

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Georg Nero

**Meetod tsellulaaside aktiivsuse määramiseks amperomeetriliselt  
ning selle kasutamine immobiliseeritud tsellulaasi aktiivsuse  
määramiseks**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendajad: Toonika Rincken, PhD

Sana Ben Othman, PhD

Tartu 2021

# Infoleht

## **Meetod tsellulaaside aktiivsuse määramiseks amperomeetriliselt ning selle kasutamine immobiliseeritud tsellulaasi aktiivsuse määramiseks**

Antud töös töötati välja meetod tsellulaasse aktiivsuse amperomeetriliseks määramiseks, mis sobib nii solubiliseeritud kui ka tahkele kandjale immobiliseeritud tsellulaaside aktiivsuse määramiseks. Meetodi määramispiiriks on 14 mCU/ml, kusjuures meetodi tingimusi varieerides saab mõõtmispiirkonda muuta vastavalt analüüsi eesmärkidele. Väljapakutud meetodit kasutati nailon-6,6 niidile immobiliseeritud tsellulaasi preparaadi aktiivsuse määramiseks.

**Märksõnad:** Tsellulaasid, tsellulaaside aktiivsuse amperomeetriline määramine, ensüümi immobiliseerimine.

## **Method for determining cellulase activity amperometrically and using it to measure the activity of immobilized cellulases**

In this work a method for the amperometric determination of cellulase activity was developed. The method is suitable for measuring the activity of both immobilized and soluble cellulases. The limit of detection was found to be 14 mCU/ml. Furthermore, the detection range can be modified according to the aim of analyses by altering the experimental parameters. The method was used for the determination of the activity of cellulase immobilized on nylon-6,6 threads.

**Keywords:** Cellulase, Cellulase activity, amperometrical assay, enzyme immobilization

# SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. Tselluloos ja selle leidumine.....	7
1.2. Tsellulaasid .....	8
1.2.1. Tsellulaaside immobiliseerimine tahkele kandjale .....	10
1.3. Tsellulaaside aktiivsuse määramine.....	11
1.3.1. Tsellulaaside aktiivsuse optiline määramine.....	11
1.3.2. Tsellulaaside aktiivsuse viskosimeetiline määramine .....	13
1.3.3. Tsellulaaside aktiivsuse määramine redutseeruvate sahhariidide sisalduse kaudu.....	13
1.3.4. Tsellulaaside aktiivsuse elektrokeemiline määramine.....	15
1.4. Tsellulaaside kasutamine tööstuses.....	16
1.4.1. Tsellulaasid mahlatööstuses.....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	18
2.1. Kasutatud seadmed .....	18
2.2. Kasutatud reaktiivid ja materjalid.....	18
2.3. Meetodikad .....	19
2.3.1. Tsellulaasse aktiivsuse määramine .....	19
2.3.2. Mõõtmistingimuste planeerimine vastavusfunktsioonide meetodi abil.....	20
2.3.3. Tsellulaasi immobiliseerimine nailon-6,6 kandjale .....	20
2.3.4. Immobiliseeritud tsellulaasi kasutamine mustsõstra mahla ensümeerimisel .....	21
3. TULEMUSED JA ARUTELU .....	22
3.1. Tsellulaaside aktiivsuse määramise põhimõte.....	22
3.2. Tingimuste optimeerimine tsellulaasse aktiivsuse määramiseks .....	22

3.3. Tsellulaaside aktiivsuse määramine.....	25
3.4. Nailon-6,6 niidile immobiliseeritud tsellulaasid.....	27
KOKKUVÕTE.....	29
KASUTATUD KIRJANDUS .....	30
SUMMARY .....	32

## TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

ANSA	3-amino-5-nitrosalitsüülhape
BCNPG3	4,6-O-bensülideen-2-kloro-4-nitrofenüül- $\beta$ -D-tsellotriosiid
BPNPG5	4,6-O-(3-ketobutülideen)-4-nitrofenüül- $\beta$ -D-tsellopentaosiid
CMC	Karboksümetüülselluloos
CU	Tsellulaasi aktiivsuse ühik
DMS	Dimetüülsulfaat
DNSA	3,5-dinitrosalitsüülhape
DOE	Design Of Experiments
GA	Glutaaraldehüüd
GOD	Glükoosi oksüdaas
RSM	Response Surface Methodology (vastavusfunktsioonide meetod)
U	Universaalne ensüümi aktiivsuse ühik

## SISSEJUHATUS

Tsellulaasidena tuntakse erinevaid ensüüme, mis katalüüsivad tselluloosis leiduvate erinevate keemiliste sidemete hüdrolyüsi. Neid ensüüme kasutatakse laialdaselt erinevates tööstusharudes: paberi-, tekstiili-, toidu- ja mahlatööstuses ning loomasööda tootmisel. Tsellulaasi kasutatakse tööstuses peamiselt solubiliseeritud kujul, mis tähendab, et ensüümi saab kasutada ainult ühe korra ning seda ei ole võimalik reaktsioonikeskkonnast eraldada ja katalüüsitavaid protsesse kontrollitavalt peatada. Tsellulaasi immobiliseerimine tahkele kandjale muudab ensüümi taaskasutatavaks ning seda on võimalik lihtsalt ja kiiresti reaktsioonikeskkonnast eemaldada ning selle poolt katalüüsitavad protsessid peatada.

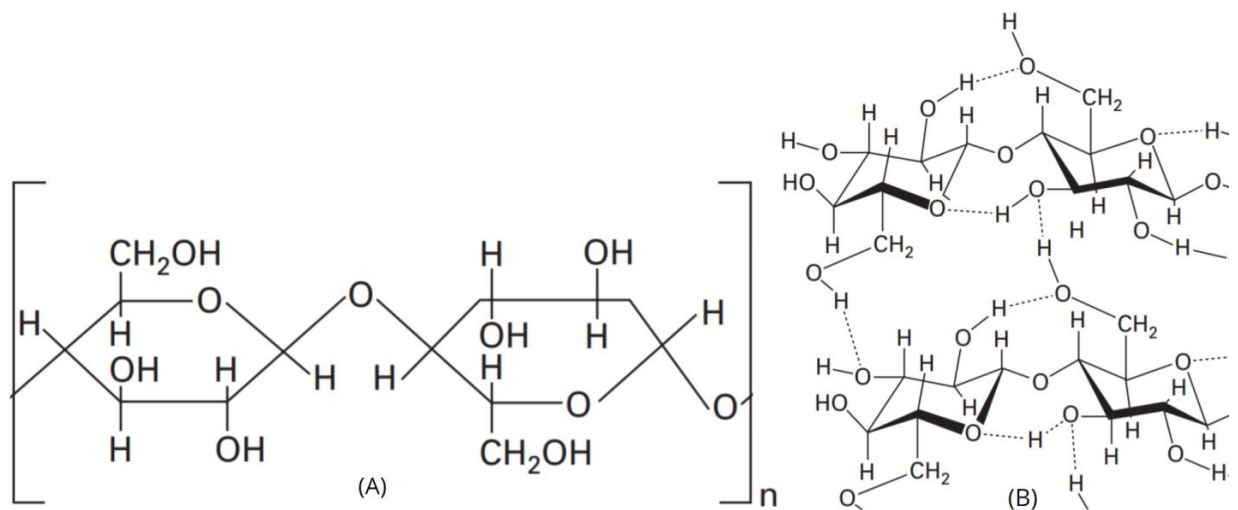
Ensüümide katalüütilisi omadusi iseloomustab nende aktiivsus. Tsellulaasse aktiivsuse määramise meetodikaid on mitmeid, kuid nende puuduseks on liigne keerukus ning suur reagentikulu; lisaks on paljudel juhtudel ebaselge meetodi tundlikkus ning saavutatav määramispiir.

Antud töö eesmärgiks oli töötada välja meetod tsellulaasi aktiivsuse amperomeetriliseks määramiseks, mis võimaldaks lihtsalt ja kiiresti määrata nii solubiliseeritud kui kandjale immobiliseeritud tsellulaasi aktiivsust ning varieerida mõõtepiirkonda vastavalt analüüsi eesmärkidele. Meetod peab olema piisava tundlikkusega väikeste ensüümikoguste aktiivsuse määramiseks ning rakendatav mahlatootmisel kasutatavate ensüümpreparaatide ja immobiliseeritud tsellulaasi aktiivsuse määramiseks. Tsellulaasse aktiivsuse määramise optimaalsete tingimuste leidmiseks kasutati vastavusfunktsioonide meetodit (Response Surface Method RSM).

