



UNIVERZA
V LJUBLJANI

FKKT

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Tadej Menegatti, Polona Žnidaršič Plazl

Vaje iz biotransformacij

Ljubljana, 2025

VAJE IZ BIOTRANSFORMACIJ

Avtorja: dr. Tadej Menegatti, prof. dr. Polona Žnidaršič Plazl

Strokovni pregled: doc. dr. Aljaž Gaber, doc. dr. Rok Ambrožič

Oblikovanje in prelom: dr. Tadej Menegatti, prof. dr. Polona Žnidaršič Plazl

Slikovni material: dr. Tadej Menegatti, prof. dr. Polona Žnidaršič Plazl

Lektoriranje: Rok Janežič

Urednica založbe: doc. dr. Barbara Modec

© 2025 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Založila: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Za založbo: prof. dr. Andreja Žgajnar Gotvajn

1. spletna izdaja

Ljubljana, 2025

Vse pravice pridržane

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 244802819

ISBN 978-961-7078-59-6 (PDF)

URL: https://fkkt.uni-lj.si/fileadmin/user_upload/o_fakulteti/e_gradiva/Vaje_iz_biotransformacij-2025-Menegatti-Znidarsic_Plazl.pdf

Predgovor

Učbenik z navodili za laboratorijske vaje iz biotransformacij je prvenstveno namenjen študentom druge stopnje študijskega programa Kemijsko inženirstvo, ki med študijem izberejo predmet Biotransformacije. Predmet ponuja vpogled v biotransformacije za izvedbo kemijskih reakcij z visoko specifičnostjo in učinkovitostjo, ki v sodobni industrijski proizvodnji zaradi številnih prednosti in sonaravnosti vse bolj nadomeščajo konvencionalne kemijske procese.

V učbeniku so predstavljene tri laboratorijske vaje, ki študentom omogočajo praktično pridobivanje znanj o biotransformacijah na osnovi eksperimentalnih meritev in izračunov. Posamezne vaje imajo teoretični uvod in podpoglavja, ki študentom dajejo smernice za izdelavo poročil. Delo vključuje skupni teoretični uvod, ki podaja osnovna znanja o encimih in celicah kot izjemno učinkovitih in selektivnih biokatalizatorjih ter o imobilizaciji, ki zagotavlja njihovo dolgotrajno rabo in stabilizacijo.

Avtorja upava, da bo učbenik ne le omogočal pridobivanje osnovnih znanj o biotransformacijah, temveč tudi spodbudil študente k premisleku o širši uporabi biokatalizatorjev v kemijski in farmacevtski industriji, medicini, kmetijstvu ter proizvodnji energije in živil.

Iskrena zahvala za prispevek k nastanku tega dela gre izr. prof. dr. Heleni Podgornik, ki je pripravila osnovna navodila za vajo o encimski kinetiki s pripadajočim teoretičnim uvodom, objavljena v učbeniku »Vaje iz biotehnologije« avtoric Polone Žnidaršič-Plazl in Helene Podgornik. Prav tako se zahvaljujeva obema recenzentoma, doc. dr. Roku Ambrožiču in doc. dr. Aljažu Gabru, za konstruktivne pripombe, in Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani za odobritev in podporo izdaje.

Tadej Menegatti in Polona Žnidaršič Plazl

Ljubljana, april 2025

Predgovor	3
Uvod v biotransformacije	6
Encimsko katalizirane reakcije	7
Kinetika encimsko kataliziranih reakcij	7
Merjenje encimske aktivnosti	10
Določanje specifične encimske aktivnosti	11
Imobilizacija biokatalizatorjev	11
Adsorpcija	12
Kovalentna vezava	12
Ujetje encima	12
Zamreževanje encimov	13
Merila za oceno uspešnosti imobilizacije encimov	13
Cilj laboratorijskih vaj	14
1. VAJA: Encimska kinetika: razgradnja škroba z α -amilazo	15
1 NAMEN VAJE	15
2 OSNOVE	15
2.1 Škrob	15
2.2 Značilnosti α -amilaze	16
2.3 Določanje aktivacijske energije reakcije	16
2.4 Določanje reducirajočih sladkorjev	17
.....	17
2.5 Določanje vsebnosti proteinov in specifične encimske aktivnosti	17
3 EKSPERIMENTALNA OPREMA IN REAGENTI	18
4 POTEK DELA	18
4.1 Vpliv koncentracije substrata na hitrost encimske hidrolize škroba	18
4.2 Vpliv temperature na hitrost encimske hidrolize škroba	19
4.3 Časovni potek encimske hidrolize škroba	19
4.4 Umeritvena krivulja za maltozo	19
4.5 Določanje koncentracije proteinov v pripravku α -amilaze z metodo po Bradfordu	19
5 PODATKI IN MERITVE	19
6 REZULTATI	20
2. VAJA: Biotransformacija fumarne v jabolčno kislino s kvasovkami	21
1 NAMEN VAJE	21
2 OSNOVE	21
2.1 Jabolčna kislina	21
2.2 Pridobivanje L-jabolčne kisline	21

2.3 Permeabilizacija celic	22
3 EKSPERIMENTALNA OPREMA IN REAGENTI	22
4 POTEK DELA	23
4.1 Priprava kulture kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1 dan pred izvedbo vaje)	23
4.2 Priprava suspenzije kvasovk in določitev suhe snovi celic	23
4.3 Priprava permeabiliziranih kvasovk	23
4.4 Biotransformacija fumarne v L-jabolčno kislino	23
4.5 Spektrofotometrično določanje koncentracije fumarata	24
5 PODATKI IN MERITVE	24
6 REZULTATI	25
3. VAJA: Imobilizacija biokatalizatorjev	26
1 NAMEN VAJE	26
2 OSNOVE	26
Ujetje (inkapsulacija) biokatalizatorja v porozno strukturo hidrogela	26
Zamreženi encimski agregati	27
Lipaze	28
3 EKSPERIMENTALNA OPREMA IN REAGENTI	28
4 POTEK DELA	29
Imobilizacija permeabiliziranih kvasovk	29
Biotransformacija s prostimi in imobiliziranimi kvasovkami	29
Imobilizacija lipaze v zamrežene encimske agregate	30
Določanje lipazne aktivnosti	30
Določanje izkoristka imobilizacije	30
5 PODATKI IN MERITVE	30
6 REZULTATI	31
Reference in viri	32

Uvod v biotransformacije

Biotransformacije so ključni procesi, pri katerih biološki sistemi, najpogosteje mikroorganizmi, njihovi sestavni deli ali izolirani in prečiščeni encimi, pretvorijo kemijske spojine v različne produkte. Te reakcije imajo pomembno vlogo v naravi, industriji in raziskavah, saj omogočajo nastanek biološko aktivnih spojin, razgradnjo onesnaževal ter pripravo visoko specifičnih kemikalij, ki jih pogosto ni mogoče enostavno sintetizirati s klasičnimi kemijskimi metodami. V naravi imajo biotransformacije ključno vlogo pri kroženju snovi, presnovi in razgradnji onesnaževal. Mikroorganizmi, npr., razgrajujejo kompleksne organske molekule v enostavnejše spojine, ki jih lahko drugi organizmi uporabijo za rast in preživetje (Faber, 2019).

Začetki uporabe biotransformacij segajo že stoletja nazaj, ko so procesi pridobivanja piva in pekovskih izdelkov temeljili na delovanju mikroorganizmov. V 19. stoletju je Louis Pasteur dokazal, da encimi iz živih organizmov katalizirajo biokemijske reakcije, kar je postavilo temelje encimologije. V začetku 20. stoletja so odkritja in izolacija specifičnih encimov omogočila nadzorovane biotransformacije, kar je vodilo do različnih načinov industrijske uporabe, kot je proizvodnja 6-aminopenicilanske kisline iz penicilina. Napredek molekularne biologije in genetskega inženiringa v poznem 20. stoletju je revolucioniral biokatalizo, saj je omogočil optimizacijo encimov in razvoj prilagojenih biokatalizatorjev za različne sintetične procese (Bornscheuer in Buchholz, 2005). V novem tisočletju so uporaba umetne inteligence in orodij usmerjene evolucije ter razvoj ultra hitrih presejalnih testov pri izboljšanju encimov, pa tudi nove tehnološke rešitve za izvedbo kontinuiranih kemoencimskih večstopenjskih sintez prispevali k izjemnemu razmahu uporabe biokatalize v trajnostni proizvodnji.

V industrijskem okolju biotransformacije omogočajo proizvodnjo visokovrednih produktov z visoko stopnjo specifičnosti. Klasični primeri vključujejo:

- Farmacevtska industrija: Encimske reakcije se uporabljajo za stereoselektivno sintezo zdravilnih učinkovin, kot so antibiotiki, antidiabetiki, steroidi, protitumorna zdravila itd.
- Živilska industrija: Biotransformacije omogočajo pridobivanje kisa, mleka brez laktoze, arom, barvil in drugih aditivov, ki so biološko bolj sprejemljivi kot njihovi sintetični analogi itd.
- Okoljevarstvo: Mikroorganizmi se uporabljajo za razgradnjo toksičnih spojin in bioremediacijo onesnaževal v tleh in vodi.

