježu enzimski katalizovanom umrežavanju. Drugi cilj istraživanja je usmjeren ka određivanju sposobnosti enzima peroksidaza (POX, EC 1.11.1.7) iz biljnog tkiva i tirozinaza (EC 1.14.18.1) iz *Bacillus megaterium* (TyrBm) za *cross-linking* odabranih model proteina: proteina krompira,

hidrofobnog proteina kukuruza (zeina) i proteina graška.

2) Umrežavanje proteina se definiše kao "proces povezivanja proteinskih molekula kroz inter- ili intramolekulske kovalentne veze" (Heck i sar., 2013). Dok se hemijski reagensi, kao što su glutaraldehid ili formaldehid, često koriste za dobijanje kovalentnih veza između proteinskih lanaca, povezivanje posredstvom enzima predstavlja poželjnu alternativu. Velika motivacija za istraživanje i upotrebu enzimskog umrežavanja proistekla je iz brojnih važnih pitanja. Enzimatski proces je obično sigurniji i ima manji uticaj na životnu sredinu u poređenju sa hemijskim procesom, omogućava upotrebu blagih vodenih reakcionih uslova i omogućava smanjenje troškova rada. Takođe enzimski katalizovano umreženje može da se reguliše. Postoje različiti enzimi koji mogu generisati kovalentno umrežavanje proteina i stoga se koriste za različite aplikacije. Ovi enzimi se međusobno razlikuju u smislu reakcionog mehanizma i aminokiselinskih ostataka sa kojima reaguju (Gerrard i sar., 2005; Strong i Claus, 2011; Zeeb i sar., 2017). Najpoznatiji predstavnik peroksidaza Klase III je hren peroksidaza (HRP) (EC 1.11.1.7) koja je najviše korištena u ispitivanju procesa umrežavanja. HRP karakteriše nizak redoks potencijal i sposobnost da katalizuje oksidaciju tirozinskih ostataka u proteinu. Nastali radikali tirozina mogu da indukuju konjugaciju (izo)di-tirozina, posljedica čega je formiranje intramolekularne kovalentne veze (Veitch, 2004; Heijnis i sar., 2011). Pokazano je da peroksidaze mogu da umreže protein gluten i stvaraju kovalentne konjugate između glutena ili β -kazeina i arabinoksilana, odnosno da se arabinoksilani vezuju preko ferulične kiseline za gluten preko ostataka lizina, tirozina ili cisteina (Hilhorst i sar., 1999; Boeriu i sar., 2004). Takođe je pokazano da peroksidaze mogu da umreže proteine kazeina, apo- α -laktoalbumina (Saricay i sar., 2013) i da utiču na parcijalno umrežavanje proteina surutke (Færgemand i sar., 1998; Thalmann i Lötzbeyer, 2002). Različiti parametri kao što je količina dodatog HRP-a, jonska jačina, te koncentracija proteina, mogu kontrolisati oligomerizaciju (Dhayal i sar., 2014). Istraživanja mehanizama umrežavanja su pokazala da peroksidazna reakcija sa α -laktalbuminom dovodi do formiranja di-tirozina, ali i formiranja oligo-tirozina (Dhayal i sar., 2015).

Tirozinaze su korištene za umrežavanje uglavnom u prisustvu posrednika male molekulske mase (fenoli) kao medijatora za umrežavanje (Isaschar-Ovdat i Fishman, 2017, 2018). Kada je fenol prisutan u reakcionoj smješi, on posredstvom enzima prelazi u reaktivni hinon koji dalje reaguje sa drugim reaktivnim grupama u proteinskom lancu kao što su ostaci hidroksila, sulfhidrila ili amina (Buchert i sar., 2010). Bez dodavanja fenolnog medijatora, umrežavanje će se odvijati preko ostataka tirozina i stepen umrežavanja će zavistiti od dostupnosti ostataka tirozina aktivnom mjestu enzima (Zeeb i sar., 2017; Isaschar-Ovdat i Fishman, 2017, 2018). Pokazano je da je mješavina tirozinaze i fenola postigla bolji efekat umrežavanja i stabilizaciju nanočestica natrijum-kazeinata, nego kada je primjenjen glutaraldehid (Xu i sar., 2016). Proteini sa višim nivoima organizacije (tercijarnom i kvarternom) teško mogu biti umreženi bez dodavanje molekula male molekulske mase, fenolnih medijatora (Isaschar-Ovdat i Fishman, 2017, 2018).

