

Univerza v Mariboru
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Maja Habulin, Mateja Primožič

Industrijska mikrobiologija

Navodila za laboratorijske vaje (zbrano gradivo)

Recenzent: izr. prof. dr. Mojca Škerget

Maribor, 2008

Navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju

1. V laboratorij vstopamo v zaščitnih haljah. Pri delu uporabljamo zaščitne rokavice.
2. **V laboratoriju ne jemo in ne pijemo!!!** Ker se lahko inficiramo skozi usta, nos, oči in kožo, pri delu ne dajemo ničesar v usta (svinčnik, peresa, steklovina itd.).
3. Z živimi mikrobi delamo previdno in **aseptično** ob plamenu plinskega gorilnika.
4. Pri delu z gorilnikom pazimo, da nam plamen ne ožge kože, las ali halje.
5. Med delom z mikrobi in kužnino so vrata in okna zaprta, da zračni tok ne nosi mikrobov po laboratoriju.
6. Pri delu pazimo, da mikrobni kultur ne polivamo po mizi, po tleh in obleki. Z rokami se ne dotikamo kolonij in suspenzij živih mikrobov. **Če pride kužnina v stik s kožo ali delavno površino, obvestimo asistenta ali tehničnega sodelavca.** Kontaminirano delovno površino pokrijemo s staničevino in jo prelijemo z razkužilom. Razkužilo pustimo delovati najmanj 20 minut. Kontaminirano mesto na telesu ali obleki razkužimo in nato speremo z vodo.
7. Kontaminiran material odlagamo v odlagalnike ali na označeno mesto in ga nato avtoklaviramo.
8. Kovinske predmete, ki pridejo v stik s kužnino (pincete, bakteriološke zanke itd.) sproti ožigamo v plamenu. Ožigamo tudi vratove epruvet, erlenmajeric in steklenic z mikrobi, preden jih odpremo in po uporabi.
9. Po opravljenem delu pospravimo za seboj in razkužimo delovne površine. Prepričamo se, da so dovodi plina do gorilnikov zaprti.
10. Pred in po začetku izvajanja vaj si skrbno umijemo roke z milom. Če je potrebno roke tudi razkužimo.

Aseptično delo in osnove mikrobiološke tehnike

Aseptično delo

Delo v mikrobiološkem laboratoriju zahteva aseptično tehniko. Vse mikrobiološke preiskave, od odvzema vzorca in do končne identifikacije mikrobov, morajo biti opravljene aseptično. To pomeni, da s kužnino ali kulturami mikroorganizmov delamo tako, da;

1. onemogočimo dostop nezaželenim mikroorganizmom, ki bi kontaminirali naše kulture in zaradi katerih bi bili rezultati poskusov napačni;
2. pazimo, da mikroorganizmov ne razširjamo, kajti utegnili bi inficirati sebe ali druge.

Za aseptično delo je nujno, da so steklovina, predmeti in pripomočki za delo ter gojišča za gojenje mikroorganizmov sterilni. Le pri aseptični tehniki bodo rezultati preiskav pravilni, zato je pomembno, da delamo ob plamenu plinskega gorilnika, cepilno zanko in steklovino med delom ožigamo in da delovno površino redno čistimo z razkužili.

Tudi ob skrbnem upoštevanju pravil aseptičnega dela je možno, da pride do kontaminacije okolice ali kulture s katero delamo.

Osnove mikrobiološke tehnike

Mikrobiologijo delimo na različna področja (npr. klinična mikrobiologija z odkrivanjem in identifikacijo povzročiteljev bolezni, sanitarna mikrobiologija z nadzorom vode in živil itd.). Glede na področja, s katerimi se ukvarjajo, v različnih mikrobioloških laboratorijih uporabljajo različne tehnike. Nekatere tehnike so osnovne in jih mora obvladati vsak laboratorij. Med osnovne mikrobiološke tehnike prištevamo:

- gojenje bakterij

Bakterije najlažje proučujemo, če jih znamo gojiti v laboratorijskih razmerah. Običajno rastejo na trdnih ali v tekočih gojiščih. Na sveža gojišča kulture precepljamo s cepilno zanko, lahko pa tudi z vatenko ali s pipeto. Za dobro rast moramo mikroorganizmom zagotoviti primerna hranila za rast in primerne razmere (ustrezen pH okolja, ustrezna temperatura za rast, pravilna aeracija itd.).

- mikroskopijo

Morfološke značilnosti mikroorganizmov lahko opazujemo le z različnimi mikroskopskimi tehnikami. Mikroskop uporabljamo tudi za kvantifikacijo populacij ali za preverjanje možnih kontaminacij.