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Tselluloos ja selle leidumine

Tselluloos ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> on orgaaniline polüsahhariid, mille lineaarne ahel koosneb  $\beta(1 \rightarrow 4)$  sidemega seotud D-glükoosi monomeeridest. Tavaliselt moodustub tselluloosi ahel umbes 100-1000 monomeerist (joonis 1A) [1]. Tselluloosiahelad seonduvad omavahel intermolekulaarsete vesiniksidemete kaudu, moodustades umbes 40st paralleelsest ahelast koosneva kristalse struktuuriga molekuli, mida nimetatakse tselluloosi mikrokiuks (joonis 1B). Tselluloosil põhinevatele orgaanilistele ühenditele ning materjalidele on iseloomulik lahustumatus vees, kõrge survetugevus ning jäikus. [2]



**Joonis 1.** Lineaarne tselluloosi ahel (A) ning kristalse struktuuriga tselluloos (B) [3]

Looduses on tselluloos leitav kõigi taimsete rakkude rakuseintes. Taimse raku rakusein koosneb peamiselt tselluloosist, hemicelluloosist, pektiinist ning ligniinist. Tselluloos, pektiin ning ligniin annavad taimse raku rakuseinale tema tugevuse, jäikuse ning vastupidavuse. [2,4]

Kuna tselluloos vees ei lahustu, siis liigitatakse toiduainetetööstuses see lahustumatute kiudainete hulka. Inimese organism ei ole võimeline lahustumatuid kiudaineid metaboliseerima, kuid sellegipoolest on nende tarbimine organismile vajalik. Lahustumatud kiudaineid lagundavad ning tarbivad soolestikus olevad bakterid, mis aitavad kaasa organismi loomulikule toimimisele. [5]

## 1.2. Tsellulaasid

Tsellulaaside all tuntakse ensüüme, mis võimaldavad läbi viia tselluloosi hüdrolyüsi. Käesoleval ajal liigitatakse tsellulaasideks kokku 11 erinevat ensüümi (tabel 1). Nendest kümme kuuluvad hüdrolaaside klassi (EC 3.x), mis katalüüsivad tselluloosete materjalide hüdrolyüsi ning üks kuulub isomeraaside hulka (EC 5.x), mis katalüüsivad molekuli transformeerumist tema isomeeriks [6]. Tsellulaase jaotatakse ka vastavalt nende funktsioonile tselluloosi hüdrolyüsis kolme rühma, kusjuures üks ensüüm võib omada mitut erinevat funktsionaalsust (tabel 2) [1,7].

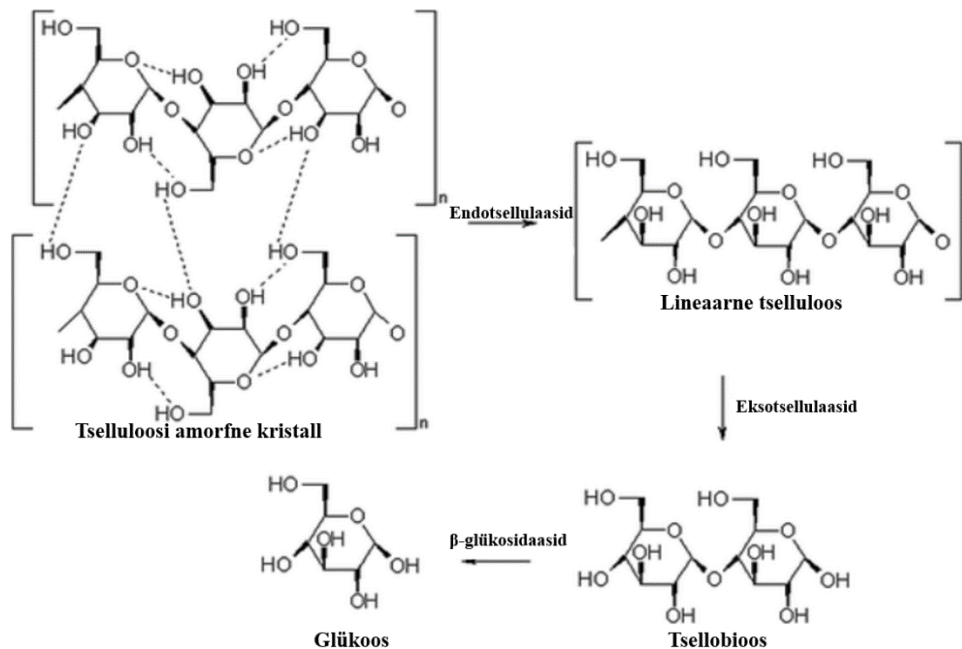
**Tabel 1.** Tsellulaaside hulka kuuluvad ensüümid [6]

EC number			
3.1.1.73	3.2.1.136	3.2.1.150	3.2.1.176
3.2.1.203	3.2.1.4	3.2.1.74	3.2.1.8
3.2.1.91	3.2.1.B42	5.4.99.15	

**Tabel 2.** Tsellulaaside funktsiooniline jaotus [1,7]

	Nimetus	Funktsioon
1.	Endoglükanaasid, Endotsellulaasid	Katalüüsivad tselluloosi mikrokius olevate amorfsete piirkondade lagundamist lineaarse ahelaga tselluloosiks. Tselluloosi lineaarses ahelas katalüüsivad substraadi molekulide hüdrolyüsi mittespetsiifiliselt.
2.	Eksoglükanaasid, Eksotsellulaasid	Katalüüsivad tselluloosi lagundamist glükoosi/tsellobioosi molekulideks lineaarse tselluloosiahela mitteredutseeruvast otsast.
3.	$\beta$ -glükosidaasid, tselloobiaasid	Katalüüsivad tsellobioosi hüdrolyüsi glükoosi monomeerideks.

Tsellulaaside aktiivust defineeritakse eraldi ühikutes: 1 CU (*cellulase unit*) vabastab 1  $\mu$ mol glükoosi tselluloosist 1h jooksul pH = 5,0 ning t = 37°C juures ning see vastab 1/60-le rahvusvahelisest ensüümide aktiivsust defineerivale ühikule [8]. Erinevate tsellulaasetaktiivsust omavate ensüümide toime tselluloosi molekulile on skemaatiliselt toodud joonisel 2.



**Joonis 2.** Tselluloosi lagundamise ensümaatiline reaktsioonimehhanism [1,7]

Tsellulaaside peamisteks tootjateks on erinevad mikroorganismid: seened (näiteks *A. niger*) ja bakterid (näiteks *C. Thermocellum*), mis toodavad tsellulaase ensüüme oma elutegevuse käigus erinevatel eesmärkidel [1]. Tsellulaaside päritolust sõltuvad oluliselt nende poolt katalüüsitud reaktsioonide optimaalsed tingimused ning inhibeerivat mõju omavad ained [1]. Tavaliselt jäävad tsellulaasidega töötamisel lahuse optimaalsed pH väärtused vahemikku pH = 3,0 – 6,0 ning temperatuur vahemikku  $t^{\circ} = 30^{\circ}\text{C} - 80^{\circ}\text{C}$  [6]. Tsellulaaside tavapärased inhibiitorid on erinevad metalli-ioonid ning mitmesugused orgaanilised ühendid. Levinumad inhibeerivat mõju omavad metalli-ioonid on hõbeda, elavhõbeda, kaltsiumi, kroomi, vase, raua, magneesiumi, mangaani ning tsingiioonid, kusjuures mõne eelnevaiooni väga madala kontsentratsiooni kasutusel (näiteks kaltsiumi ja magneesiumiiooni) on märgatud hoopis ensüümi aktiivsuse tõusu [6]. Orgaanilistest inhibiitoritest on levinumad taimeraku koostises olevad hemitselluloos, selle mõned monomeerid (mannoos, galaktoos, ksüloos, glükoos) ning ligniin [6,9]. Tsellulaasid, mille optimaalsed tingimused on väljaspool antud piirkondi ning mille inhibiitorid erinevad tavapärastest, pärinevad tavaliselt ekstreemsetes tingimustes kasvanud või muteeritud organismidelt [6,10].

### 1.2.1. Tsellulaaside immobiliseerimine tahkele kandjale

Immobiliseeritud ensüümide, sealhulgas tsellulaaside, kasutamisel on võrreldes solubiliseeritud ensüümidega mitmeid eeliseid. Peamisteks eelisteks immobiliseeritud ensüümide kasutamisel on võimalus ensüümide eemaldamiseks reaktsioonisegust, mis peataks kohealt katalüüsitava reaktsiooni, ning ensüümide taaskasutamine, mis võimaldab kulusid kokku hoida. [11]

Tsellulaasi immobiliseerimiseks võib kasutada erinevaid kandjaid, kusjuures toiduainete töötlemise korral on oluline kasutatava kandja keemiline inertsus. Käesolevas töös valiti tahkeks kandjaks nailon-6,6, sest see on inertne, oday, kergesti kättesaadav, soosib immobiliseeritud ensüümide kõrge aktiivsuse säilimist ning sobib kasutamiseks mahlade tootmisel. [12,13]

Tsellulaasi immobiliseerimine tahkele kandjale nailon-6,6 toimub *Cross-linking* meetodi põhjal, kus linkerina kasutatakse glutaaraldehüüdi (GA). Tahket kandjat töödeldakse esmalt dimetüülsulfaadiga (DMS), seejärel seotakse tahkele kandjale amiidsideme kaudu GA, mis on linkeriks kandja ja ensüümi molekuli vahel ning tagab ensüümmolekuli piisava kättesaadavuse substraadile. Immobiliseerimise reaktsiooniskeemi ning täpsed produktid on kujutatud joonisel 3. [17,18]



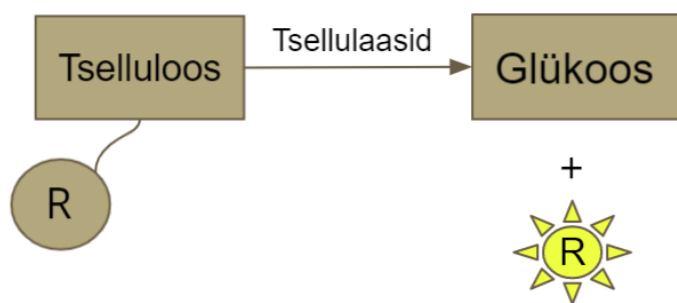
**Joonis 3.** Tsellulaasi immobiliseerimine tahkele kandjale nailon-6,6 [12]

### 1.3. Tsellulaaside aktiivsuse määramine

Tsellulaasset aktiivsust defineeritakse kui tselluloosi või selle derivaatide, näiteks karboksümetüültselluloosi (CMC) tsellulaaside poolt katalüüsitava hüdrolüüsimisel tekkinud glükoosi molekulide arvu 1h jooksul optimaalsel pH ning temperatuuri väärtustel. Järgnevalt kirjeldatakse enamlevinud meetodeid tsellulaasse aktiivsuse määramiseks.