Literatura citirana u doktorskoj disertaciji a navedena u ovom dijelu izvještaja: Boeriu, C. G., Bravo, D., Gosselink, R. J. A., & van Dam, J. E. G. (2004). Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 20(2), 205-218. Buchert, J., Ercili Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., Mattinen, M., Boer, H., Partanen, R., Selinheimo, E., Lantto, R., & Kruus, K. (2010). Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annu Rev Food Sci Technol*, 1, 113-138. Dhayal, S. K., Gruppen, H., de Vries, R., & Wierenga, P. A. (2014). Controlled formation of protein nanoparticles by enzymatic cross-linking of alpha-lactalbumin with horseradish peroxidase. *Food Hydrocolloids*, 36, 53-59. Dhayal, S. K., Sforza, S., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2015). Peroxidase induced oligo-tyrosine cross-links during polymerization of alpha-lactalbumin. *Biochim Biophys Acta*, 12(10), 15. Færgemand, M., Otte, J., & Qvist, K. B. (1998). Cross-Linking of whey proteins by enzymatic oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1326-1333. Gerrard, J. A., Meade, S. J., Miller, A. G., Brown, P. K., Yasir, S. B., Sutton, K. H., & Newberry, M. P. (2005). Protein cross-linking in food. *Ann NY Acad Sci*, 012. Heck, T., Faccio, G., Richter, M., & Thöny-Meyer, L. (2013). Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and*

Biotechnology, 97(2), 461-475. Heijnis, W. H., Dekker, H. L., de Koning, L. J., Wierenga, P. A., Westphal, A. H., de Koster, C. G., Gruppen, H., & van Berkel, W. J. (2011). Identification of the peroxidase-generated intermolecular dityrosine cross-link in bovine alpha-lactalbumin. *J Agric Food Chem*, 59(1), 444-449. Hilhorst, R., Dunnewind, B., Orsel, R., Stegeman, P., Vliet, Gruppen, H., & Schols, H. A. (1999). Baking Performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. *Journal of Food Science*, 64: 808-813. Isaschar-Ovdat, S., & Fishman, A. (2017). Mechanistic insights into tyrosinase-mediated crosslinking of soy glycinin derived peptides. *Food Chemistry*, 232, 587-594. Isaschar-Ovdat, S., & Fishman, A. (2018). Crosslinking of food proteins mediated by oxidative enzymes – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 134-143. Saricay, Y., Wierenga, P., & de Vries, R. (2013). Nanostructure development during peroxidase catalysed cross-linking of α -lactalbumin. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 280-288. Strong, P. J., & Claus, H. (2011). Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(4), 373-434. Thalmann, C., & Lötzbeyer, T. (2002). Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *European Food Research and Technology*, 214(4), 276-281. Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259. Xu, R., Teng, Z., & Wang, Q. (2016). Development of tyrosinase-aided crosslinking procedure for stabilizing protein nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 60, 324-334. Zeeb, B., McClements, D. J., & Weiss, J. (2017). Enzyme-based strategies for structuring foods for improved functionality. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 21-34.

3) Prečišćene su peroksidaze iz korijena pasulja i kukuruza i po prvi put su istražene sposobnosti solubilnih i jonskih peroksidaza da umrežavaju proteine krompira. Takođe, su po prvi put istražene sposobnosti rekombinantne tirozinaze iz *Bacillus megaterium* u umrežavanju proteina krompira, hidrofobnog proteina kukuruza (zein) i proteina graška. Stoga, doprinos ove disertacije ogleda se u razjašnjavanju mehanizama umrežavanja proteina katalizovano sa peroksidazama i tirozinazama.