- identifikacijo

Uvrščanje seva v vrsto, rod ali v širšo skupino je pomembno, saj na ta način lahko predvidimo nekatere njegove lastnosti.

- sterilizacijo

Sterilizacija je postopek, s katerim uničimo ali odstranimo vse žive mikroorganizme.

Metode in sredstva za sterilizacijo in dezinfekcijo:

1. Fizikalne metode

a) sterilizacija s toploto

- *s suho toploto* (Steriliziramo laboratorijsko steklovino v sterilizatorjih. Postopek traja dalj časa, poteka pri višji temperaturi in je manj učinkovit od sterilizacije z vlažno toploto).
- *z vlažno toploto* (Uporabimo avtoklav, kjer z vodno paro pod tlakom pri 121 °C (15 minut) uničimo vse žive celice in spore.)
- *tindalizacija* (To metodo (30 minut od 80 – 100 °C, 3 dni zapored) uporabljamo za sterilizacijo snovi, ki bi jih višja temperatura uničila ali inaktivirala.)

b) sterilizacija z obsevanjem

- *z ultravijoličnimi žarki* (To sevanje se uporablja za sterilizacijo prostorov in laminarjev).
- *z ionizirajočimi žarki* (Sterilizacija z gama žarki se uporablja v komercialne namene npr. za sterilizacijo toplotno občutljivih predmetov, večjih količin plastičnih izdelkov ali hrane.)

c) sterilizacija s filtracijo

S filtracijo steriliziramo pline ali temperaturno občutljive tekočine tako, da mikroorganizme odstranimo. Snov prehaja skozi filter, ki zadrži delce določene velikosti.

č) sterilizacija s plini

Pline uporabljamo za sterilizacijo prostorov in materiala, ki ga ne moremo sterilizirati na drugačen način. Najpogosteje se uporabljata etilen oksid in pare formaldehida (žal sta zdravju škodljiva). Vse pogosteje se uporablja vodikov peroksid, ki je manj toksičen.

2. Kemična sredstva

Pri uporabi kemijskih bakteriocidnih sredstev moramo vedeti, da univerzalnega bakteriocidnega sredstva ne poznamo, zato moramo vedno izbrati najprimernejšega. Če želimo, da bo razkuževanje uspešno, moramo upoštevati antimikrobni spekter, optimalno koncentracijo, temperaturo in čas delovanja dezinficiensa (po navodilih proizvajalca) ter okolje, v katerem se mikrobi nahajajo. Za razkuževanje površin in prostorov uporabljamo dezinfekcijska sredstva, za razkuževanje tkiv pa antiseptike. Kemična sredstva lahko delujejo na mikroorganizme bakteriocidno (ubijajo), bakteriostatično (inhibirajo rast) ali bakteriolitično (ubijajo celice z lizo). Kemična sredstva delujejo na vegetativne celice, le redka tudi na spore.

VAJA 1: Dokaz sterilnega dela in izolacija bakterij z različnih površin

Dokaz sterilnega dela

Material:

- tri sterilne epruvete
- erlenmajerica s hranilno juho
- fiziološka raztopina
- plošča hranilnega agarja
- pipete (1 ml in 5 ml)

Potek vaje:

- V tri epruvete odpipetirajte 5 ml hranilne juhe.
- Sterilno fiziološko raztopino redčite v pripravljeni hranilni juhi tako, da v prvo epruveto odpipetirajte 1 ml fiziološke raztopine, nato z novo pipeto prenesite 1 ml iz prve epruvete v drugo ter ponovno z novo pipeto 1 ml iz druge epruvete v tretjo.

Z novo pipeto mešanico vedno najprej pomešate tako, da tekočino najprej potegnete v pipeto in jo nato izpustite iz nje. To ponovite trikrat.

- Iz zadnje epruvete cepite s cepilno zanko na ploščo hranilnega agarja.
- Vse tri epruvete in ploščo inkubirajte na 37 °C dva dni.

Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje, shematsko prikažite način priprave razredčin ter cepljenja vzorca na ploščo hranilnega agarja. Opišite bakterijsko rast v posamezni epruveti in na plošči. Kaj pomeni rast bakterij v posamezni epruveti oz. na plošči?