Biotransformacije imajo več pomembnih prednosti v primerjavi s klasičnimi kemijskimi metodami:

- **Visoka specifičnost:** Encimi omogočajo katalizo reakcij z visoko reakcijsko, regijsko in stereoselektivnostjo, kar znatno zmanjšuje nastajanje stranskih produktov in število potrebnih stopenj za pretvorbo.
- **Blagi pogoji reakcije:** Biotransformacije potekajo pri zmerni temperaturi, tlaku in pH, kar zmanjšuje energijske zahteve in negativne vplive na okolje.
- **Okoljska sprejemljivost:** Ker temeljijo na naravnih katalizatorjih in procesih, so biotransformacije okolju prijazne in trajnostne.

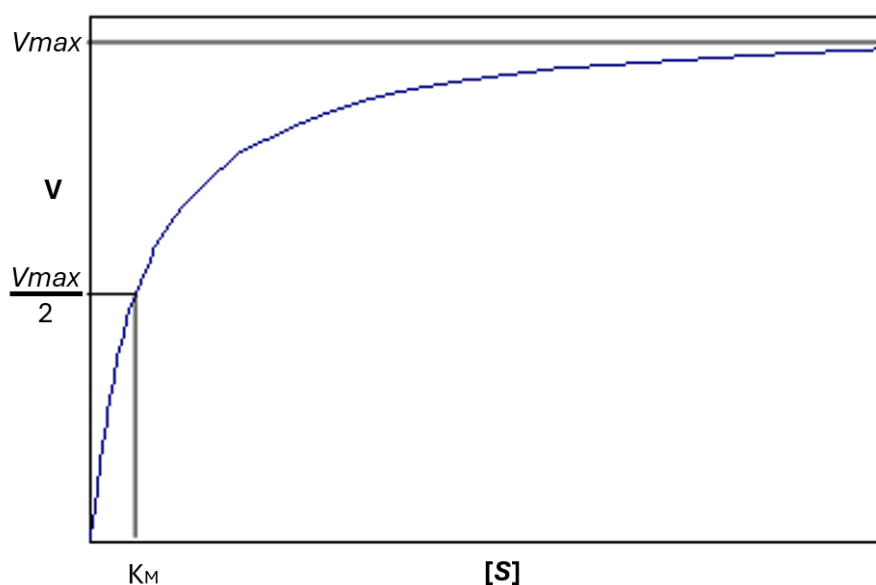
Kljub tem prednostim obstajajo tudi izzivi. Encimi in mikroorganizmi so pogosto občutljivi na spremembe v okolju, kar lahko vpliva na stabilnost in učinkovitost procesa. Poleg tega je za optimizacijo biotransformacij pogosto potrebna kompleksna razvojna faza, ki zahteva interdisciplinarno znanje iz biokemije, genetike, kemije in kemijskega inženirstva.

Encimsko katalizirane reakcije

Večina celičnih procesov temelji na reakcijah, ki jih katalizirajo encimi. To so pretežno globularni proteini, katerih katalitske sposobnosti temeljijo na ustrezni tridimenzionalni strukturi njihovih polipeptidnih verig. Poleg tega je lahko za njihovo funkcijo pomembna še prisotnost kofaktorjev ali koencimov (NAD^+ , hem, ogljikovi hidrati, kovinski ioni ...), ki so lahko na encim vezani kot prostetične skupine. Osnovno proteinsko podenoto, ki jo sestavljajo izključno aminokisline, povezane s peptidnimi vezmi, imenujemo apoencim. Skupaj s kofaktorjem tvorita holoencim. Za katalitsko aktivnost encima je ključno t. i. aktivno mesto, ki ga tvorijo prostorsko zelo specifično in natančno razporejene stranske skupine v protein vezanih aminokislin, ki vstopajo v interakcije s komplementarnimi skupinami substrata (Boyer, 2003; Fersht, 2017).

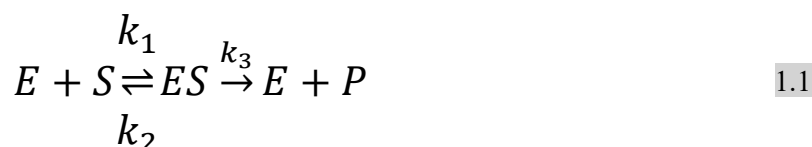
Kinetika encimsko kataliziranih reakcij

Po kratkem časovnem zamiku (nekaj sto mikrosekund) se koncentracija encimskega kompleksa s substratom ne spreminja, zato govorimo o **dinamičnem ravnotežju**, ko se tudi hitrost reakcije skoraj ne spreminja vse do močnega zmanjšanja koncentracije substrata. Za večino encimsko kataliziranih reakcij velja, da se njihova hitrost parabolno viša z naraščanjem koncentracije substrata (slika 1.1).



Slika 1.1: Odvisnost reakcijske hitrosti od koncentracije substrata pri encimsko katalizirani reakciji.

Encimsko reakcijo z enim substratom zapišemo kot (Ainsworth, 1977):



Prosti encim (E) s substratom (S) tvori **kompleks** ES , ki disociira v E in S , ali pa nadalje tvori produkt (P) in nespremenjen prosti encim.

Ko je doseženo dinamično ravnotežje, sta hitrosti tvorbe in razpada kompleksa ES enaki:

$$(k_2 + k_3)[ES] = k_1[E][S] \quad 1.2$$

Enačbo 1.2 lahko zapišemo tudi kot:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1} \quad 1.3$$

Imenovalc enačbe 1.3 definiramo kot **Michaelisovo konstanto** K_M :

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad 1.4$$

Predpostavimo, da je koncentracija substrata bistveno večja od koncentracije encima $[E]$, za katero lahko zapišemo:

$$[E] = [E_t] - [ES] \quad 1.5$$

pri čemer je $[E_t]$ celotna koncentracija encima. Zgornji izraz vstavimo v enačbo 1.3

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_M + [S]} \quad 1.6$$

Hitrost encimske reakcije v je odvisna od hitrosti pretvorbe kompleksa ES v P in E :

$$v = k_3[ES] \quad 1.7$$

Zgornjo enačbo vstavimo v enačbo 1.6 in dobimo:

$$v = k_3[E_t] \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad 1.8$$

Najvišja reakcijska hitrost v_{max} je dosežena, ko so vsa katalitska mesta encima zasedena s substratom. Zato velja:

$$v_{max} = k_3[E_t] \quad 1.9$$

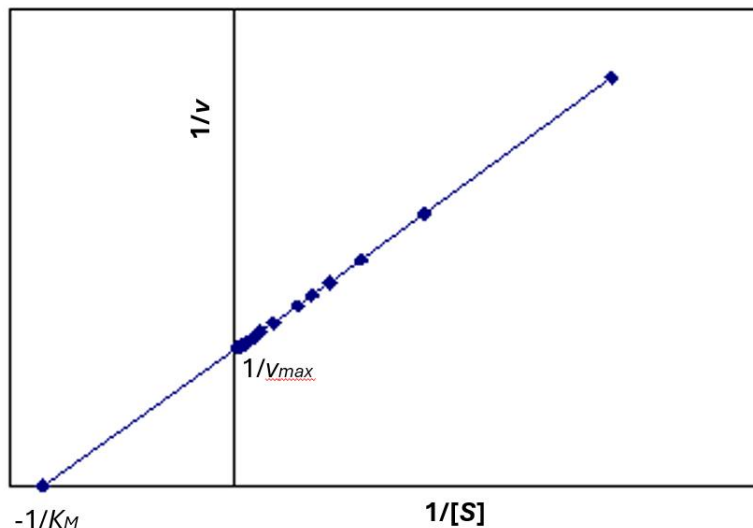
Z vstavitvijo gornjega izraza v enačbo 1.8 dobimo **enačbo po Leonorju Michaelisu in Maud Menten**:

$$v = v_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad 1.10$$

Enačba 1.10 nam pove, da je pri zelo majhnih koncentracijah substrata ($[S] \ll K_M$) hitrost reakcije sorazmerna koncentraciji substrata, medtem ko je pri velikih koncentracijah substrata enaka največji hitrosti encimske reakcije. Pri koncentraciji substrata $K_M = [S]$ velja:

$$v = v_{max} \frac{[S]}{[S] + [S]} = \frac{v_{max}}{2} \quad 1.11$$

Za določitev parametrov K_M in v_{max} lahko uporabimo različne metode. Najpogosteje se uporablja najenostavnejša linearizacija enačbe po Michaelisu in Mentenovi, t. i. **Lineweaver-Burkov** diagram, v katerega nanašamo odvisnost $1/[S]$ proti $1/v$ (slika 1.2). Iz naklona določimo K_M , iz presečišča pa v_{max} :



Slika 1.2: Lineweaver-Burkov diagram.