#### 1.3.1. Tsellulaaside aktiivsuse optiline määramine

Tsellulaasse aktiivsuse optiliseks määramisel on tselluloosse substraadi hüdrolüüsi üheks produktiks optiliselt aktiivne molekul, mida on võimalik detekteerida (joonis 4) [14–16]. Selleks hüdrolüüsitakse tsellulaaside abil eelnevalt modifitseeritud tselluloosseid substraate.



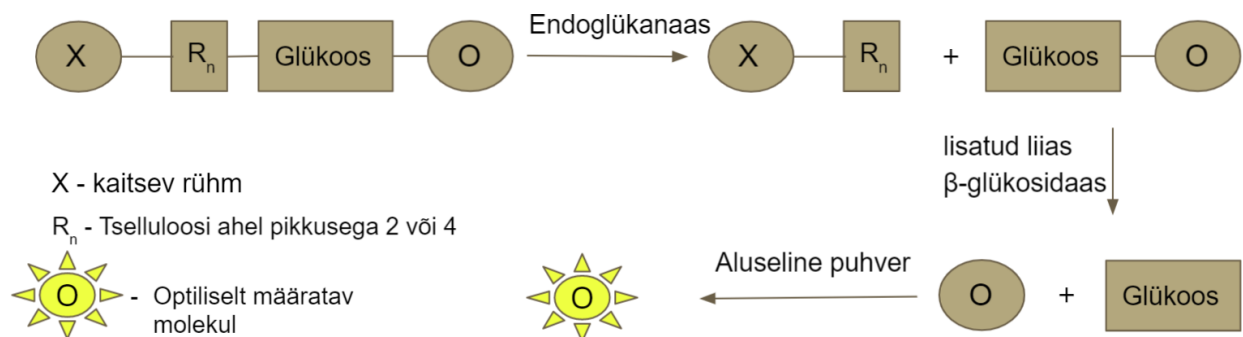
R - optiliselt aktiivne molekul

**Joonis 4.** Tsellulaasse aktiivsuse optilise määramise põhimõte [14–16]

Modifitseeritud tselluloosete substraatidena kasutatakse kolorimeetrias näiteks 4,6-O-bensülideen-2-kloro-4-nitrofenüül- $\beta$ -D-tselotriosiidi (BCNPG3), 4,6-O-(3-Ketobutülideen)-4-nitrofenüül- $\beta$ -D-tsellopentaosiidi (BPNG5), ning fluoromeetrilisel määramisel näiteks resorufiin tsellobiosiidi, kuid müügil on ka määramata koostisega substraate [14–16].

BCNPG3 ning BPNG5 koosnevad vastavalt kolmest ja viiest glükoosi monomeerist, millest mõlemal on ahela ühes otsas tsellulaaside hüdrolüüsimise vastu kaitsev rühm ning teises otsas glükoosiga seotud hiljem optiliselt määratav ühend [16]. Meetodid erinevad omavahel tselluloosi ahela pikkuse, kaitsva rühma ning optiliselt aktiivse rühma poolest [16]. Antud meetodid sobivad

vaid endoglükanaaside määramiseks, sest need katalüüsivad eelisjärjekorras määramismeetodile sobiva sideme hüdrolüüsi [16]. Meetodite tööpõhimõte on kujutatud joonisel 5.



**Joonis 5.** BCNPG3 ja BPNPG5 meetodi tööpõhimõte [16]

Fluoromeetrilisest määramismeetodist on teada ühe kasutatava substraadi keemiline koostis [14,15]. Resorufiin tsellobioosiid on tsellobioosne ühend, mille tsellulaaside abil hüdrolüüsimisel vabaneb fluoromeetriliselt määratav resorufiin [14]. Teisel kirjeldatud meetodil on teada vaid optilist aktiivsust omav rühm: 4-metüülumbelliferoon [15]. Erinevalt kolorimeetrilistest meetoditest väidetakse, et antud meetoditega on võimalik määrata kõikide tsellulaaside koguaktiivsust [14,15].

Kõik kolorimeetrilised tsellulaase aktiivsuse määramismeetodid töötavad temperatuurivahemikus  $25^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$ , pH vahemikus  $\text{pH} = 4,5 - 8,0$  ning nende ajakulu varieerus 10 – 120 minuti vahel [14–16]. Madalaim määramispiir oli 1.2 mCU/ml BPNPG5 reagenti kasutaval meetodil (tabel 3).

**Tabel 3.** Tsellulaase aktiivsuse optiliselt määramise meetodid

Meetodi number	Substraat	Optiliselt aktiivne produkt	Määramispiir (mCU/ml)	Viide
1	BCNPG3	2-kloro-4nitrofenool	50	[16]
2	BPNPG5	4-nitrofenool	1.2	[16]
3	Resorufiin tsellobioosiid	Resorufiin	3	[14]
4	Määramata sünteesitud ühend	4-metüülumbelliferoon	<115	[15]

### 1.3.2. Tsellulaaside aktiivsuse viskosimeetriline määramine

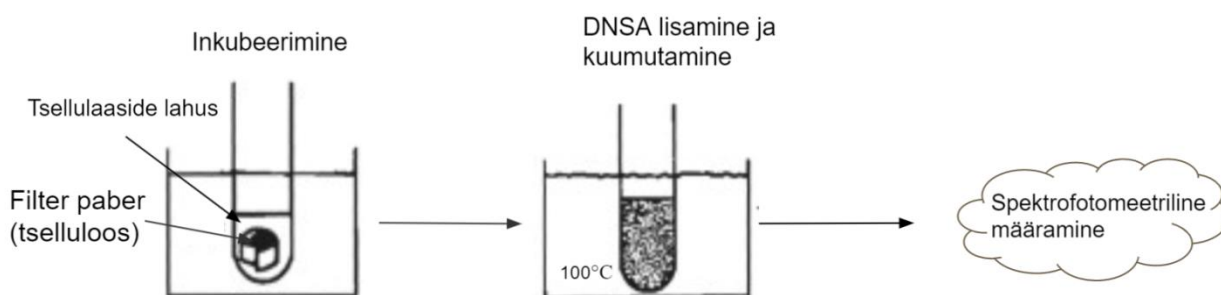
Tsellulaasse aktiivsuse viskosimeetriline määramine põhineb tsellulaaside toimeel hüdrolüüsitava substraadi viskoossuse vähenemises ajas [17]. Viskosimeetrilisel määramisel kasutatakse peamise substraadina karboksümetüültselluloosi (CMC), mis lahustub vees oma kõrvalahelate hüdrofiilsuse ning vesiniksidemete moodustamise tõttu [17]. Tsellulaaside lisamisel langeb CMC lahuse viskoossus, sest hüdrolüüsimisel väheneb lahuses olevate molekulide keskmine molaarmass [17,18]. Hiljuti uuriti viskosimeetrilise määramise täpsust sama aktiivsusega endoglükanaaside ning eksoglükonaaside vahel ning täheldati, et viskosimeetriline määramine on spetsiifiline endotsellulaaside aktiivsusele ning ei sobi eksotsellulooside aktiivsuse määramiseks [18]. Selle põhjusena tuuakse välja endotsellulaaside tunduvalt paremat võimet hüdrolüüsida  $\beta$ -1,4 glükosiidsidet pikkades tselluloosetes ahelates võrreldes teiste tsellulaasidega [18]. Viskosimeetrilise tsellulaasse aktiivsuse määramise kiirus ja täpsus sõltub kasutatud viskosimeetrist, uuritava ensüümisegu eeldatavast aktiivsusest ja kasutatavast meetodikast, kusjuures temperatuur varieerub vahemikus  $t = 25^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$  ja pH vahemikus 4,8 – 5,0 [17–19]. Konkreetseid viskosimeetrilisi määramise meetodikaid on mitmeid, näiteks on võimalik tsellulaasset aktiivsust tagasi arvutada põhinedes teadaolevate aktiivsustega tsellulaaside ja nende põhjustatud viskoossuse languse kalibreerimisgraafikule, on olemas meetod, kus hinnatakse paralleelselt CMC ja puhvri voolumise kiirust ning meetod, kus tulemuse annab spetsiaalselt konstrueeritud instrument [17–19]. Kiireimvõimalus viskosimeetriliseks tsellulaasse aktiivsuse määramiseks on *Rapid Visco Analyser* kasutamine. Analüüsi kestvus on sellega 10 minutit, mõõtmine on automatiseeritud ning tsellulaasset aktiivsust on võimalik määrata vahemikus 0.2 CU/ml – 2.5 CU/ml [19].

### 1.3.3. Tsellulaaside aktiivsuse määramine redutseeruvate sahhariidide sisalduse kaudu

Antud meetodikal toimub tsellulaasse aktiivsuse mittespetsiifiline määramine, kasutades selleks ära reagente, mis reageerivad tselluloosse aine hüdrolüüsimisel saadud redutseeruvate sahhariididega ning mida on võimalik lihtsasti määrata. Sellel põhimõttel saab määrata

tsellulaasset koguaktiivsust [20]. Tavaliselt on nende meetodite korral substraadiks CMC või tavaline filterpaber [20].

Levinud redutseerivate sahhariidide määramise meetodiks on 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNSA) kasutamine (joonis 6) [21]. DNSA on lahuses kollast värvi aine, mis on kõrgel temperatuuril oksüdeerijaks redutseerivate suhkrute aldehyüd rühmadele, oksüdeerides need karboksüülhappe rühmadeks. Reageerides redutseerub DNSA 3-amino-5-nitrosalitsüülhappeks (ANSA), mis on lahuses oranž [21]. ANSA spektrofotomeetrilise määramise kaudu tehakse kindlaks redutseerivate suhkrute arv enne DNSA lisamist, mida kasutatakse tsellulaasse aktiivsuse tagasiarvutuseks [21].