4) Očekivani naučni doprinos ove disertacije se odnosi na saznanja o biohemijskim karakteristikama enzima iz odabranih biljnih vrsta što bi dalje pružilo neophodne informacije u oblasti bazničnih nauka i pomoglo u unaprijeđenju kreiranja novih životno važnih proizvoda u oblastima biohemije i biotehnologije. Takođe, očekivani naučni doprinos se ogleda i u procesima izučavanja protein-protein interakcija kroz enzimski katalizovana umrežavanja proteina, sa ciljem dobijanja što kvalitetnijih podataka o strukturi i funkciji proteina, kao i mehanizmima umrežavanja globularnih proteina.

1) Ukratko istaći razlog zbog kojih su istraživanja preduzeta i predstaviti problem, predmet, ciljeve i hipoteze;

2) Na osnovu pregleda literature sažeto prikazati rezultate prethodnih istraživanja u vezi problema koji je istraživan (voditi računa da obuhvata najnovija i najznačajnija saznanja iz te oblasti kod nas i u svijetu);

3) Navesti doprinos teze u rješavanju izučavanog predmeta istraživanja;

4) Navesti očekivane naučne i pragmatične doprinose disertacije.

V MATERIJAL I METODE RADA

1) Imajući u vidu postavljene ciljeve rada primjenom odgovarajućih eksperimentalnih metoda kandidatkinja je djelimično prečistila i biohemijski okarakterisala dvije frakcije peroksidaza Klase III (POX, EC 1.11.1.7), solubilne i jonski vezane za ćelijski zid iz korijena kukuruza (*Zea mays* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.). Određeni su kinetički parametri (K_m) i specifičnost za supstrate, hidrokisicinične kiseline (*p*-kumaričnu, hlorogenu i kafeičnu kiselinu) djelimično prečišćenih peroksidaza. Približne molekulske mase peroksidaza u njihovoj tercijarnoj (nativnoj) strukturi utvrđene su modifikovanom SDS elektroforezom. Za razdvajanje POX izoformi korištena je nativna elektroforeza. Dužina aminokiselinske sekvence, pI (izoelektrične tačke) i ostale biohemijske osobine solubilnih peroksidaza iz kukuruza i pasulja detektovane su masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Osnovni kriterijumi su bili usmjereni ka djemičnom prečišćavanju peroksidaza i tirozinaza i ispitivanju sposobnosti umrežavanja proteina, posebno globularnih proteina. Određena je sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla, kao što su proteini krompira sa djelimično prečišćenim frakcijama solubilnih i jonski vezanih peroksidaza kukuruza i pasulja. Dinamika i stepen umrežavanja su praćeni SDS-PAGE

analizom. Polifenoloksidaza ili tirozinaze (EC 1.14.18.1) iz korijena kukuruza i pasulja su takođe djelimično prečišćene i okarakterisane. Za umrežavanje proteina korištena je rekombinantna tirozinaza bakterijskog porijekla, izolovana iz *Bacillus megaterium* (TyrBm). Ispitana je sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla, već spomenutog proteina krompira, ali i proteina graška i hidrofobnog proteina zeina, izolovanog iz kukuruza sa TyrBm. Za potebe ove disertacije proteini krompira i kukuruza su prečišćeni u laboratoriji i korišteni u daljem radu, dok su kao proteini graška korišteni oni koji su komercijalno dostupni. Svi dobijeni rezultati obrađeni pomoću programa SigmaPlot 11.0. (SigmaPlot 11.0, Systat Software, Inc. USA), Microsoft Office Excell 2007, Image Master Total Lab TL 120 (Nonlinear Dynamics Ltd., Durham, USA) i predstavljeni tabelarno, grafički i kao slike gelova sa razdvojenim izoformama peroksidaza i tirozinaza.