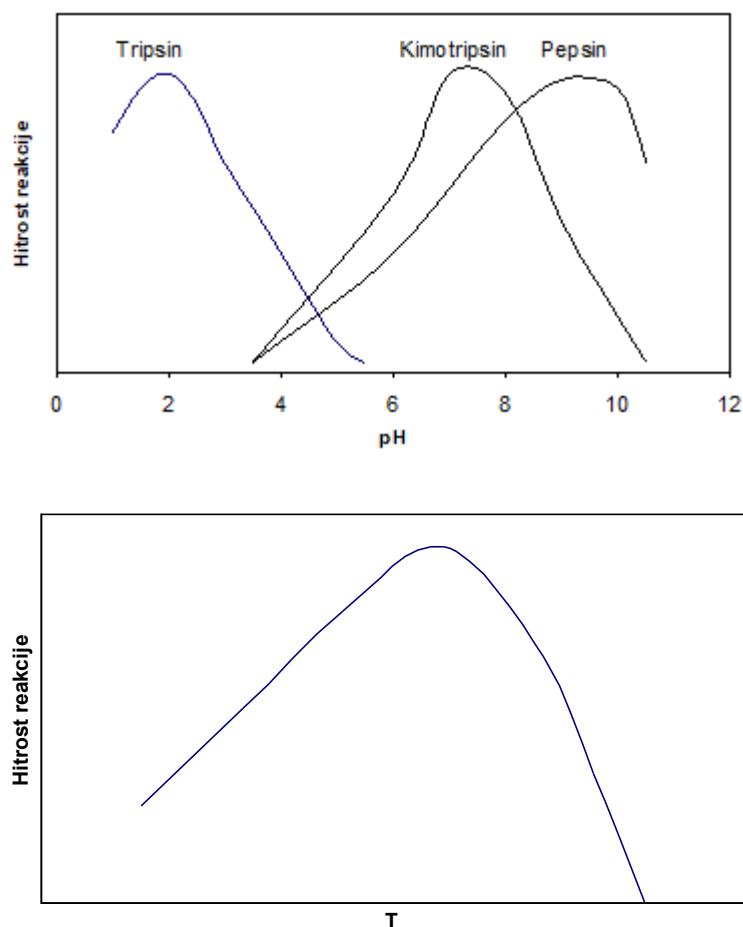
$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{v_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad 1.12$$

K_M vrednosti se med encimi zelo razlikujejo, navadno pa so med 10^{-1} in 10^{-9} M. Poleg lastnosti encima in vrste substrata nanjo vplivajo še temperatura, pH ter ionska moč.

Michaelisova konstanta K_M je koncentracija substrata, pri kateri je polovica aktivnih mest zasedena in je hitrost reakcije enaka polovici maksimalne hitrosti. Zato lahko z njeno pomočjo računamo delež zasedenosti aktivnih mest pri katerikoli koncentraciji substrata. Ker je odvisna od razmerja med disociacijo in tvorbo encimskega kompleksa, je lahko tudi merilo za šibkost ali jakost kompleksa ES .

Nazadnje je treba omeniti **pretvorbena frekvenca** k_{cat} , ki je sorazmerno številu molekul substrata, ki se z eno molekulo encima pretvorijo v produkt v določeni časovni enoti, ko je encim nasičen s substratom. Pretvorbena frekvenca je pri reakciji v enačbi 1.1 enaka kinetični konstanti k_3 , vpeljani z enačbo 1.9, ki se imenuje tudi katalitska konstanta. Vrednosti pretvorbene frekvence so med 1 in 40.000.000 [s^{-1}] (Boyer, 2003).

Hitrost encimskih reakcij je ključno odvisna od pH in temperature ter ima za vsak encim določen optimum (slika 1.3).



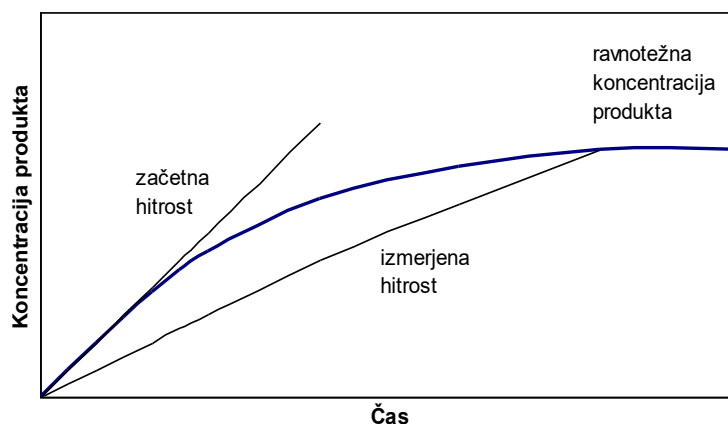
Slika 1.3: Primer vpliva pH-vrednosti ter temperature na hitrost encimsko katalizirane reakcije.

Merjenje encimske aktivnosti

Osnova vsakega dela z encimi je merjenje njihove aktivnosti – bodisi zato, ker raziskujemo mehanizme in snovi, ki neposredno vplivajo na katalitsko aktivnost, ali zato, ker je encimska aktivnost najobčutljivejša količina, ki nam pove, kolikšna je koncentracija encima. V ta namen najpogosteje uporabljamo določitev **enot encimske aktivnosti** na enoto volumna, ko je doseženo dinamično ravnotežje. Določitev encimske aktivnosti na osnovi t. i. metode začetne hitrosti temelji na merjenju hitrosti porabe substrata ali tvorbe produkta pri določenih pogojih. Mednarodna enota (U) je enaka količini encima, ki katalizira tvorbo 1 μ mola produkta na minuto pri definiranih pogojih (T, pH, koncentracija substrata, koncentracija koencima ...). Za določitev encimske aktivnosti je potreben standardni postopek, ki ga izberemo na osnovi občutljivosti, enostavnosti in cene. Najpriporočljiveje je izbrati splošno uveljavljeno metodo ali metodo s substratom, ki ga želimo pretvarjati. Za analizo nastalega produkta (ali porabljenega substrata) uporabljamo različne tehnike detekcije. Med najbolj razširjene sodijo spektrofotometrične metode.

Navadno je encim v vzorcih prisoten v limitnih (»katalitskih«) količinah. Določitev encimske aktivnosti temelji na tem, da je začetna hitrost reakcije premo sorazmerna celotni koncentraciji encima. Razmerje med hitrostjo in celotno koncentracijo encima pa je linearno le v dokaj ozkem časovnem območju. Zato naj bi bila hitrost tvorbe produkta konstantna preko celotnega časovnega intervala izvajanja encimskega

testa. V tem času naj se ne bi pretvorilo več kot 5 % celotne količine substrata. Če se tega ne držimo, pride do bistvenega odstopanja med izmerjeno in dejansko začetno hitrostjo encimske reakcije (slika 1.4) (Žnidaršič-Plazl in Podgornik, 2011).



Slika 1.4: Vpliv načina merjenja na določitev hitrosti encimske reakcije.

Določanje specifične encimske aktivnosti

Z upoštevanjem celotne koncentracije proteina dobimo specifično aktivnost, ki jo izražamo v enotah na mg proteina. Specifično encimsko aktivnost izračunamo glede na maso encima in jo izražamo v $\text{U/mg}_{\text{encima}}$. Ker uporabljeni encimski pripravki niso nujno prečiščeni, je pogosto podajanje specifične aktivnosti glede na celotno koncentracijo proteina v reakcijski mešanici ($\text{U/mg}_{\text{proteina}}$), ki jo predhodno ovrednotimo z ustrežno analitsko metodo. V rabi je tudi izražanje na maso celotnega pripravka ($\text{U/mg}_{\text{pripravka}}$), pri celicah pa za normiranje največkrat uporabimo maso suhe snovi celic ($\text{U/mg}_{\text{ss celic}}$).

Imobilizacija biokatalizatorjev

Imobilizacija je postopek, pri katerem biokatalizator – bodisi celo celico ali izoliran encim – omejimo na določen prostor (pogosto s pritrditvijo na nosilec), pri čemer ohrani svojo katalitsko aktivnost. Imobiliziran encim deluje kot heterogen biokatalizator, kar omogoča enostavno ločevanje od reaktantov in ponovno uporabo. To bistveno znižuje stroške čiščenja produktov v zaključnih fazah procesa (Guisan idr., 2020).

Na voljo so različne tehnike imobilizacije, zlasti izoliranih encimov (slika 1.5). Te vključujejo:

- **adsorpcijo,**
- **kovalentno vezavo,**
- **ujetje v porozno strukturo,**
- **inkapsulacijo in**
- **zamreževanje.**



Slika 1.5: Različne tehnike imobilizacije biokatalizatorjev (Nguyen in Kim, 2017).

Adsorpcija

Adsorpcija je najpogostejše uporabljena tehnika imobilizacije, ki temelji na šibkih interakcijah, kot so van der Waalsove sile ter elektrostatske in hidrofobne interakcije. Proces je enostaven in na splošno neškodljiv za encim, saj ne zahteva funkcionalizacije nosilca. Slabost adsorpcije je šibka vezava encima na nosilec, kar lahko ob spremembah temperature, pH ali ionske moči vodi do desorpcije. Prav tako so lahko nosilci dražji, kar omejuje industrijsko uporabo (Mohamad idr., 2015).

Kovalentna vezava

Pri kovalentni vezavi encim trajno pritrdimo na nosilec z močnimi kovalentnimi vezmi. Funkcionalne skupine na encimu, ki sodelujejo v vezavi, ne smejo vplivati na njegovo katalitsko aktivnost. Najpogostejše se uporabljajo:

- amino skupine (lizinski ostanki),
- tiolne skupine (cisteinski ostanki) in
- karboksilne skupine (asparaginska in glutaminska kislina).

Postopek vključuje aktivacijo površine nosilca z vezavnimi molekulami (npr. glutaraldehyd, karbodiimid) in nato kovalentno vezavo encima na aktivirano površino. Prednost te metode je visoka stabilnost encima, saj ni večjega izpiranja, slabost pa je tveganje za denaturacijo encima zaradi kemijske modifikacije (Nguyen in Kim, 2017).