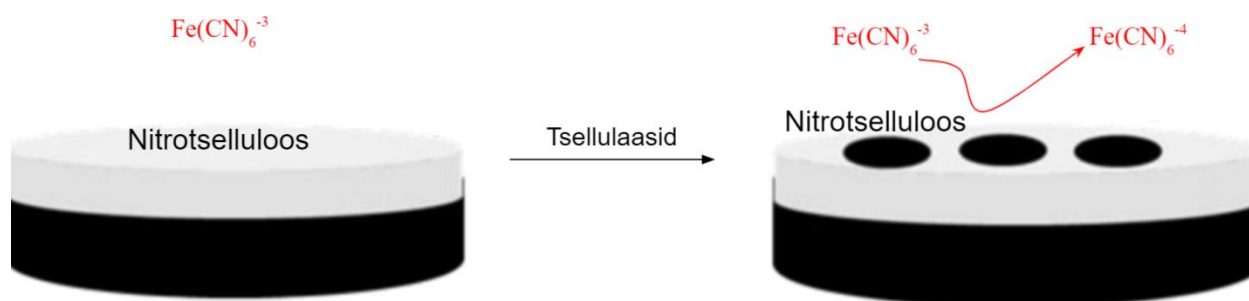


**Joonis 6.** DNSA abil redutseerivate suhkrute määramise põhimõte [21]

DNSA meetodikat on oluliselt modifitseeritud ja optimeeritud, et parandada selle täpsust ning kiirust [21,22]. Kasutusel on meetod, kus paralleelseid mõõtmisi viiakse läbi 96 süvendiga optilistes küvettides, mis kiirendab oluliselt määramiseks kuluvat aega [21]. Samuti leidub meetod, kus DNS reagenti asemel kasutatakse oksüdaasi ChitO-Q268R [22]. Kasutusel olevate meetodite tulemused erinevad omavahel, sest tselluloosi hüdrolüüsil tekib ka muidprodukte, näiteks tsellobioosi, mis interakteerub erinevate oksüdeerivate reagentidega erineval määral [21–23]. Kõige täpsemalt saab määrata redutseerivate suhkrute kaudu tsellulaasset aktiivsust kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga, sest seal on tselluloosi hüdrolüüsi produktid omavahel eristatavad [23].

### 1.3.4. Tsellulaaside aktiivsuse elektrokeemiline määramine

Tsellulaasse aktiivsuse elektrokeemiline määramine põhineb tselluloosse substraadi ga elektroodi pinna katmisel ning seejärel pinna hüdrolüüsimisel tsellulaasidega (joonis 7) [24]. Esmalt kaetakse grafiitelektroodi pind nitrotselluloosi kihiga, mis blokeerib raud(III)tsüaniid ioonide redutseerumise. Kaetud elektroode inkubeeritakse tsellulaasi lahuses, mis katalüüsib nitrotselluloosi hüdrolüüsi. Tsellulaasne aktiivsus määratakse elektroodil mõõdetava elektrilaengu suuruselt, mis varieerub vastavalt nitrotselluloosi kihi hüdrolüüsi määrale. Meetodi ajakulu sõltub tsellulaasidega inkubeerimise pikkusest ning signaali mõõtmise pikkusest, madalaimaks määramispiiriks saadi 6  $\mu\text{CU/ml}$ . [24]



**Joonis 7.** Tsellulaaside aktiivsuse elektrokeemilise määramise põhimõte [24]

## 1.4. Tsellulaaside kasutamine tööstuses

Tsellulaasidele leitakse tööstuses järjest rohkem kasutusalasid ning ennustatakse, et tsellulaaside müügi maht aastal 2025 on juba 2300 miljonit USD. Eeldatav aastane tsellulaasi turu käibetõus on plahvatuslik - 5.5% ajavahemikul 2018 – 2025. Tsellulaase kasutatakse enamasti lahustunud kujul, mistõttu ei saa neid korduvkasutada. 2016. aastal olid suurimad tsellulaasi kasutavad tööstusvaldkonnad karjakasvatus (29.71%), toidu- ja joogitööstus (26,37%) ning tekstiilitööstus (13.77%).[28] Karjakasvatuses on tsellulaasidel oluline osa loomade sööda kvaliteedi tõstmisel. Tavaliselt moodustab loomade ülalpidamiskulust vähemalt 50% nende toitmine. Loomade sööt koosneb suures osas lignotselluloosist, mis on kõrge kiudainete sisaldusega, kuid loomadele halvasti seeditav. Sööda eelnev töötlemine tsellulaasidega lagundab kiudainete struktuurid loomale paremini seeditavaks ning seega saavad nad sealt kätte suurema koguse vajalikke kiud- ning toiteained. Kõrgema kvaliteedi ning toiteväärtusega sööda tarbimine tõstab loomade toiteainetest saadava energia hulka, mida loom kasutab näiteks rohkema piima tootmiseks (kuni 25% rohkem) või kasvamiseks (kuni 15% rohkem). [1,28] Tsellulaase kasutatakse tekstiilitööstuses, eriti teksasest toodetud riiete töötlemisega seonduvatel protsessidel. Teksasriie koosneb sitkest puuvillast, mis põhineb peaaegu 100% tselluloosil. Pika-ajalisel teksasriiete kasutamisel kulub materjali pealiskiht, mis on silmaga nähtav kui üheotsaliste niidikiudude teke riide pinnale, kuid mida ei ole võimalik veega pesul kätte saada. Varem kasutati nende kiudude eemaldamiseks pimsskive, mis võttis kaua aega ning oli töörohke. Kasutades tsellulaase hüdrolüüsitakse lahtiste kiudude ja teksasriide vaheline glükosiidside, mis muudab riidevälised kiud veega pesul kättesaadavaks. [1,28,29]

### 1.4.1. Tsellulaasid mahlatööstuses

Taimsete materjalide töötlemisel, sealhulgas mahlatööstuses on oluline rakuseinte lõhustamine ning rakkudes leiduvate bioaktiivsete ainete eraldamine. Taimeraku rakuseinu saab purustada lisaks ensümaatilisele hüdrolüüsile mehhaaniliselt, näiteks mahlapressides [1,7]. Tsellulaaside kasutamise olulisust ja potentsiaali erinevate viljade töötlemisel iseloomustab erinevate viljade kuivmassi koostis. Kuigi erinevate kiudainete osakaalud erinevates viljades varieeruvad, on

tselluloos igas viljas oluline koostisosa ning moodustab näiteks porgandites vilja kuivmassist isegi üle 80% (tabel 4).

**Tabel 4.** Viljade kuivmassis olevate kiudainete osakaal (%)

Taim/Kiudaine	Tselluloos	Pektiin	Ligniin	Hemitselluloos	Viide
Porgand	51.6 – 80.94	3.88 – 7.14	2.48 – 32.2	9.14 – 12.3	[4,30]
Lillkapsas	66.97	5.51	14.44	13.06	[4]
Õun	37.82 – 43.6	11.7 – 24.52	7.45 – 20.4	24.4 – 30.19	[4,30]
Pirn	34.5	13.4	33.5	18.6	[30]
Mustsõstar	12	2.73	59.3	25.3	[30]
Aroonia	34.6	7.85	24.1	33.5	[30]
Kirss	18.4	1.51	69.4	10.7	[30]

Mahlatööstuses tekib suur hulk jääkprodukti, sest tavapärasel rakuseinte mehhaanilisel purustamisel jääb neist osa terveks. Tsellulaasi ja teiste ensüümide, peamiselt erinevate pektinaaside kasutamine mahlatööstuses aitab hüdrolüüsida rakuseinale tugevuse andvaid komponente ning suurendada mahla väljatulekut [1,5]. Mahlapressimise efektiivsuse suurendamine vähendab ühtlasi ka jääkide hulka. Mahlatootjale on ensüümide kasutamine hea võimalus tootmise efektiivsuse suurendamiseks, mis tõstab kasumlikkust ning vähendab oluliselt jääkide töötlemiseks kuluvat ressursi. [1,29] Siiani kasutatakse mahlatööstuses solubiiliseeritud tsellulaase, kuid nende immobiliseerimine ning taaskasutamine võimaldaks tootja kasumit veelgi suurendada [1,29].

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Kasutatud seadmed

Hapnikuandur Helox 10-15 (Elke Sensor)

Termostaat Sky Line TW 2.03 (ELMI)

Vortex segaja Heidolph

Tsentrifuug Beckman Coulter Microfuge 16

pH meeter Mettler Toledo ( $\pm 0,01$  pH ühikut)

Magnetsegaja MS3000 (Biosan)

Analüütiline kaal PB602-S/FACT (Mettler Toledo) (täpsus 0,01 mg)

Klaasist viskosimeeter

### 2.2. Kasutatud reaktiivid ja materjalid

Tsellulaas (*Aspergillus niger*, aktiivsus 1CU/mg , LOT nr. SLCB5735 Sigma-Aldrich)

Glükoosi Oksüdaas (*Aspergillus niger*, aktiivsus 17300U/g , LOT nr. 079K745V Sigma-Aldrich)

Karboksümetüülselluloosi naatriumisool (Sigma-Aldrich)

Naatriumatsetaat – trihüdraat ( $C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$ ) (AppliChem, min 99%)

Äädikhape ( $CH_3COOH$ ) (AppliChem, min 99.7%)

Naatriumhüdroksiid (NaOH) (AppliChem, min 99%)

Vesinikkloriidhape (HCl) (Sigma-Aldrich,  $\geq 37\%$ )

Dimetüülsulfaat ( $C_2H_6O_4S$ ) (Sigma-Aldrich, min 99.5%)

Glutaaraldehüüd ( $C_5H_8O_2$ ) (Sigma-Aldrich, 50% lahus)

Nailon-6,6 niit (Oja, Türgi)

## 2.3. Metoodikad

### 2.3.1. Tsellulaasse aktiivsuse määramine

Tsellulaasse aktiivsuse määramiseks lisati kindel kogus solubiliseeritud või immobiliseeritud ensüümi 35 ml karboksümetüülselluloosi lahusesse (CMC 10 g/L 0.1 M atsetaatpuhvrts), mis oli eelnevalt õhuhapnikuga rikastatud vähemalt 1 h. Õhuhapnikuga rikastamine toimus 25°C juures suruõhuga. Reaktsioon viidi läbi 25°C vesivannis loksutades anumad iga 10 minuti tagant, inkubeerimise aeg varieerus vahemikus 10 – 70 minutit.