2) Primijenjene metode istraživanja su adekvatne, dovoljno tačne i savremene ako se uzmu u obzir dostignuća u ovom polju istraživanja na globalnom nivou. Ispoštovan je plan istraživanja, koji je dat prilikom prijave doktorske teze. Ispitivani parametri daju dovoljno elemenata za pouzdano istraživanje, a statistička obrada podataka je adekvatna.

1) Objasniti materijal koji je obrađivan, kriterijume koji su uzeti u obzir za izbor materijala;

2) Dati kratak uvid u primijenjeni metod istraživanja pri čemu je važno ocijeniti sljedeće:

1. Da li su primijenjene metode istraživanja adekvatne, dovoljno tačne i savremene, imajući u vidu dostignuća na tom polju u svjetskim nivoima;

2. Da li je došlo do promjene u odnosu na plan istraživanja koji je dat prilikom prijave doktorske teze, ako jeste zašto;

3. Da li ispitivani parametri daju dovoljno elemenata ili je trebalo ispitivati još neke, za pouzdano istraživanje;

4. Da li je statistička obrada podataka adekvatna.

VI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

1) Peroksidaze klase III (POX, EC 1.11.1.7), solubilne i jonski vezane za ćelijski zid iz korijena kukuruza (*Zea mays* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) djelimično su prečišćene i biohemijски okarakterisane. Rezultati masene spektrometrije pokazali su prisustvo 18 solubilnih POX u korijenu kukuruza sa molekulskim masama u opsegu od 33,1-38,7 kDa i sa pI vrijednostima u opsegu od 6,06-8,90. Kod pasulja je detektovano 5 POX sa molekulskim masama od 35,2-38 kDa i sa pI vrijednostima u opsegu od 5,08-8,75. Dužina aminokiselinske sekvence solubilnih peroksidaza kukuruza dobijena LC-MS/MS bila je od 320-367 aminokiselina, dok je za solubilne peroksidaze pasulja dužina lanca bila u opsegu od 329-348, što je uobičajena dužina polipeptidnih lanaca Klase III sekretornih peroksidaza. Nativnom elektroforezom detektovano je pet peroksidaznih izoformi u solubilnoj proteinskoj frakciji korijena pasulja i tri peroksidazne izoforme u jonski vezanoj frakciji za ćelijski zid pasulja. U solubilnoj proteinskoj frakciji korijena kukuruza detektovano je osam POX izoformi, a u frakciji vezanoj za ćelijski zid četiri POX izofome. Prema vrijednostima K_m , sve peroksidaze su pokazale niži afinitet za pirogalol, nego za H_2O_2 , naročito frakcije POX izolovane iz pasulja. Kada je H_2O_2 korišten kao supstrat, vrijednosti K_m se nisu razlikovale između solubilnih i jonskih POX, za obje biljke. Najveća supstratna specifičnost izmjerena je sa kafeičnom kiselinom i za solubilne i za jonske peroksidaze, pasulja i kukuruza.

Drugi cilj ove disertacije bio je ispitati sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla, kao što su proteini krompira, sa solubilnim i jonskim peroksidazama kukuruza i pasulja. Umrežavanje je bilo moguće u prisustvu solubilnih peroksidaza, kukuruza i pasulja, sa dodatkom i bez dodatka H_2O_2 . Pokazano je da su fenolna jedinjenja iz ekstrakta peroksidaza kukuruza i pasulja poslužila kao medijator u reakciji umrežavanja proteina krompira. Jonski vezane peroksidaze za ćelijski zid pokazale su slabiju sposobnost umrežavanja proteina krompira. Polifenoloksidaza ili tirozinaze (EC 1.14.18.1) iz korijenja kukuruza i pasulja su takođe djelimično prečišćene i okarakterisane. LC-MS/MS analiza je