Ujetje encima

Pri ujetju encima se encim ne veže neposredno na nosilec, temveč je fizično zadržan znotraj porozne strukture matrice. Ta struktura omogoča prenos substratov in produktov, encim pa ostaja ujet v porah. Zaradi tega metoda ne povzroča denaturacije encima. Mikrookolje za encim je mogoče prilagoditi z modifikacijo matrice, da se optimizira pH in polarno okolje. Slabosti te tehnike vključujejo povečan upor proti prenosu snovi ter nižje razmerje med količino imobiliziranega encima in maso nosilca (Datta idr., 2013).

Zamreževanje encimov

Zamreževanje vključuje povezovanje encimskih molekul v trdno strukturo z intermolekularnimi kovalentnimi vezmi. Tehnika uporablja zamreževalce, kot sta glutaraldehid in dekstran, ki povežejo amino skupine lizinskih ostankov med molekulami encima (R. A. Sheldon, 2007). Poznamo dve glavni obliki zamreževanja:

- **zamreženi encimski agregati** (angl. *crosslinked enzyme aggregates*, CLEAs) in
- **zamreženi encimski kristali** (angl. *crosslinked enzyme crystals*, CLECs).

Pri zamreženih agregatih se encim najprej obori v agregat z dodatkom soli, organskih topil ali neionskih polimerov, nato pa se molekule povežejo z zamreževalcem.

Merila za oceno uspešnosti imobilizacije encimov

Pri imobilizaciji biokatalizatorja je zelo pomemben vpliv procesa imobilizacije na aktivnost biokatalizatorja. Trije izrazi, ki se najpogosteje uporabljajo za določanje uspešnosti imobilizacije encima, so izkoristek imobilizacije, učinkovitost imobilizacije ter zadržana aktivnost (Roger A. Sheldon in van Pelt, 2013). Izkoristek imobilizacije (angl. *immobilization yield*) nam pove, koliko biokatalizatorja se je uspešno zadržalo oz. imobiliziralo na nosilec.

$$\text{Izkoristek imobilizacije [\%]} = 100 \cdot \frac{A_{\text{imob}}}{A_{\text{prosti}}} \quad 1.13$$

Aktivnost imobiliziranega encima je ob predpostavki, da se med imobilizacijo aktivnost ne izgubi in je enaka aktivnosti prostega encima v začetni raztopini zmanjšana za aktivnost prostega encima v raztopini po koncu imobilizacije (v supernatantu):

$$A_{\text{imob}} = A_{\text{prosti}} - A_{\text{supernatant}} \quad 1.14$$

Učinkovitost imobilizacije (angl. *immobilization efficiency*) je razmerje med opazovano aktivnostjo, ki jo določimo imobiliziranemu encimu, ter teoretično aktivnostjo, ki bi jo moral imeti imobiliziran biokatalizator v primeru neizgube aktivnosti med imobilizacijo:

$$\text{Učinkovitost imobilizacije [\%]} = 100 \cdot \frac{A_{\text{opazovana}}}{A_{\text{imob}}} \quad 1.15$$

Zadržana aktivnost (angl. *recovered activity*) je izraz, ki nam pokaže uspešnost celotnega procesa imobilizacije ter je definiran kot razmerje med opazovano aktivnostjo in aktivnostjo začetnega prostega encima; določimo jo lahko tudi kot produkt izkoristka in učinkovitosti imobilizacije:

$$\text{Zadržana aktivnost [\%]} = 100 \cdot \frac{A_{\text{opazovana}}}{A_{\text{prosti}}} \quad 1.16$$

Cilj laboratorijskih vaj

V sklopu laboratorijskih vaj pri predmetu Biotransformacije boste spoznali temeljne zakonitosti teh reakcij in uporabo encimov kot biokatalizatorjev za izvedbo specifičnih biotransformacij. Preučili boste, kako reakcijski pogoji vplivajo na delovanje encimov ter kako lahko določimo učinkovitost in specifičnost biokatalizatorjev.

Poleg tega boste spoznali tehnike imobilizacije encimov in celic, ki omogočajo njihovo večkratno uporabo, povečano stabilnost in enostavnejše ločevanje od reakcijskih produktov.

Z razumevanjem osnovnih načel in s praktično izkušnjo boste pridobili znanje, ki je ključno za uporabo biotransformacij v znanstvene in industrijske namene.

1. VAJA: Encimska kinetika: razgradnja škroba z α -amilazo

1 NAMEN VAJE

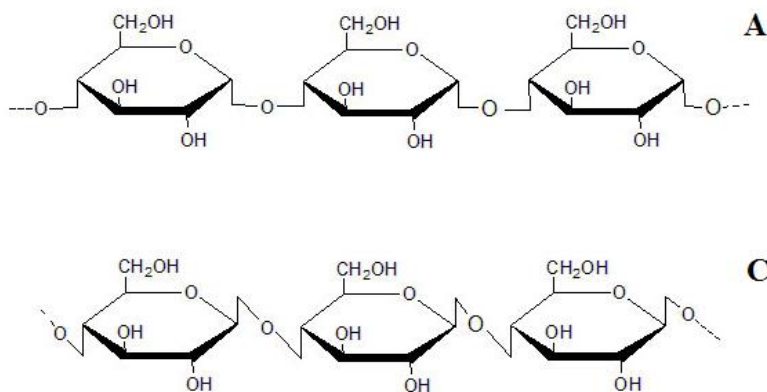
Proučevanje delovanja encimov in nekaterih dejavnikov (koncentracija substrata, temperature), ki nanj vplivajo. Uporaba metode za določanje koncentracije reducirajočih sladkorjev. Spoznavanje kinetike encimske reakcije ter določanje parametrov enačbe po Michaelisu in Mentenovi za hidrolizo škroba z α -amilazo. Določanje aktivacijske (E_a) in deaktivacijske (E_d) energije. Določanje koncentracije proteinov ter specifične encimske aktivnosti.

2 OSNOVE

Večina osnov za razumevanje vaje je podana v osnovah, dodanih je le nekaj specifičnosti obravnavanega sistema substrat–encim, analizna metoda za določanje produkta encimske reakcije. Prav tako je dodano določanje (de)aktivacijske energije reakcijskega sistema ter določanje koncentracije proteina in specifične encimske aktivnosti.

2.1 Škrob

Škrobne snovi za večino ljudi in številne živalske vrste predstavljajo glavni del prehrane, saj zagotavljajo potrebe po ogljikovih hidratih. Prisotne so v številnih rastlinah, še posebej v koruzi, rižu, pšenici, ječmenu itd. Podobno kot je celuloza polisaharid, zgrajen iz D-glukočnih monomerov, povezanih z β -1,4 vezmi (C na sliki 2.1), je tudi molekula škroba polisaharid iz D-glukočnih enot, ki pa so med sabo povezane z drugačnimi vezmi. Amiloza (A na sliki 2.1), ki je polisaharid iz D-glukočnih enot, povezanih z α -1,4 glikozidnimi vezmi, sestavlja 20–30 % škroba, preostali del pa je amilopektin, ki ima podobno strukturo kot amiloza, le da je molekula razvejana – na glavno verigo so pritrjene stranske verige, povezane z α -1,6 glikozidno vezjo.



Slika 2.1: Strukturni formuli amiloze (A) in celuloze (C).

2.2 Značilnosti α -amilaze

α -amilaza je encim, ki katalizira razcep notranjih α -1,4 glukanskih vezi dolgih linearnih polisaharidov, ki vsebujejo 3 ali več α -1,4- vezane D-glukoze. Amilazna aktivnost je prisotna v večini živih organizmov, vendar se amilaze znatno razlikujejo glede na tkivo, v katerem jih najdemo. Pri ljudeh amilazo najdemo v slini in trebušni slinavki. Encim je glikoprotein z molsko maso 50.000-54.000 g/mol. Proteinsko verigo sestavlja 475 aminokislinskih ostankov, vsebuje dve sulfhidrilni skupini in štiri S-S vezi. Nanjo je vezan tudi Ca^{2+} . Optimalna pH-vrednost za delovanje α -amilaze je 7,0, za njeno stabilnost pa so potrebni kalcijevi in kloridni ioni.

2.3 Določanje aktivacijske energije reakcije

Aktivacijska energija je definirana kot najmanjša količina energije, ki je potrebna, da steče kemijska reakcija. Encimi delujejo kot katalizatorji in zmanjšujejo aktivacijsko energijo, zato reakcije potekajo hitreje. Aktivacijsko energijo (E_a) in deaktivacijsko energijo (E_d) reakcij računamo s pomočjo Arrheniusove enačbe, ki podaja odvisnost konstante hitrosti k od temperature T (K) kot:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad \text{oz.} \quad k = A \quad 2.1$$

kjer je A predeksponentni faktor in R plinska konstanta (8,32 J/mol·K).

S preureditvijo enačbe dobimo:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R \cdot T} \quad \text{oz.} \quad \ln k = \ln A - \frac{E_d}{R \cdot T} \quad 2.2$$

Za encimske reakcije velja, da je:

$$v_o = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{in} \quad V_{max} = k_{cat} \cdot [E] \quad 2.3$$

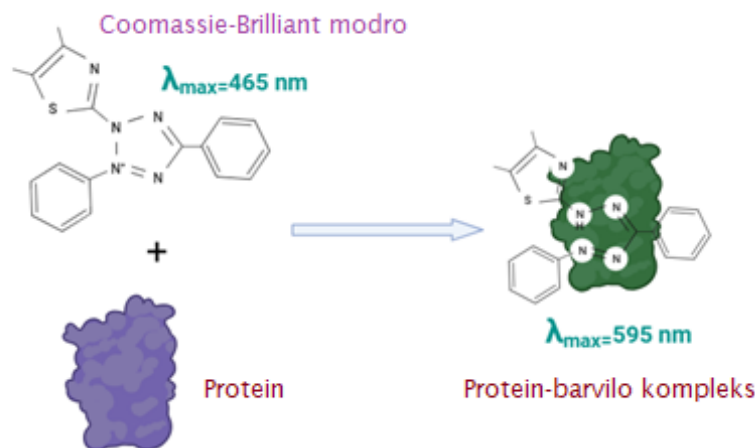
kjer je $[S]$ koncentracija substrata, k_{cat} pretvorbena frekvenca in $[E]$ koncentracija encima.