Umbes minut enne reaktsiooni lõppu viidi lahus termostateeritud mõõterakku ( $V = 35 \text{ ml}$ , 25°C) (joonis 8). Mõõteraku avad sulgeti hermeetiliselt hapnikuanduri ning korgiga ja alustati hapnikuanduri signaali registreerimist. Mõõterakk asetati magnetsegajale ning kogu protsessi vältel toimus segamine konstantse kiirusega. 70 minuti täitumisel süstiti mõõterakku 100 µl glükoosi oksüdaasi lahust arvestusega, et glükoosi oksüdaasi lõppkontsentratsioon oleks 4 – 12 U/ml. Hapnikuanduri signaali registreeriti kuni 10 minutit või kuni hapniku täieliku kadumiseni lahusest.



## **Joonis 8.** Mõõtmisel kasutatud 35ml mõõterakk

Tsellulaasse aktiivsuse arvutamiseks kasutati eksperimentaalsete mürade mõju vähendamiseks hapnikuanduri normaliseeritud signaali ( $I/I_0$ ).

### **2.3.2. Mõõtmistingimuste planeerimine vastavusfunktsioonide meetodi abil**

Tsellulaasi aktiivsuse määramise sobivate tingimuste väljatöötamiseks kasutati eksperimendi planeerimist vastavusfunktsioonide meetodi (Response Surface Methodology RSM) abil kasutades tarkvara Design Expert 12. See lähenemine võimaldab mitmete parameetrite üheaegset optimeerimist ja parameetrite koosmõju arvestamiseks kasutatakse statistilisi meetodeid. Selleks defineeriti esmalt protsessi mõjutavad sisendparameetrid ja nende muutumise ulatus, sest sisendparameetrite mõjude uurimiseks protsessi väljundparameetritele ehk mõõdetavatele suurustele kasutatavad meetodid ei võta arvesse uuritavate protsesside füüsikalist sisu. Uuritavateks sisendparameetriteks olid inkubeerimisaeg tsellulaasi lisamisel, inkubeerimisaeg glükoosi oksüdaasi lisamisel ja glükoosi oksüdaasi kontsentratsioon (sisendparameetrite ja nende piirväärtuste valik on põhjendatud tulemustes). Optimeeritavaks väljundparameetriks oli hapnikusensori signaali normaliseeritud muut ( $1 - I/I_0$ ). Disaini eesmärk oli võimalikult vähese katsete arvuga leida katset parimana kirjeldav matemaatiline mudel, mis hindab matemaatiliselt ja statistiliselt, milline on sisendparameetrite koosmõju mõõdetavale signaalile. See suurendab üksikkatsete efektiivsust ning vähendab oluliselt optimeerimiseks vajalike katsete arvu [25]. Käesolevas töös kasutati eksperimendi planeerimiseks Box-Behnkeni kolme muutuva parameetriga disaini, mis paigutab kõik katse sisendparameetrite punktid koordinaat -teljestikku nii, et punktid oleksid ühtlaselt jaotunud ning ei paikneks ekstreempunktides [26]. Kuna ekstreempunkte antud meetodiga ei mõõdata, saab Box-Behnkeni disaini mudel valmis suhteliselt väikese katsete arvuga [27]. Tsellulaasi määramise meetodi väljatöötamiseks on Box-Behnkeni mudel sobivaim, sest protsessi optimeerimisel muudeti 3 erinevat eespoolnimetatud parameetrit.

### **2.3.3. Tsellulaasi immobiliseerimine nailon-6,6 kandjale**

Tsellulaaside immobiliseerimiseks kasutati nailon-6,6 niiti, mida kaaluti 873.07 mg ( $1 \text{ mg} = 2.29 \text{ cm}$ ) ning seejärel keriti niit ümber teflonist plaatide (joonis 9).



### **Joonis 9.** Nailon-6,6 niit keritud ümber plaatide

Niite inkubeeriti dimetüülsulfaadis 2 minutit ( $60^{\circ}\text{C}$ ), seejärel pesti 2 korda jääkülma metanooliga ning 5 korda 0.1 M fosfaatpuhvriga (toatemperatuur,  $\text{pH} = 7,0$ ). Seejärel inkubeeriti niite 1h glutaaraldehüüdi lahuses (toatemperatuur, 12.5% GA 0.1 M fosfaatpuhvris,  $\text{pH} = 7,0$ ). Aja täitumisel pesti niite 5 korda fosfaatpuhvriga (toatemperatuur,  $\text{pH} = 7$ ) ning inkubeeriti 24 h 50 ml tsellulaasi lahuses aktiivsusega 10.16 CU/ml ( $4^{\circ}\text{C}$ , 0.1 M atsetaatpuhvris,  $\text{pH} = 5,0$ ). Immobiliseerimine lõpetati niitide põhjaliku pesuga, et eemaldada niitidele jäänud seondumata ensüüm. Kokku pesti niite 10 korda 0.1 M atsetaatpuhvris (toatemperatuur,  $\text{pH} = 5,0$ ). Kolmandal, kuuendal ning üheksandal pesul kasutati täiendavalt 5 minuti jooksul *orbital shaker*'it (150 rpm) ning kümnendal pesul 15 minuti jooksul. Niite säilitati külmkapis suletud nõus 0.1 M atsetaatpuhvris ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ ).

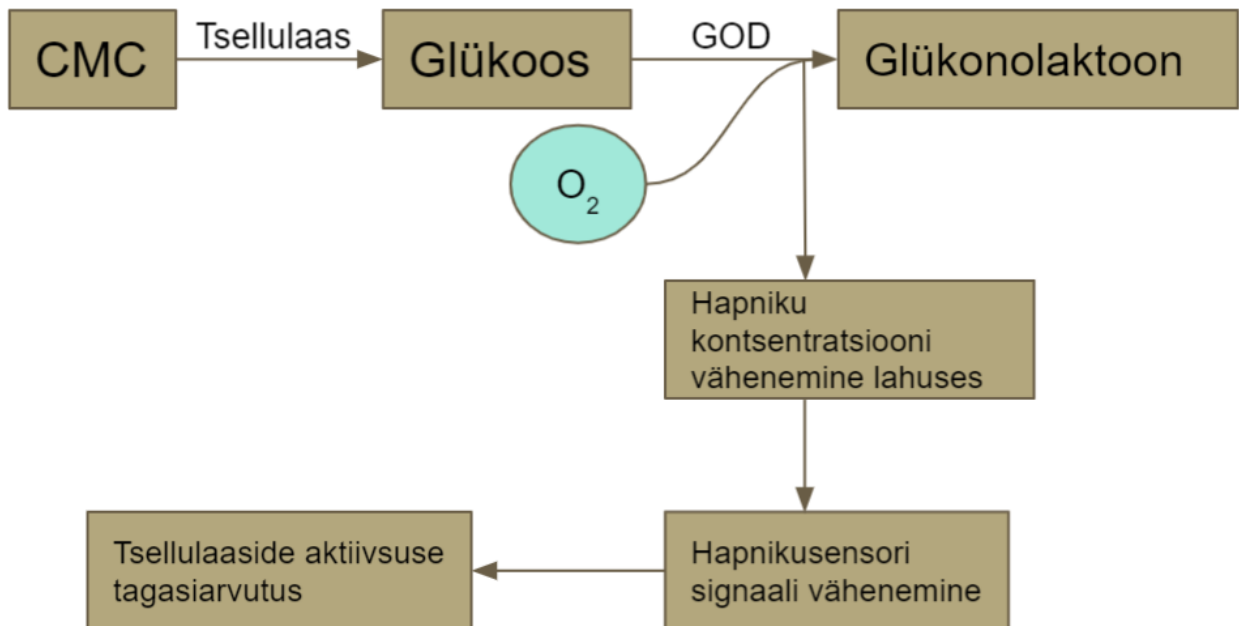
#### **2.3.4. Immobiliseeritud tsellulaasi kasutamine mustsõstra mahla ensümeerimisel**

Immobiliseeritud tsellulaasiga niite kasutati koos immobiliseeritud pektinaasidega mustsõstra mahla töötlemisel. Immobiliseeritud ensüümide mõju hinnati mahla viskoossuse muutumise alusel ajas mahla ensümeerimisel  $40^{\circ}\text{C}$  juures. Mahla viskoossuse muutust võrreldi ainult immobiliseeritud pektinaasi ning immobiliseeritud pektinaasi ja immobiliseeritud tsellulaasi kasutamisel. Inkubeerimiseks lisati 100 ml värskelt pressitud mustsõstra mahlale esimesel juhul 50 m immobiliseeritud pektinaasiga ning teisel juhul 50 m immobiliseeritud pektinaasi ga ja 20 m immobiliseeritud tsellulaasiga niiti. Kinemaatilise viskoossuse mõõtmiseks kasutati klaasist viskosimeetrit.