pokazala odsustvo tirozinaza iz solubilnog proteinskog ekstrakta korijena pasulja, dok su u solubilnom proteinskom ekstraktu korijena kukuruza detektovane dvije polifenoloksidaze sa niskom stepenom sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci. Ispitana je sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla sa rekombinantnom tirozinazom bakterijskog porijekla, izolovanom iz *Bacillus megaterium* (TyrBm). Za razliku od djelimično prečišćenih peroksidaza, TyrBm nije umrežio patatin, dok su proteini krompira manje molekulske mase bili umreženi i predstavljaju dobre supstrate za TyrBm. TyrBm je pokazao dobru sposobnost umrežavanja hidrofobnog proteina kukuruza (zeina) u alkalnoj sredini, što je posljedica velikog broja tirozinskih ostataka u zeinu i dobre dostupnosti ostataka aktivnom centru tirozinaze. Proteini graška bili su umreženi sa TyrBm, posebno proteinske frakcije vicilina i konvicilina, kao i frakcije sa malim molekulskim masama. Iako proteini graška imaju manje tirozinskih rezidua, bili su bolji supstrati za TyrBm u odnosu na proteine krompira.

2) Dobijeni rezultati su jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, poređeni sa rezultatima drugih autora, uz kritički pristup od strane kandidatkinje.

3) Osim prečišćavanja i izolovanja peroksidaza i tirozinaza iz korijena kukuruza i pasulja, došlo se do novih saznanja u biohemijskoj karakterizaciji navedenih enzima. Teorijski doprinos sprovedenih istraživanja ogleda se u činjenici da se po prvi put pokazalo da je globularni protein, kao što je patatin umrežen sa peroksidazama iz kukuruza i pasulja, dok je umrežavanje sa tirozinazom iz *Bacillus megaterium* izostalo, što zapravo ukazuje na drugačiji mehanizam umrežavanja proteina sa dva različita oksidoreduktazna enzima. Uprkos činjenici da patatin ima 16 tirozinskih ostataka, većina tirozinskih ostataka je smještena u unutrašnju strukturu proteina, te je umrežavanje sa tirozinazom bilo otežano, dok su peroksidaze umrežile protein. Važno je napomenuti da peroksidaze u prisustvu fenolnih medijatora mogu da umrežavaju proteine i preko lizinskih i cisteinskih ostataka, a s obzirom da patatin ima 20 lizinskih ostataka, intenzivno umrežavanje patatina moglo je nastati i preko lizina, a ne samo tirozina. Stoga, na osnovu dobijenih rezultata, predložena su dva mehanizma za umrežavanje patatina sa solubilnim peroksidazama iz korijena pasulja i kukuruza u odsustvu fenolnog medijatora i u prisustvu fenolnog medijatora. Mehanizam umrežavanja patatina u odsustvu fenolnog medijatora vjerovatno se vrši preko hidroksilacije tirozinskih ostataka u reaktivne hinonske oblike i na taj način se stvara reaktivna grupa za reakciju umrežavanja proteina krompira. U prisustvu fenolnog medijatora, mehanizam umrežavanja patatina se vjerovatno dešava preko oksidovanog fenolnog molekula i aaminskog ostatka u patatinu.