Ker tudi za encimsko katalizirane reakcije do dosega optimalne temperature (z nadaljnjim višanjem temperature pride do deaktivacije zaradi konformacijskih sprememb in končne denaturacije) velja Arrheniusova odvisnost od temperature, lahko zapišemo:

$$k_{cat} = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad 2.4$$

$$\text{oz.} \quad \ln k_{cat} = \ln A - \frac{E_a}{R \cdot T}$$

E_a določamo z merjenjem začetne hitrosti reakcije (v_o) pri različnih temperaturah in izrišemo diagram, predstavljen na sliki 2.2. Iz naklona premice, ki je enak $-E_a/R$, lahko izračunamo E_a . Iz podatkov nad optimalno temperaturo, kjer pride do znižanja začetne hitrosti reakcije, pa analogno enačbi (4) izračunamo deaktivacijsko energijo E_d .



Slika 2.4: Reakcija določanja koncentracije proteinov po Bradfordu (<https://sciencevidid.com/estimation-of-protein-by-bradford-method/>).

3 EKSPERIMENTALNA OPREMA IN REAGENTI

- Steklovina (epruvete z zamaški, pipete, bučke, čaše)
- Avtomatske pipete
- Vorteks
- Termostatirano mešalo
- Spektrofotometer
- Fosfatni pufer: 0,006 M NaCl v 0,2 M NaH₂PO₄, pH 6,9
- Raztopina škroba v fosfatnem pufru (5 g/L)
- 5 mM raztopina maltoze v fosfatnem pufru
- Ustrezno, v pufru, razredčena raztopina bakterijske α -amilaze (Novo Nordisk, Danska)
- 2 M vodna raztopina NaOH
- Reagent s 3,5-dinitrosalicilno kislino (DNS)
- Reagent za določanje proteinov po Bradfordu (Coomassie-Brilliant modro)
- 5 g L⁻¹ raztopina BSA v fosfatnem pufru

4 POTEK DELA

4.1 Vpliv koncentracije substrata na hitrost encimske hidrolize škroba

V 6 epruvet z obrusi prenesite po 2 mL raztopine škroba s koncentracijami 1,5, 2, 3, 4, in 5 g L⁻¹. Dodajte 0,5 mL encimske raztopine in inkubirajte 1 min na sobni temperaturi. Reakcijo prekinite z dodatkom 0,5 mL 2 M raztopine NaOH. Nato dodajte 1 mL DNS reagenta in segrevajte epruvete v vreli vodni kopeli 5 min. Ohladite na sobno temperaturo, dobro premešajte in odčitajte absorbanco pri 540 nm. Slep vzorec pripravite z raztopino škroba koncentracije 5 g L⁻¹ na enak način, le da namesto raztopine encima dodate pufer.

4.2 Vpliv temperature na hitrost encimske hidrolize škroba

V epruvete z obrusi odpipetirajte po 2 mL raztopine škroba koncentracije 5 g L^{-1} ter jih inkubirajte v ledeni kopeli, pri sobni temperaturi, pri 35, 45, 55, 65, 75 in 85°C . Na isto temperaturo postavite še epruveto z raztopino encima. Po približno 5 min raztopini škroba dodajte 0,5 mL encimske raztopine, premešajte in inkubacijo nadaljujte pri zgoraj navedenih temperaturah še 1 min. Reakcijo prekinite z dodatkom 0,5 mL 2 M raztopine NaOH. Nato dodajte 1 mL DNS reagenta in segrevajte epruvete v vreli vodni kopeli 5 min. Ohladite na sobno temperaturo, dobro premešajte in odčitajte absorbanco pri 540 nm. Slepí vzorec pripravite na enak način, le da namesto raztopine encima dodate pufer.

4.3 Časovni potek encimske hidrolize škroba

V 6 epruvet z obrusi odpipetirajte po 2 mL škroba in dodajte 0,5 mL encimske raztopine. Posamične epruvete inkubirajte 0,5, 1, 2, 3, 5 in 7 min pri sobni temperaturi. Reakcijo prekinite z dodatkom 0,5 mL 2 M raztopine NaOH. Nato dodajte 1 mL DNS reagenta in segrevajte epruvete v vreli vodni kopeli 5 min. Ohladite na sobno temperaturo, dobro premešajte in odčitajte absorbanco pri 540 nm. Slepí vzorec pripravite na enak način, le da namesto raztopine encima dodate pufer.

4.4 Umeritvena krivulja za maltozo

Iz osnovne raztopine maltoze pripravite raztopine z 0,5, 1, 2, 3, 4 in 5 mM koncentracijo. Pripravite 6 epruvet z obrusi, v katere odpipetirajte po 3 mL raztopine maltoze vsake od zgoraj navedenih koncentracij. Dodajte 1 mL DNS reagenta. Dobro premešajte in segrevajte epruvete v vreli vodni kopeli 5 min. Po ohladitvi na sobno temperaturo odčitajte absorbanco pri 540 nm. Slepí vzorec pripravite na enak način, le da namesto raztopine maltoze uporabite pufer (Žnidaršič-Plazl in Podgornik, 2011).

4.5 Določanje koncentracije proteinov v pripravku α -amilaze z metodo po Bradfordu

Odpipetirajte 50 μL vzorca (konc. proteina od 0,05 do $1,4 \text{ g L}^{-1}$) in dodajte 1,5 mL Bradfordovega reagenta. Po 5 min inkubacije na sobni temperaturi izmerite absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Za slepi vzorec uporabite topilo (demineralizirana voda, pufer). Koncentracijo proteina v vzorcu določite iz umeritvene krivulje. To si pripravite iz raztopin govejega serumskega albumina v koncentracijah od 0,1 do $1,4 \text{ g L}^{-1}$.

5 PODATKI IN MERITVE

Grafično prikažite umeritveno krivuljo za maltozo in podajte enačbo umeritve premice. Tabelarično podajte odvisnost koncentracije maltoze od koncentracije substrata, temperature ter časa inkubacije. Pri različnih koncentracijah substrata poteka reakcije določite vrednosti začetnih hitrosti, v_o , ter izrišite Lineweaver-Burkov diagram. Ocenite vrednosti za V_{max} in K_M . Podajte izračunane vrednosti E_a in E_d , koncentracijo proteina v encimskem pripravku α -amilaze in specifično encimsko aktivnost.

6 REZULTATI

Grafično predstavite vpliv temperature na hitrost reakcije ter časovni potek hidrolize škroba. Podajte izračunane vrednosti V_{max} in K_M . Podajte izračunane vrednosti E_a in E_d , koncentracijo proteina v encimskem pripravku α -amilaze in specifično encimsko aktivnost.

2. VAJA: Biotransformacija fumarne v jabolčno kislino s kvasovkami

1 NAMEN VAJE

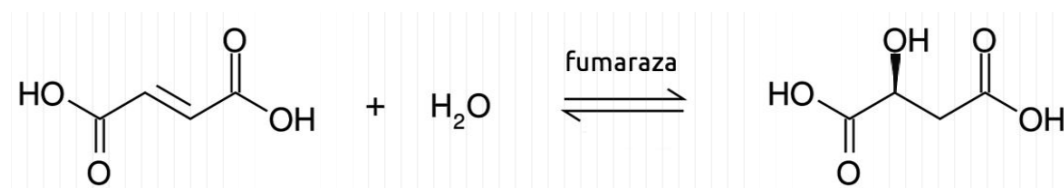
Določanje biokatalitske aktivnosti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* za pretvorbo fumarne kisline v L-jabolčno. Študij vpliva permeabilizacije celic na hitrost reakcije. Izračun volumetrične produktivnosti ter produktivnosti biokatalizatorja.

2 OSNOVE

2.1 Jabolčna kislina

Jabolčna kislina spada med visokotonažne kemikalije, saj njena letna poraba dosega približno 4000 ton. L-jabolčna kislina je naravna komponenta celičnega metabolizma, ki je v naravi močno razširjena, vendar običajno prisotna le v zelo nizkih koncentracijah. Uporablja se predvsem v farmacevtski, prehrabeni in kozmetični industriji kot acidulant, pogosto kot alternativa citrinski kislini. Poleg tega je učinkovita pri zdravljenju hiperamonemije (bolezni jeter) in je sestavni del nekaterih infuzijskih raztopin z aminokislinami.

2.2 Pridobivanje L-jabolčne kisline

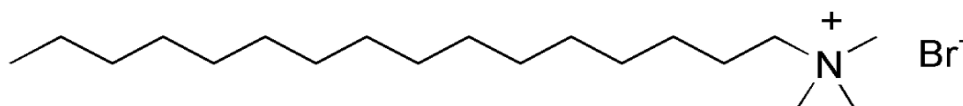


Slika 3.1: Biotransformacija fumarne v L-jabolčno kislino, katalizirana s fumarazo.