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1. Tsellulaaside aktiivsuse määramise põhimõte

Tsellulaasse aktiivsuse määramiseks inkubeeriti kõigepealt ensüüme õhuhapnikuga rikastatud karboksümetüülselluloosi (CMC) lahuses. Hüdrolyüüsi tulemusena tekkinud glükoosi määratakse glükoosi biosensori abil, mis koosneb lahustunud glükoosi oksüdaasist ning Clark'i tüüpi hapnikuandurist. Hapnikuandur registreerib hapniku kontsentratsiooni vähenemist lahuses glükoosi oksüdaasi poolt katalüüsitava glükoosi oksüdeerimisreaktsiooni käigus. Hapniku kontsentratsiooni vähenemine lahuses võimaldab hinnata tsellulaaside aktiivsust (joonis 10).



**Joonis 10.** Tsellulaaside aktiivsuse määramise põhimõte

#### 3.2. Tingimuste optimeerimine tsellulaasse aktiivsuse määramiseks

Tsellulaasse aktiivsuse määramise tulemust mõjutavad lahuse temperatuur, pH, lisatud glükoosi oksüdaasi kontsentratsioon, mõõterakus oleva magnetsegaja kiirus, CMC inkubeerimise aeg ning hapnikusensoriga mõõtmise aeg. Järgnevalt uuriti kolme parameetri: CMC inkubeerimise aja, sensoriga mõõtmise aja ning lisatud GOD kontsentratsiooni mõju hapnikusensori signaali väärtusele ( $I/I_0$ ), kasutades vastavusfunktsioonide meetodit eksperimendi disainimise tarkvaras

Design Expert 12. Parameetrite mõju uurimisel võeti konstantseteks temperatuur (25°C), pH (pH = 5,0) ning magnetsegaja kiirus. Temperatuur valiti toatemperatuurile vastavaks, et mõõtmiste läbiviimine oleks võimalikult lihtne, ehkki kõrgematel temperatuuridel on reaktsiooni kiirus oluliselt suurem ning eeldatav vajalik inkubatsiooniaeg väiksem. Lahuse pH valiti vastavalt tsellulaaside aktiivsuste optimaalsele vahemikule [6]. Magnetsegaja kiirus valiti maksimaalseks võimalikuks vastavalt mõõteraku kujule, et segamine oleks efektiivne ja tõhus ning see oli kõikides katsetes konstantne, et elimineerida segamiskiiruse mõju hapnikuanduriga mõõdetavale signaalile.

Eksperimendi disainimisel tuleb esmalt valida uuritavate sisendparameetrite suuruste vahemikud. CMC inkubeerimise aja vahemik ja hapnikusensoriga mõõtmise aja vahemik valiti nii, et meetodi ajakulu ei oleks väga suur (alla 1.5 h), sest sooviti luua meetod, mis oleks oma ajakulu poolest võrreldav muude kasutatavate tsellulaasetaktiivsust määravate meetoditega, mis jäävad enamjaolt 10 minuti ja 2 tunni vahele [14-24]. GOD kontsentratsiooni vahemikud valiti selliselt, et saavutatakse võimalikult suur signaali muutus katse mõistlikku maksumust järgides. Analoogete mõõtmismeetodite jaoks on varem kasutatud GOD kontsentratsiooni 1 U/ml, kuid nende tundlikkus jäi liiga väikeseks [31]. Eelkatsetest leiti kinnitust, et GOD kontsentratsiooni tõstmine on lineaarses seoses meetodi tundlikkusega, mistõttu otsustati GOD kontsentratsioone tõsta. Kokkuvõtvalt on valitud sisendparameetrite vahemikud toodud tabelis 5.

**Tabel 5.** Eksperimendi disainiga uuritavate sisendparameetrite vahemikud

Sisendparameeter	Vahemik
CMC inkubeerimise aeg	10 min – 70 min
GOD kontsentratsioon	4 U/ml – 12 U/ml
Hapnikusensoriga mõõtmise aeg	300 s – 600 s

Kolme valitud sisendparameetri ning nende vahemike põhjal koostati Design Expert 12 abil katsete plaan. Katsed viidi läbi konstantse tsellulaasi kontsentratsiooniga ~0.57 CU/ml. Katsete järjekord on valitud selliselt, et ei tekiks süstemaatilist viga. Tehtud katsed ja nende mõõtetulemused on toodud tabelis 6.

**Tabel 6.** Väljundparameetri sõltuvus erinevate sisendparameetrite väärtustest

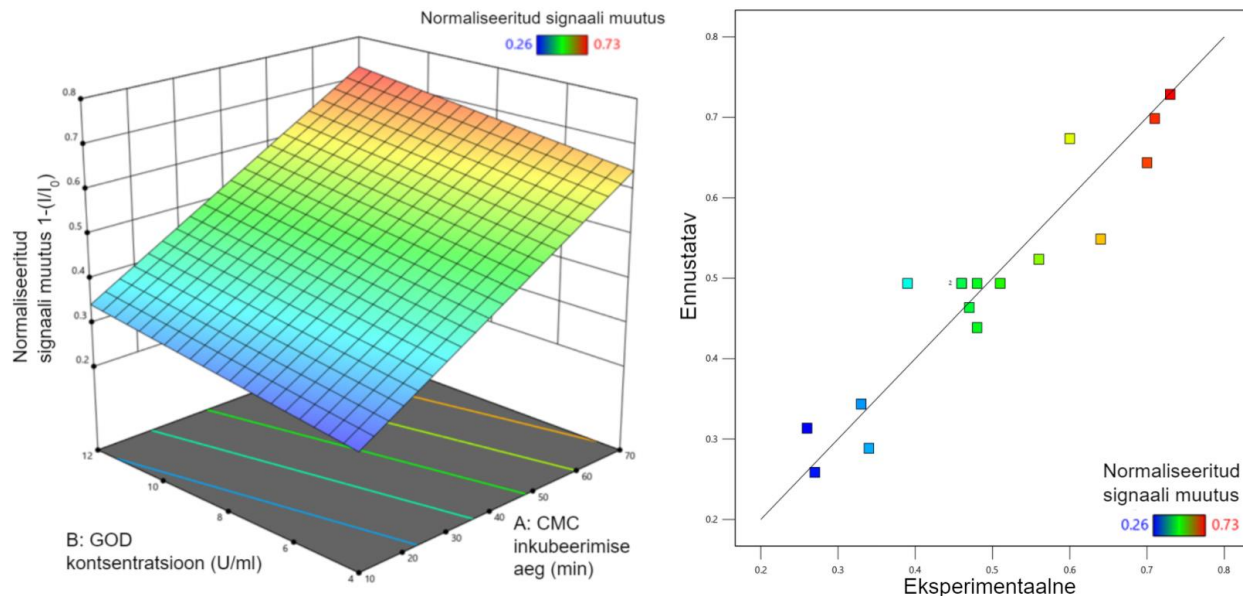
Katse number	Sisendparameeter 1: CMC inkub. aeg, min	Sisendparameeter 2: GOD konts U/ml	Sisendparameeter 3: Mõõtmise aeg, sek	Väljundparameeter 1: Normaliseeritud signaali muutus
1	40	12	300	0.56
2	40	12	600	0.64
3	40	4	600	0.47
4	40	8	450	0.46
5	10	8	300	0.34
6	10	4	450	0.27
7	70	12	450	0.73
8	70	8	600	0.71
9	40	8	450	0.39
10	70	8	300	0.6
11	10	8	600	0.26
12	40	8	450	0.48
13	40	4	300	0.48
14	40	8	450	0.51
15	40	8	450	0.46
16	70	4	450	0.7
17	10	12	450	0.33

Eksperimendi mudelist leiti, et antud süsteemi kirjeldab lineaarne mudel

$$y = 0.114363 + 0.006417a + 0.010625b + 0.000083c \quad (1),$$

kus  $y$  on mõõdetav normaliseeritud signaal,  $a$  on inkubeerimise aeg CMC-ga,  $b$  on glükoosi oksüdaasi kontsentratsioon ning  $c$  on mõõtmise aeg. Leitud kordajatest võrrandile (1) on näha, et väljundparameetrit (hapnikusensori normaliseeritud signaali) mõjutab oluliselt CMC inkubeerimise aeg ning GOD kontsentratsiooni, mõõtmise aja mõju on väiksem (joonis 11). Mudeli analüüsil ei leitud olulisi interaktsioone sisendparameetrite vahel.

Mudeli ennustatud väljundparameetri väärtused langevad väga hästi kokku eksperimentaalselt määratud väärtustega (joonis 12), seda kinnitab ka väike mudeli  $R^2$  ja kohandatud mudeli  $R^2$  väärtuste vahe ( $\sim 0.03$ ).