U slučaju rekombinantne tirozinaze (TyrBm), čak je i hidrofobni protein - zein umrežen, kao i proteini graška što može znatno uticati na strukturne osobine proteina i na taj način proširiti njihovu aplikaciju. Praktični doprinos ovih istraživanja ogleda se u mogućnosti korištenja dobijenih rezultata za unaprijeđenje i kreiranje novih proizvoda u različitim sferama života. Postoje različiti mehanizmi pomoću kojih se stvaraju umrežavanja što zavisi od aminokiselinske sekvence, okolnih uslova kao i od strukture proteina. Efekat tih umrežavanja je složen i može se balansirati i kontrolisati kako bi se dobili željeni kvaliteti. Ukratko, ova studija je istakla nove mogućnosti i potencijal u korišćenju peroksidaza i rekombinantne tirozinaze kao biotehnoške pomoći u umrežavanju proteina i predstavlja zamjenu za nepoželjne hemijske reagense u umrežavanju proteina, kao što su glutaraldehid ili formaldehid. Enzimski katalizovano umrežavanje globularnih proteina omogućava i dodatni uvid u protein-protein interakciju, stoga dobijeni rezultati mogu biti korisni kako za prečišćavanje peroksidaza iz korijena kukuruza i pasulja, tako i za aplikacije u modifikaciji biofizičke strukture proteina, putem reakcija enzimski katalizovanog umrežavanja i mogu naći dalju primjenu u oblastima biohemije, prehrambenog inženjerstva i biotehnologije. Ova doktorska disertacija je dobar primjer da fundamentalna istraživanja mogu da doprinesu razvoju novih praktično primjenjenih proizvoda.

1) Ukratko navesti rezultate do kojih je kandidat došao;

- 2) Ocjeniti da li su dobijeni rezultati jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, upoređujući sa rezultatima drugih autora i da li je kandidat pri tome ispoljavao dovoljno kritičnosti;
- 3) Posebno je važno istaći do kojih novih saznanja se došlo u istraživanju, koji je njihov teorijski i praktični doprinos, kao i koji novi istraživački zadaci se na osnovu njih mogu utvrditi ili nazirati.

VII ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG

1) Naučna vrijednost ove doktorske disertacije se ogleda u njenom doprinosu u razvoju naučne oblasti Bioloških nauka, što dokazuju i četiri naučna rada sa prvim autorstvom proizišla iz aktivnosti na izradi ove doktorske disertacije, a publikovana u naučnim časopisima koji su indeksirani u renomiranim citatnim bazama (SCI) za navedenu naučnu oblast sa impakt faktorom.

2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije Komisija predlaže da se doktorska disertacija pod nazivom "Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama", prihvati, a kandidatkinji mr Jovani Glušac odobri odbrana.

1) Navesti najznačajnije činjenice što tezi daje naučnu vrijednost, ako iste postoje dati pozitivnu vrijednost samoj tezi;

2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije komisija predlaže:

- da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana,
- da se doktorska disertacija vraća kandidatu na doradu (da se dopuni ili izmijeni) ili
- da se doktorska disertacija odbija.

POTPIS ČLANOVA KOMISIJE

Datum: 13.11.2018

1. Zoran Kukrić
 dr Zoran Kukrić redovni profesor, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, predsjednik

2. Siniša Škondrić
 dr Siniša Škondrić, docent, uža naučna oblast: Biljne nauke, botanika, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, član

3. Biljana Kukavica
 dr Biljana Kukavica, vanredni profesor, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, mentor-član

IZDVOJENO MIŠLJENJE: Član komisije koji ne želi da potpiše izvještaj jer se ne slaže sa mišljenjem većine članova komisije, dužan je da unese u izvještaj obrazloženje, odnosno razlog zbog kojih ne želi da potpiše izvještaj.

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

**Izjavljujem
da je doktorska disertacija**

Naslov rada Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama

Naslov rada na engleskom jeziku Biochemical characterization of corn and bean peroxidase and tyrosinase and mechanism of protein cross-linking

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci 12.12.2018. godine

Potpis doktoranta

Jovana Glušac

Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

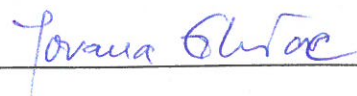
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (*Creative Commons*) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Banjoj Luci 12.12.2018. godine

Potpis doktoranta



Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora Jovana Glušac

Naslov rada Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama

Mentori dr Biljana Kukavica, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet Bosne i Hercegovine; dr Ayelet Fishman, redovni profesor, Department of Biotechnology & Food Engineering, Technion-Israel Institute of Technology Haifa, Israel

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predala za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, dana 12.12.2018. godine

Potpis doktoranta