Tradicionalno so jabolčno kislino pridobivali z ekstrakcijo iz jabolčnega soka, kar pa je neučinkovito, saj jabolčni sok vsebuje le 0,4–0,7 % L-jabolčne kisline. S kemijsko hidratacijo fumarne kisline pridobimo racemno zmes D- in L-jabolčne kisline, medtem ko lahko s pomočjo biokatalizatorja fumaraze pridobimo izključno L-jabolčno kislino, ki je naravna oblika. Industrijska proizvodnja L-jabolčne kisline temelji na biotransformaciji fumarne kisline (slika 3.1), pri čemer se uporablja fumaraza iz celic mikroorganizmov, kot so *Corynebacterium glutamicum*, ali iz imobiliziranih celic *Brevibacterium flavum*. V zadnjem času raziskujejo tudi različne vrste kvasovk iz rodu *Saccharomyces*.

2.3 Permeabilizacija celic

Biotransformacijo lahko izvajamo z uporabo celotnih celic ali izoliranih encimov, pri čemer so izolirani encimi dražji katalizatorji. Pomanjkljivost pri uporabi celic je lahko neučinkovita difuzija substrata in produkta skozi celično membrano, kar je mogoče odpraviti z uporabo permeabiliziranih celic. Postopek permeabilizacije celic vključuje obdelavo s površinsko aktivnimi snovmi, kar poveča prepustnost celične membrane ter izboljša prenos substratov in produktov. Ta postopek obenem odstrani koencime in druge molekule z majhno molekulsko maso, kar zmanjša možnost nastanka neželenih stranskih produktov.



Slika 3.2: Struktura heksadeciltrimetilamonijevega bromida (CTAB).

Za permeabilizacijo celičnih membran pogosto uporabljamo raztopino kationskega detergenta heksadeciltrimetilamonijevega bromida (CTAB), ki je prikazan na sliki 3.2.

3 EKSPERIMENTALNA OPREMA IN REAGENTI

- Steklovina (erlenmajerice, epruvete, čaše, pipete, kapalke, valji, kivete)
- Stresalnik
- UV spektrofotometer
- Laboratorijska centrifuga
- Membranski filtri z velikostjo por 0,45 µm
- Avtomatski merilec vlage v trdni snovi
- Laboratorijska tehnica
- 0,1 M HEPES pufer (pH 7,0)
- 0,2 % vodna raztopina CTAB
- 50 mM natrijev fumarat v HEPES pufru
- Celice *Saccharomyces cerevisiae* na trdnem gojišču
- 100 mL sterilnega tekočega gojišča za *S. cerevisiae* v 500 mL erlenmajerici

4 POTEK DELA

4.1 Priprava kulture kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (1 dan pred izvedbo vaje)

Pripravite kulturo kvasovke *S. cerevisiae* na poševnem agarju, cepilno zanko, gorilnik in že pripravljenih 100 mL sterilnega tekočega gojišča v 500 mL erlenmajerici (priprava opisana v Žnidaršič-Plazl in Podgornik, 2011). Na hitro obžgite rob epruvete s poševnim agarjem in erlenmajerice. V epruveto v bližini ognja prelijte del tekočega gojišča. V plamenu prežarite cepilno zanko in jo vstavite v epruveto z razraščeno kvasovko. S koncem zanke večkrat potegnite po površini poševnega gojišča, tako da čim več celic prenesete v tekočino. Ponovno odprite erlenmajerico, ji na hitro obžgite rob in vanjo prelijte suspenzijo celic. Z obžganim zamaškom zaprite erlenmajerico in nato še epruveto. Erlenmajerice postavite na stresalnik ter kvasovke gojite pri 30 °C in frekvenci stresanja 200 min⁻¹ do naslednjega dne.

4.2 Priprava suspenzije kvasovk in določitev suhe snovi celic

Po 50 mL brozge biomase prenesite v ustrezne centrifugirke, ki jih uravnotežite, in centrifugirajte 5 min pri 3000 min⁻¹. Supernatant oddekanirajte in kvasovke resuspendirajte v manjši količini demineralizirane vode ter centrifugirajte pri enakih pogojih. Postopek resuspendiranja in centrifugiranja še enkrat ponovite, da sperete ostanke gojišča. 1 g mokre mase kvasovk prenesite tudi v 100 mL erlenmajerico in jih resuspendirajte v 35 mL na 30 °C segretega 0,1 M HEPES pufru s pH 7.

Odcentrifugiranim kvasovkam določite vsebnost suhe snovi tako, da v dveh paralelkah zatehtate približno 0,5 g mokre mase na avtomatski merilec vlage ter jo posušite. Iz podatkov izračunajte povprečni delež suhe snovi v mokri masi kvasovk (pripravi ena skupina za vse).

Ostali kvas bomo permeabilizirali.

4.3 Priprava permeabiliziranih kvasovk

Po 2 g mokre mase kvasovk v 50 mL centrifugirkah prelijte z 20 mL 0,2 % vodne raztopine CTAB ter premešajte. Centrifugirke postavite na stresalnik in ob mešanju pri 100 min⁻¹ inkubirajte 5 min. Po končani permeabilizaciji suspenzijo celic centrifugirajte 2 min pri 5000 min⁻¹, pri čemer uravnotežite centrifugo s centrifugirko z vodo. Supernatant odlijte ter celice ponovno suspendirajte v 20 mL demineralizirane vode, centrifugirajte pri 3000 min⁻¹ kot prej in nato oddekanirajte tekočino.

4.4 Biotransformacija fumarne v L-jabolčno kislino

Poleg tega pripravite še 0,5 L 50 mM raztopine natrijevega fumarata v 0,1 M HEPES pufru s pH 7,0. Po 30 mL te raztopine prenesite v 100 mL erlenmajerice in raztopine segrejte na 30 °C. Tudi preostali HEPES pufer segrejte na 30 °C.

Biotransformacija z nepermeabiliziranimi kvasovkami:

Erlenmajerice z nepermeabiliziranimi kvasovkami v pufru (točka 4.2) postavite na stresalnik pri 30 °C, nastavite frekvenco stresanja na 150 min⁻¹ in dodajte 15 mL 50 mM ogrete raztopine fumarata v HEPES

pufu. Začnite meriti čas in takoj odvezite prvi vzorec tako, da s pomočjo injekcije iz suspenzije vzamete 1,5 mL vzorca in ga s pomočjo membranskega filtra (0,45 μm) prefiltrirate v Eppendorf epruveto, ki jo označite. Vzorce odvezajte še po 5, 10, 20, 30 in 40 min.

Biotransformacija s permeabiliziranimi kvasovkami v HEPES pufu:

Po 1 g spranih in odcentrifugiranih permeabiliziranih kvasovk iz centrifugirke (točka 4.3) prenesite v 100 mL erlenmajerice in dodajte 35 mL predhodno segretega 0,1 M v HEPES pufu s pH 7,0 in dodajte 15 mL 50 mM ogrete raztopine fumarata v HEPES pufu. Nadaljnji postopek je enak kot zgoraj, le da delate s permeabiliziranimi kvasovkami.

4.5 Spektrofotometrično določanje koncentracije fumarata

Iz osnovne raztopine natrijevega fumarata (50 mM) v 0,1 M HEPES pufu z dodajanjem ustreznih množin pufra pripravite po 2 mL raztopin s koncentracijo 1, 3, 5, 6, 8, 10 in 15 mM. Za pripravo umeritvene krivulje s pomočjo spektrofotometra izmerite absorbanco raztopin pri $\lambda = 290 \text{ nm}$, pri čemer za vsako koncentracijo izvedite po dve meritvi (pripravi ena skupina za vse).

Analiza vzorcev: iz Eppendorf epruvet prenesite po 1 mL filtriranih vzorcev v kvarčno kiveto in jim izmerite absorbanco, kot je opisano zgoraj.

5 PODATKI IN MERITVE

Vse podatke zberite v obliki tabel. Iz spektrofotometričnih meritev standardnih raztopin fumarata izdelajte umeritveno krivuljo in iz nje izračunajte koncentracijo v vzorcih med potekom biotransformacije. Iz teh rezultatov iz množine soli jabolčne kisline ($n_{\text{sol jabolčne kisline}}$) izračunajte še njeno koncentracijo po naslednji zvezi (ekvimolarna reakcija):

$$n_{\text{sol jabolčne kisline}} = n_{0,\text{fumarat}} - n_{\text{fumarat}} \quad 3.1$$

pri čemer je $n_{0,\text{fumarat}}$ množina fumarata na začetku in n_{fumarat} množina fumarata ob določenem času. Izračunajte konverzijo fumarata ob določenem času procesa kot:

$$X = \frac{n_o - n}{n_o} \quad 3.2$$

Podajte tudi volumetrično produktivnost P_v [$\text{mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$]:

$$P_v = \frac{n_{\text{sol jabolčne kisline}}}{t \cdot V} \quad 3.3$$

pri čemer je t čas reakcije in V volumen raztopine.

Iz P_v in podatkov o masi suhe snovi celic ($m_{\text{ss celic}}$) izračunajte še produktivnost katalizatorja P_b [$\text{mmol g}_{\text{ss celic}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]:

$$P_b = \frac{n_{sol \text{ jabolčne kisline}}}{t \cdot m_{ss \text{ celic}}} \quad 3.4$$

6 REZULTATI

Izrišite časovno odvisnost koncentracije fumarata in soli jabolčne kisline ter konverzije za proces z uporabo permeabiliziranih in nepermeabiliziranih kvasovk. Podajte volumetrično produktivnost in produktivnost biokatalizatorja ob koncu procesa.