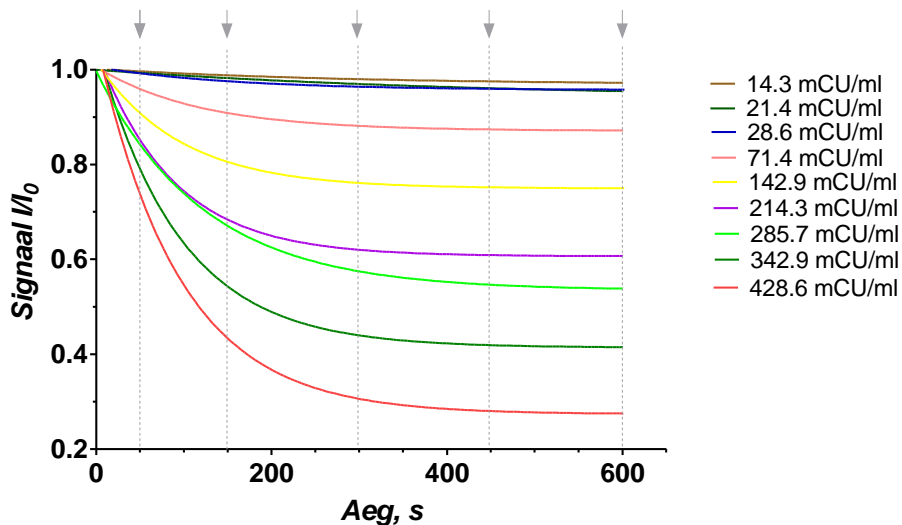


**Joonis 11–12.** CMC inkubeerimise aja ning GOD kontsentratsiooni mõju normaliseeritud signaali muutusele. Koostatud mudeli ennustatud ning eksperimentaalsete punktide kokkulangemine

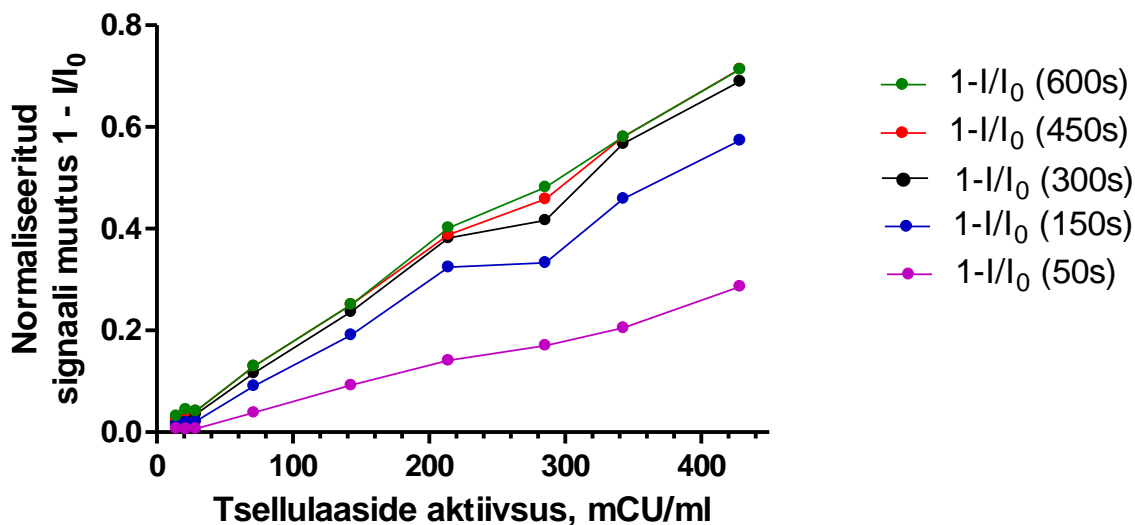
Vastavalt tehtud analüüsile ning töö eesmärkidele valiti kalibreerimisgraafiku mõõtmiste läbiviimisel CMC inkubeerimise ajaks 70 minutit, GOD kontsentratsiooniks 12 U/ml ning sensori signaali mõõdeti 600 s jooksul. Kuigi signaali registreeritakse 600 s jooksul, on võimalik signaali registreerimise aega varieerida ning koostada erinevate tõusude väärtustega kalibreerimisgraafikuid, mida on kommenteeritud järgnevas osas.

### 3.3. Tsellulaaside aktiivsuse määramine

Kalibreerimisgraafiku loomiseks tehti mõõtmised valitud tingimustel tsellulaaside aktiivsusega vahemikus 14.3 mCU/ml – 571.4 mCU/ml (joonis 13). Selgus, et 571.4 mCU/ml mõõtmisel jõudis hapnikusensori signaal juba enne 50s mõõtmist platoole, mistõttu koostati kalibreerimisgraafikud mõõtmistega vahemikus 14.3 mCU/ml – 428.6 mCU/ml. Samuti koostati kalibreerimisgraafikud signaali normaliseeritud muutustega ( $1 - I/I_0$ ) ajahetkedel 50 – 600 s (joonis 14, tabel 7).



**Joonis 13.** Signaali mõõtmise aja ja registreeritud signaali suhe erinevatel tsellulaasi kontsentratsioonidel



**Joonis 14.** Normaliseeritud signaali muutuse sõltuvus tsellulaaside aktiivsusest ajahetkel 50-600s

**Tabel 7.** Ajahetkel 50 – 600s teostatud kalibreerimisgraafikute vahemikus 14.3 mCU/ml – 428.6 mCU/ml iseloomustus

Signaali mõõtmise hetk (s)	Kalibreerimisgraafiku tõus	Kalibreerimisgraafiku $R^2$
50	$(0.650 \pm 0.023) \times 10^{-3}$	0.9915

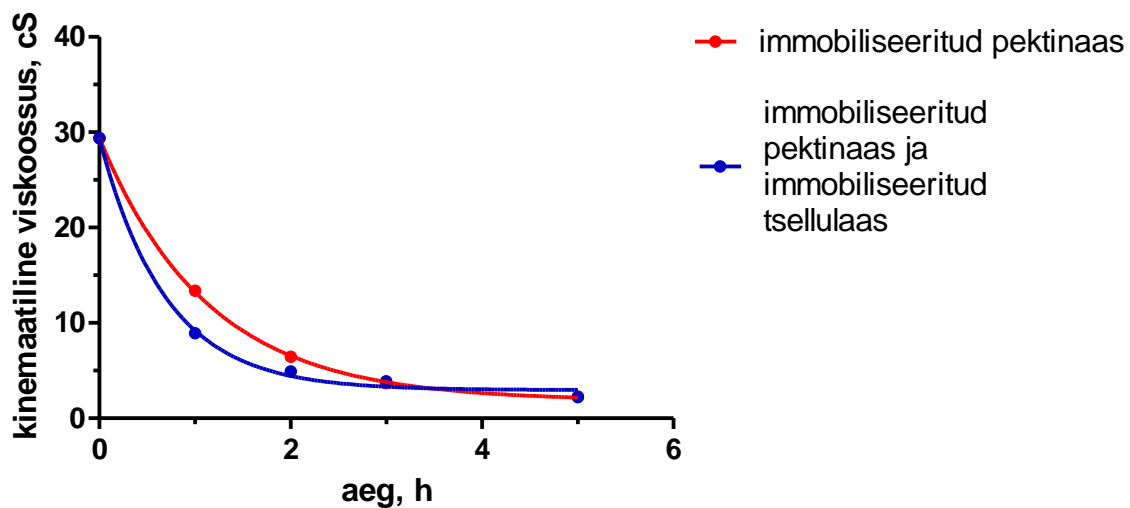
150	$(1.347 \pm 0.059) \times 10^{-3}$	0.9867
300	$(1.616 \pm 0.053) \times 10^{-3}$	0.9925
450	$(1.662 \pm 0.034) \times 10^{-3}$	0.9971
600	$(1.699 \pm 0.035) \times 10^{-3}$	0.9970

Kõikide koostatud kalibreerimisgraafikute korral on vabaliikme väärtus tühiselt väike (signaalimuutus <1%), mistõttu järeldati, et kalibreerimisgraafikud läbivad koordinaatide alguspunkti ning taustasignaali puudub. Erinevatel signaali mõõtmise hetkedel koostatud kalibreerimisgraafikutel on erinev määramispiir ( $3 \times$  vabaliikme määramatuse väärtus), kusjuures parima tulemuse annavad pikemaajalised mõõtmised (450s ja 600 s) mille määramispiir on ~14 mCU/ml. Ülejäänutel ajahetkedel koostatud kalibreerimisgraafikutelt saadud määramispiirid jäid vahemikku 22 mCU/ml – 29.5 mCU/ml. Antud meetodi ajakulu on sarnane kasutusel olevate tsellulaasid aktiivsust määravate meetodite ajakuluga, kuid on üks täpsemaid ja tundlikumaid [14–24]. Antud meetod võimaldab korrektselt määrata nii solubiliseeritud kui ka immobiliseeritud tsellulaasid aktiivsust erinevalt mitmetest teistest kasutusel olevatest meetoditest, mis ei võimalda korrektselt määrata immobiliseeritud ensüümi aktiivsust, sest hüdrolüüsiv substraat on tahkel kujul ning vajab seega solubiliseeritud ensüümide kasutamist [17,19,21,24]. Antud meetodi oluline eelis on ka lihtsus: määramine toimub konstantsel temperatuuril, konstantsel pH väärtusel ning valmistada on vaja vaid glükoosi oksüdaasi ning CMC lahused. Samuti on võimalik läbi viia mitmeid mõõtmisi paralleelselt, sest põhiline aeg kulub proovi inkubeerimiseks väljaspool mõõterakku. Antud meetodi läbiviimise tingimuste modifitseerimisega on võimalik lihtsalt muuta määratavat tsellulaasid aktiivsuse vahemikku.

### 3.4. Nailon-6,6 niidile immobiliseeritud tsellulaasid

Nailon-6,6 niidile immobiliseeritud tsellulaasipreparaadi aktiivsuseks määrati 0.137 CU ühe meetri niidi kohta. Immobiliseerimisel õnnestus seega siduda ligikaudu 0.54% immobiliseerimislahuses leidunud solubiliseeritud ensüümi. Ensüümi immobiliseerimise saagis

oli väga madal ning selle suurendamiseks on edaspidi vaja optimiseerida immobiliseerimise protsessi. Immobiliseeritud tsellulaasiga niite kasutati koos immobiliseeritud pektinaasidega mustsõstra mahla töötlemisel. Immobiliseeritud ensüümide mõju hinnati mahla viskoossuse muutumise alusel aias mahla ensümeerimisel 40°C juures (joonis 15). Selgus, et pektinaasi ja tsellulaasi koosmõjul väheneb mahla viskoossus kiiremini kui ainult pektinaasi kasutades, mis kinnitab tsellulaaside olulisust taimerakkude hüdrolyüsamise katalüsaatorina ning näitab immobiliseeritud ensüümide kasutamise potentsiaali.