3. VAJA: Imobilizacija biokatalizatorjev

1 NAMEN VAJE

Imobilizacija permeabiliziranih celic kvasovk v alginatne kroglice različnih velikosti ter primerjava aktivnosti biokatalizatorjev pred in po imobilizaciji. Imobilizacija lipaze na osnovi zamreženja v zamrežene encimske aggregate. Izračun izkoristka imobilizacije in zadržane fumarazne aktivnosti celic v različno velikih alginatnih kroglicah ter obeh parametrov pri zamreženju lipaze v zamrežene encimske aggregate.

2 OSNOVE

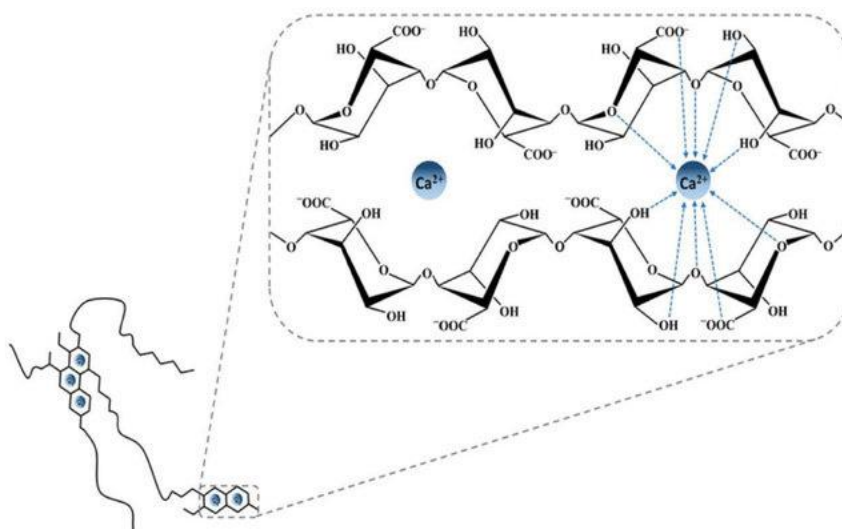
Ujetje (inkapsulacija) biokatalizatorja v porozno strukturo hidrogela

Ena najpogostejših tehnik imobilizacije je ujetje biokatalizatorja v porozno strukturo hidrogela. Kot material za tvorbo hidrogela se pogosto uporablja alginat, polisaharid, pridobljen iz rjavih alg. Alginat ima po reakciji s kalcijevimi ioni sposobnost tvorbe tridimenzionalnih poroznih struktur (slika 4.1). Pri tem procesu se kalcijevi ioni vežejo z negativno nabitimi karboksilnimi skupinami alginata, kar vodi do nastanka mreže (gela), v katero je mogoče ujeti biokatalizator.

Ta metoda omogoča, da biokatalizator ostane fizično zadržan v strukturi gela, medtem ko substrati in produkti prosto difundirajo skozi porozno mrežo. Zaradi tega ima ta tehnika več pomembnih prednosti:

- **Podaljšana življenjska doba biokatalizatorja:** Biokatalizator je zaščiten pred mehanskimi in kemičnimi poškodbami, kar poveča njegovo stabilnost.
- **Lažje ločevanje od produktov:** Po končani reakciji lahko alginatne kroglice z biokatalizatorjem enostavno ločimo iz reakcijske zmesi na osnovi filtracije ali centrifugiranja.

Kljub prednostim ima tehnika tudi nekatere omejitve. Ena glavnih slabosti je povečanje **upora proti prenosu snovi**, saj dodatna plast alginatnega hidrogela omejuje difuzijo substratov in produktov, kar lahko upočasni hitrost reakcije. Poleg tega je struktura alginatnega hidrogela občutljiva na fosfatne ione, ki lahko izpodrivajo kalcijeve ione in destabilizirajo gel. Zato je treba pri izvedbi reakcij z biokatalizatorji, imobiliziranimi v alginatnih kroglicah, uporabljati ustrezne pufre. Eden najprimernejših je pufer na osnovi 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsulfonske kisline (HEPES), ki ne vsebuje fosfatov in tako ne vpliva na stabilnost alginatnega gela.

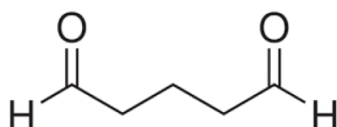


Slika 4.1: Model škatle za jajca (angl. *egg-box model*), ki predstavlja interakcije med G-monomerom alginata in kalcijevim ionom (Auriemma idr., 2020).

Tehnika ujetja v hidrogel se pogosto uporablja zaradi enostavnosti, nizkih stroškov materiala ter široke uporabnosti v različnih biokemijskih procesih.

Zamreženi encimski agregati

Zamreženi encimski agregati (angl. *crosslinked enzyme aggregates, CLEAs*) so kovalentno povezani encimski agregati, pri čemer ta tehnika ne zahteva uporabe nosilca. CLEA nastanejo v dveh korakih: obarjanje encimov v agregate s solmi, kot je amonijev sulfat, ali polarnimi organskimi topili, kot je aceton, in zamreževanje agregatov z zamreževalcem, najpogosteje glutaraldehidom (slika 4.2), ki se veže na aminokislinske ostanke z amino skupinami, največkrat na lizin (Lys) (prikazano na sliki 4.3).



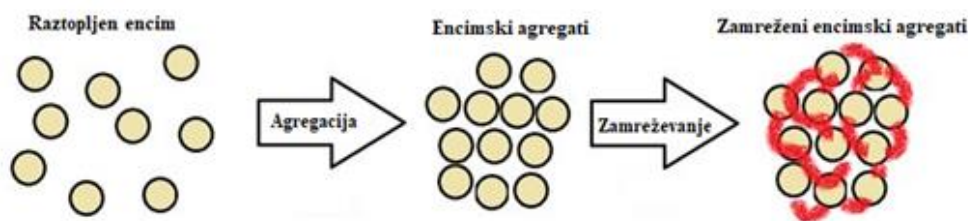
Slika 4.2: Glutaraldehid.

Ta tehnika ponuja številne prednosti:

- **Visoka stabilnost:** Zamreženi encimski agregati so mehansko stabilni in odporni na ekstremne pogoje.
- **Lažje ločevanje od produktov:** Zamrežene encimske agregate enostavno ločimo iz reakcijske zmesi na osnovi filtracije ali centrifugiranja.

Pomanjkljivost te tehnike je možna izguba encimske aktivnosti zaradi penetracije reaktivnega glutaraldehida v notranjost encima. To težavo rešujemo z uporabo večjih zamreževalcev, npr. dekstran polialdehid, ki reagirajo samo s površino encima. Za encime z nizko vsebnostjo ostankov Lys je potrebna dodatna koagregacija z aminimi polimeri, kot je polietilenimin (PEI), ali proteini, kot je BSA, kar izboljša stabilnost in katalitske lastnosti.

Velikost in poroznost CLEA močno vplivata na njihovo učinkovitost – manjši agregati imajo večjo specifično površino, kar omogoča boljšo difuzijo substratov in produktov. CLEA običajno pripravljamo v šaržnem postopku, kar omogoča izdelavo robustnih delcev, primernih za industrijsko uporabo (R. A. Sheldon, 2007).

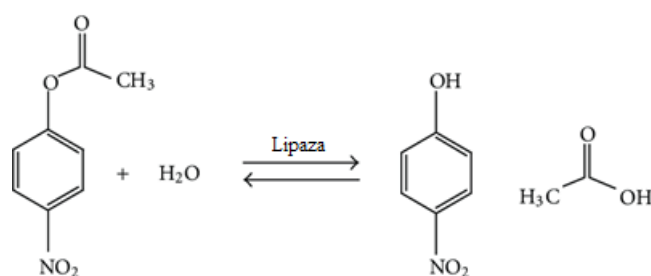


Slika 4.3: Shematski prikaz priprave zamreženih encimskih agregatov. V prvi stopnji se topni encim agregira z delovanjem obarjalnega sredstva. V drugi stopnji pride do zamreženja z zamreževalcem (Mafra idr., 2015).

Lipaze

Lipaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo dolgih verig trigliceridov v glicerol in proste maščobne kisline. Prisotne so v številnih živih organizmih, vključno z mikroorganizmi, rastlinami in živalmi. Pri ljudeh so ključne za prebavo lipidov, saj razgrajujejo maščobe v prebavilih. Lipaze imajo široko optimalno pH območje, odvisno od vira encima, pri čemer je njihova aktivnost pogosto stabilizirana z različnimi kovinskimi ioni. Poleg hidrolize so sposobne katalizirati tudi reakcije esterifikacije in transesterifikacije, kar jim daje velik pomen v industriji, zlasti pri proizvodnji olj, biodizla, hrane in farmacevtskih izdelkov (Joshi in Kuila, 2018).

Določanje lipazne aktivnosti: aktivnost lipaz določamo z različnimi tehnikami in metodami (titracija, spektrofotometrija), ena najpogostejših spektrofotometričnih metod pa je na osnovi hidrolize 4-nitrofenil acetata v 4-hidroksifenol, ki močno absorbira pri 405 nm (slika 4.4).



Slika 4.4: Hidroliza 4-nitrofenil acetata v 4-nitrofenol, ki absorbira pri 405 nm (rumena barva).

3 EKSPERIMENTALNA OPREMA IN REAGENTI

- Steklovina (erlenmajerice, epruvete, čaše, pipete, kapalke, valji, kivete)
- Stresalnik
- UV spektrofotometer

- Laboratorijska centrifuga
- Membranski filtri z velikostjo por 0,45 μm
- Laboratorijska tehnica
- Magnetno mešalo
- Submerzna kultura celic *S. cerevisiae* (navodila v 2. vaji)
- Natrijev alginat
- CaCl_2
- 0,1 M HEPES pufer (pH 7,0)
- 50 mM natrijev fumarat
- Ustrezno, v pufru, razredčena raztopina bakterijske lipaze
- 0,1 M Tris-HCl pufer (pH 8)
- 5 mM 4-nitrofenil acetat v acetonitrilu
- 4-nitrofenol
- Acetonitril
- Nasičena vodna raztopina $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 50 % (ut.) vodna raztopina glutaraldehida

4 POTEK DELA

Imobilizacija permeabiliziranih kvasovk

Pripravite 0,1 L natrijevega alginata v demineralizirani vodi koncentracije 3 % (ut.) ter 0,5 L zamreževalne raztopine CaCl_2 koncentracije 2 % (ut.).

Mokro maso kvasovk suspendiramo v 2 mL pufra in jih zmešamo z raztopino alginata v razmerju 1 : 1. Nato raztopino po kapljicah odpipetiramo v zamreževalno raztopino CaCl_2 . Kroglice pustimo ob konstantnem mešanju v raztopini 15 min in jih nato operemo z demineralizirano vodo. Tako pripravljene in posušene alginatne kroglice z imobiliziranimi kvasovkami nato uporabimo v biotransformaciji.

Za dosego različnih velikosti kroglic uporabimo različno velike konice pipet (5 mL in 0,2 mL).

Biotransformacija s prostimi in imobiliziranimi kvasovkami

Prenesite 1 g spranih in odcentrifugiranih permeabiliziranih kvasovk v 100 mL erlenmajerice ter dodajte 35 mL predhodno segretega 0,1 M HEPES pufra (pH 7,0). Erlenmajerice postavite na stresalnik pri 30 °C, nastavite frekvenco stresanja na 150 min^{-1} in dodajte 15 mL 50 mM ogrete raztopine fumarata v HEPES pufru. Začnite meriti čas in takoj odvezmite prvi vzorec tako, da s pomočjo injekcije iz suspenzije vzamete 1,5 mL vzorca in ga s pomočjo membranskega filtra (0,45 μm) prefiltrirate v Eppendorf epruveto, ki jo označite. Vzorce odvezmajte še po 5, 10, 20, 30 in 40 min.

Pri postopku z imobiliziranimi celicami prenesite vse nastale alginatne kroglice v erlenmajerice in dodajte 30 mL HEPES pufra ter 15 mL 50 mM ogrete raztopine fumarata v HEPES pufru ter nadaljujte po postopku, opisanem za proste celice. Takoj po dodatku substrata začnite meriti čas in hkrati odvezmite prvi vzorec, pri čemer vzorca ni treba filtrirati.

Iz koncentracije fumarne kisline ob upoštevanju ekvimolarnosti reakcije izračunajte pripadajoče koncentracije L-jabolčne kisline in konverzijo.

Imobilizacija lipaze v zamrežene encimske agregate

V epruveto z obrušom prenesite po 4,5 mL izbranega obarjalnega sredstva (amonijev sulfat ali acetonitril), mu dodajte 0,5 mL encima ter mešajte pri 1000 min^{-1} na sobni temperaturi. Po 30 min dodajte 10 μL glutaraldehida (zamreževanje) ter mešajte še dodatnih 15 min. Po koncu moramo zamrežene encimske agregate ločiti od obarjalnega sredstva in zamreževalca, kar storimo s centrifugiranjem pri 10000 g za 5 min in supernatant odlijemo. Nato zamrežene encimske agregate resuspendiramo v 5 mL 0,1 M Tris-HCl pufru. Tako pripravljenemu imobiliziranemu encimu in preostalemu supernatantu boste določili lipazno aktivnost.

Določanje lipazne aktivnosti

Za določanje encimske aktivnosti prostega encima boste v kiveto odpipetirali 590 μL encima ter mu dodali 10 μL 5 mM 4-nitrofenil acetata, pripravljenega v acetonitrilu, ter kiveto s pokrovom na hitro obrnili in vstavili v spektrofotometer. Pri valovni dolžini 405 nm boste 5 min merili absorbanco s frekvenco 1 s^{-1} (program »kinetika«). Enako boste ponovili za zamrežen encimski agregat, kjer boste namesto prostega encima odpipetirali zamreženi encimski agregat. V referenčno kiveto boste odpipetirali 590 μL Tris-HCl pufru ter 10 μL acetonitrila. Spremljali boste nastanek 4-nitrofenola, ki močno absorbira pri 405 nm (slika 4.3).

Za določanje aktivnosti encima v supernatantu boste ponovili postopek aktivnostni test, kjer boste namesto prostega oz. imobiliziranega encima v kiveto odpipetirali 590 μL supernatanta (po imobilizaciji) ter dodali 10 μL substrata.

Za določanje koncentracij produkta iz absorbance (405 nm) pripravite 100 μM raztopino p-nitrofenola v mešanici acetonitrila in fosfatnega pufru v razmerju 1 : 59 ter odčitajte absorbanco pri 405 nm. Nato iz absorbance določite ekstinkcijski koeficient za p-nitrofenola iz Beer-Lambertovega zakona (spodnja enačba):

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad 4.1$$

kjer je ε absorpcijski oz. ekstinkcijski koeficient [$\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$], b dolžina poti svetlobe skozi kiveto (1 cm) in C množinska koncentracija [mol L^{-1}]

Določanje izkoristka imobilizacije

Izkoristek imobilizacije boste določili s pomočjo enačb 1.13 in 1.14, kjer boste iz začetnih naklonov nastajanja produkta določili encimske aktivnosti proste in imobilizirane lipaze ter encimsko aktivnost v supernatantu.

5 PODATKI IN MERITVE

Grafično prikažite potek koncentracije fumarne in L-jabolčne kisline ter konverzijo v odvisnosti od časa za proste permeabilizirane kvasovke ter za kvasovke, imobilizirane v večje in manjše alginatne kroglice. Podajte še zadržano aktivnost imobiliziranih kvasovk (enačba 1.15).

Grafično prikažite umeritveno krivuljo za 4-nitrofenol ter izrišite potek testov lipazne aktivnosti za prosto in imobilizirano lipazo. Določite tudi izkoristek imobilizacije ter zadržano aktivnost pri uporabi različnih obarjalnih sredstev.

6 REZULTATI

Izrišite časovno odvisnost koncentracije fumarata in soli jabolčne kisline ter konverzije za proces z uporabo prostega in imobiliziranega biokatalizatorja. Podajte tudi zadržano aktivnost za različni velikosti alginatnih kroglic.

Prav tako izrišite časovno odvisnost koncentracije p-nitrofenol ter konverzije p-nitrofenil acetata pri aktivnostnem testu za prosto in imobilizirano lipazo. Poleg zadržane aktivnosti imobilizirane lipaze podajte še izkoristek ter učinkovitost samega postopka imobilizacije.

Reference in viri

- Ainsworth, S. (1977). Michaelis-Menten kinetics. V *Steady-State Enzyme Kinetics* (str. 43–73). Macmillan Education UK.
- Auriemma, G., Russo, P., Del Gaudio, P., García-González, C. A., Landín, M., in Aquino, R. P. (2020). Technologies and formulation design of polysaccharide-based hydrogels for drug delivery. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(14), 3156.
- Bornscheuer, U. T., in Buchholz, K. (2005). Highlights in biocatalysis - historical landmarks and current trends. *Engineering in Life Sciences*, 5(4), 309–323.
- Boyer, R. F. (2003). *Concepts in biochemistry* (2. izd.). John Wiley & Sons.
- Datta, S., Christena, L. R., in Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 *Biotech*, 3(1), 1–9.
- Faber, K. (2019). *Biotransformations in organic chemistry*. Springer International Publishing.
- Fersht, A. R. (2017). *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding* (4. izd.). World Scientific Publishing.
- Guisan, J. M., López-Gallego, F., Bolivar, J. M., Rocha-Martín, J., in Fernandez-Lorente, G. (2020). The science of enzyme immobilization. V *Methods in Molecular Biology* (str. 1–26). Springer US.
- Joshi, R. in Kuila, A. (2018). Lipase and their different industrial applications: A review. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 5(10), 237–247.
- Mafra, A. C. O., Kopp, W., Ramos, M. D., Beltrame, M. B., Ribeiro, M. P. A., Badino, A. C., in Tardioli, P. W. (2015, februar). Cross-linked enzyme aggregates of catalase from bovine liver. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, Brasil. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-1205-20483-160850>.
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., in Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29(2), 205–220.

- Nguyen, H. H., in Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Journal of the Korean Vacuum Society*, 26(6), 157–163.
- Plummer, D. T. (1987). *Introduction to practical biochemistry* (3. izd.). McGraw-Hill Publishing.
- Sheldon, R. A. (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 6), 1583–1587.
- Sheldon, Roger A., in van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235.
- Žnidaršič-Plazl, P., in Podgornik, H. (2011). *Vaje iz biotehnologije* (2. izd). Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.