**Joonis 15.** Kinemaatilise viskoossuse languse erinevus kahe immobiliseeritud ensüümide koosluse kasutamise vahel

## KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli töötada välja meetod tsellulaasse aktiivsuse amperomeetriliseks määramiseks, millega saaks võimalikult lihtsalt, tundlikult ja kiiresti määrata solubiliseeritud ja kandjale immobiliseeritud ensüümide aktiivsust. Lisaks immobiliseeriti tsellulaasi preparaati nailon-6,6 niidile, määrati immobiliseeritud ensüümi aktiivsus ning immobiliseeritud ensüümi kasutati koos immobiliseeritud pektinaasiga mustsõstramahla töötlemisel.

Tsellulaasse aktiivsuse määramise meetod põhineb tselluloosi hüdrolüüsil tekkiva glükoosi määramisel hapnikuanduril põhineva biosensoriga. Esmalt leiti meetodi läbiviimiseks optimaalsed tingimused, kasutades vastavusfunktsioonide meetodit. Kasutades leitud optimaalseid mõõtetingimusi koostati kalibreerimisgraafikud tsellulaasse aktiivsuse määramiseks vahemikus 14.3 mCU/ml kuni 428.6 mCU/ml. Koostati kalibreerimisgraafikud tsellulaaside aktiivsuse ning normaliseeritud signaali muutuse  $1 - I/I_0$  vahel ajahetkedel 50 – 600 sekundit, mis olid lineaarsed ning mille korrelatsioonikordaja  $R^2$  jäi vahemikku 0.987 – 0.997, määramispiiriks saadi 14 mCU/ml. Meetod jääb oma ajakulu poolest teiste tsellulaasset aktiivsust määravate meetodite vahemikku, olles määramispiiri ning täpsuse poolest esiosas. Samuti on lihtne muuta tsellulaasse aktiivsuse mõõtmise vahemikku, muutes selleks glükoosi oksüdaasi kontsentratsiooni ja CMC-ga inkubeerimise aega.

Tsellulaase immobiliseeriti nailon-6,6 niidile ning immobiliseeritud ensüümi aktiivsuse amperomeetrilisel määramisel saadi tulemuseks 0.137 CU ühe meetri niidi kohta. Niiti kasutati koos immobiliseeritud pektinaasiga mustsõstramahla töötlemisel, kus saadi kinnitus immobiliseeritud tsellulaaside kasutamise potentsiaali kohta mahlatööstuses.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. A. Kumar V, R. Kurup, C. Snishamol, G. Prabhu, Role of Cellulases in Food, Feed, and Beverage Industries: Enzymes in Industrial Food Processing, in: 2019: pp. 323–343.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Plant Cell Wall.
3. M.P. Ansell, L.Y. Mwaikambo, 2 - The structure of cotton and other plant fibres, in: S.J. Eichhorn, J.W.S. Hearle, M. Jaffe, T. Kikutani (Eds.), Handbook of Textile Fibre Structure, Woodhead Publishing, 2009: pp. 62–94.
4. B. Rani, A. Kawatra, Fibre constituents of some foods, Plant Foods for Human Nutrition. 45 (1994) 343–347.
5. J.W.A. Pat Baird, Richard H Davis, Stefanie Ferreri, Mary Knudtson, Ashraf Koraym, Valerie Waters, Christine L Williams, Healthy benefits of dietary fiber, in: Nutrition Reviews, pp. 188–205.
6. BRENDA: The Comprehensive Enzyme Information System Release 2021.1 <https://www.brenda-enzymes.org/> Viimati allalaaditud 18.05.2021, Brenda Enzymes. (n.d.).
7. Cellulase, Chemical book [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_cb6402855.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb6402855.htm) Viimati allalaaditud 10.05.2021.
8. Sigma-Aldrich Cellulase from Aspergillus niger <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1184?lang=en&region=EE> Viimati allalaaditud 01.05.2021.
9. C.C. Hsieh, D. Cannella, H. Jørgensen, C. Felby, L.G. Thygesen, Cellulase Inhibition by High Concentrations of Monosaccharides, J. Agric. Food Chem. 62 (2014) 3800–3805.
10. M. Suleiman, C. Schröder, B. Klippel, C. Schäfers, A. Krüger, G. Antranikian, Extremely thermoactive archaeal endoglucanase from a shallow marine hydrothermal vent from Vulcano Island, Applied Microbiology and Biotechnology. 103 (2019) 1267–1274.
11. AG Scientific The Importance of Enzyme Immobilization <https://agscientific.com/> Viimati allalaaditud 19.05.2021.
12. K. Kivirand, T. Rincken, Preparation and Characterization of Cadaverine Sensitive Nylon Threads, Sensor Letters. 7 (2009) 580–585.
13. Varnakavi. Naresh, N. Lee, A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors, Sensors. 21 (2021).
14. ABCAM Cellulase Activity Assay kit (Fluorometric) (ab189817) <https://www.abcam.com/cellulase-activity-assay-kit-fluorometric-ab189817.html> Viimati allalaaditud 19.05.2021.
15. BioVision Incorporated Cellulase Activity Assay Kit (Fluorometric) <https://www.biovision.com/cellulase-activity-assay-kit-fluorometric.html> Viimati allalaaditud 19.05.2021.
16. Megazyme Cellulase Assay Kit (CELLG5) and (CELLG3) <https://www.megazyme.com/> Viimati allalaaditud 19.05.2021.
17. B. Hendel, J. Marxsen, Viscosimetric Determination of Endocellulase Activity, in: F. Bärlocher, M.O. Gessner, M.A.S. Graça (Eds.), Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide, Springer International Publishing, Cham, 2020: pp. 405–410.
18. S. Hvidt, Rapid discrimination of endo- and exo-cellulases, in: 2016.

19. Perten Instruments Method Description RVA Method 19.04 [https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP\\_RVA\\_Cellulase.pdf](https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_RVA_Cellulase.pdf) Viimati allalaaditud 20.05.2021.
20. D.E. Eveleigh, M. Mandels, R. Andreotti, C. Roche, Measurement of saccharifying cellulase, *Biotechnology for Biofuels*. 2 (2009) 21.
21. M. Camassola, A. Dillon, Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and Efficient, *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 01 (2012).
22. A.R. Ferrari, Y. Gaber, M.W. Fraaije, A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection, *Biotechnology for Biofuels*. 7 (2014) 37.
23. W. Schwald, M. Chan, C. Breuil, J. Saddler, Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 28 (1988) 398–403.
24. D. Fapyane, E.E. Ferapontova, Electrochemical Assay for a Total Cellulase Activity with Improved Sensitivity, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3959–3965.
25. Statease Design Expert <https://www.statease.com/> Viimati allalaaditud 01.05.2021.
26. J.S. Rao, B. Kumar, 3D Blade root shape optimization, in: 10th International Conference on Vibrations in Rotating Machinery, Woodhead Publishing, 2012: pp. 173–188.
27. H.H. Parikh, P.P. Gohil, 13 - Experimental determination of tribo behavior of fiber-reinforced composites and its prediction with artificial neural networks, in: M. Jawaid, M. Thariq, N. Saba (Eds.), *Durability and Life Prediction in Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites*, Woodhead Publishing, 2019: pp. 301–320.
28. S. Jayasekara, R. Ratnayake, *Microbial Cellulases: An Overview and Applications*, in: 2019.
29. P.K. Gupta, S. Raghunath, D. Venkatesh Prasanna, P. Venkat, V. Shree, C. Chithananthan, S. Choudhary, K. Surender, K. Geetha, An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications, in: 2019.
30. A. Nawirska-Olszańska, M. Kwaśniewska, Dietary fibre fractions from fruit processing waste, *Food Chemistry*. 91 (2005) 221–225.
31. L. Laasik, *Ensümaatilise aktiivsuse määramine seedimist toetavates toidulisandites*, Tartu Ülikool, 2019.

# **Method for determining cellulase activity amperometrically and using it to measure the activity of immobilized cellulases**

Georg Nero

## **SUMMARY**

Cellulases are a group of enzymes, that catalyze the hydrolysis of different chemical bonds in cellulosic materials. Cellulases are used widely throughout different industries, most notably in paper, textile, food, juice and feed industries. The activity of cellulolytic enzymes is commonly expressed in cellulase units (CU) and determined using different methods. However, these methods are quite complex and time-consuming. In addition, the assessment of the activity of immobilized cellulases is problematic. The application of immobilized enzymes for industrial applications has 2 clear advantages: firstly it is possible to use enzymes several times, and secondly it allows an effective control of enzyme-catalyzed processes.

The purpose of the current work was to develop a method for the determination of cellulase activity, which is simple, quick and sensitive, while applicable to measure the activities of both solubilized and immobilized cellulases. The proposed method is based on amperometric determination of glucose with an oxygen sensor based biosensor. Glucose is the final product of cellulose hydrolysis and is thus suitable for total cellulase assay. Furthermore, the assay's conditions were optimized using response surface methodology (RSM). The proposed method was very sensitive and the LOD value was 14 mCU/ml.

Cellulase was immobilized on nylon-6,6 threads using dimethylsulfate and glutaraldehyde. The activity of the immobilized cellulase was 0.137 CU per 1 meter of thread. The threads with immobilized cellulase were used in combination with immobilized pectinase threads for the processing of blackcurrant juice. The results demonstrated the potential of using immobilized cellulases during the production and processing of juices.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Georg Nero,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose  
**Meetod tsellulaaside aktiivsuse määramiseks amperomeetriliselt ning selle kasutamine immobiliseeritud tsellulaasi aktiivsuse määramiseks**

mille juhendajad on Toonika Rinken ja Sana Ben Othman,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **04.06.2024** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Georg Nero

**26.05.2021**