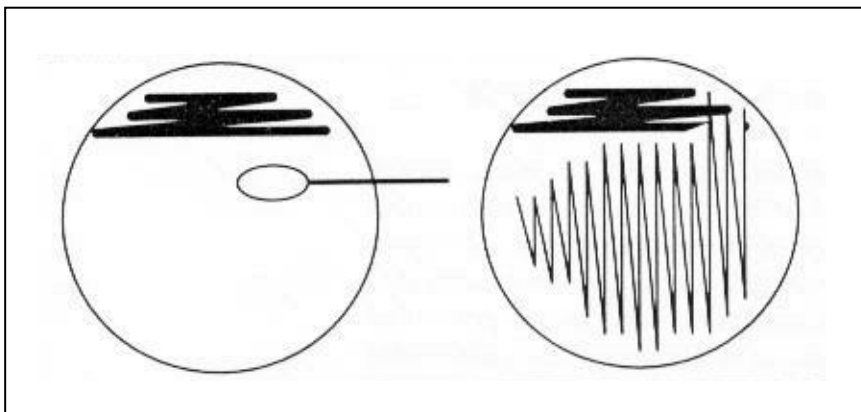
Izolacija bakterij z različnih površin

Material:

- sterilne vatenke
- epruveta s fiziološko raztopino
- plošča hranilnega agarja

Potek vaje:

- Vatenko namočite v fiziološko raztopino.
- S tako pripravljeno vatenko naredite bris izbrane površine (tla, grlo, nos, delovna površina itd.).
- Kužnino razmažite po delu plošče hranilnega agarja. S cepilno zanko naredite nato nekaj pravokotnih potez čez prvi premaz, nato nadaljujete v isti smeri cepljenja, ne da bi se dotikali prvega premaza (Slika 1.).
- Ploščo označite in inkubirajte do dva dni na 37 °C.



Slika 1: Razmaz brisa na plošči hranilnega agarja.

Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje, zapišite mesto odvzema vzorca in shematsko ponazorite tipe kolonij, ki so se razmnožili na pripadajoči plošči hranilnega agarja. Ali se bakterije iz različnih vzorcev med seboj razlikujejo? Diskusija.

Izolacija čiste kulture

Vzorci običajno vsebujejo veliko različnih vrst mikroorganizmov in vsak od njih ima določene fiziološke in morfološke lastnosti. Le z osamitvijo vsake bakterijske vrste posebej v čisti kulturi je mogoče posamezne vrste preučevati in jih okarakterizirati. Tudi za spoznavo že znanih vrst je praviloma potrebna čista kultura. Bakterijsko vrsto, ki jo proučujemo, vselej najprej gojimo v čisti kulturi. V čisti kulturi je samo ena vrsta bakterije in zato so lastnosti kulture lastnosti te bakterijske vrste. Govorimo o izolaciji ali osamitvi bakterije. V mešani kulturi je več kot ena vrsta bakterij. V takšnih kulturah določeno lastnost ni mogoče pripisati samo eni od vrst bakterij v kulturi. Iz mešane kulture izoliramo bakterije po več metodah. Tako dobimo posamezne bakterijske kolonije iste vrste v čisti kulturi, saj je le na ta način mogoče preučevati vsako vrsto bakterijske kulture posebej.

Čistost kulture in izolacija čiste kulture

Vsaki kulturi je potrebno preveriti njeno čistost. Čistost tekoče kulture je mogoče preveriti pod mikroskopom. Običajno preparat čiste kulture vsebuje le celice iste oblike, izjemoma pa so lahko bakterijske kulture pleomorfne (vsebujejo celice različnih oblik). Problem lahko predstavljajo tudi različne bakterije, ki imajo podobno obliko in jih je zato pod mikroskopom težko med seboj ločiti. V takem primeru je potrebno tekočo kulturo cepiti na ploščo hranilnega agarja. Na takšnem gojišču se bo vsaka bakterijska celica namnožila in nastala bo kolonija, ki jo lahko v večini primerov dobro razločimo tudi s prostim očesom. V kolikor se na ploščah pojavi le ena vrsta kolonij, lahko sklepamo, da je kultura čista.

Identifikacija bakterij

Identifikacija bakterije pomeni uvrstitev seva v vrsto ali rod glede na določene lastnosti, ki jih sev ima. Za identifikacijo bakterij so pomembne predvsem njihove morfološke, fiziološke in biokemijske značilnosti.

1. Morfološke značilnosti:

- Makromorfološke značilnosti

Na trdnem gojišču se kolonije bakterij med seboj ločijo glede na:

- obliko kolonij – okrogle, nepravilne, filamentozne, rizoidne ...
- rob – gladek, valovit, korenast, s poglobitvami, nažagan ...
- ustroj – krhke, trde, mazave, sluzne ...
- prečni prerez – ploski, dvignjen, konveksni, umbicilarni ...
- velikost,
- površino – gladka, hrapava, mokra, suha, nagubana, razbrazdana ... ter
- barvo – prozorne, bele, vijoličaste, fluorescenčne ...

V tekočem gojišču se kolonije bakterij med seboj ločijo glede na:

- tvorbo motnosti, usedline ter kožice,
 - nastajanje plina,
 - barvo medija in
 - barvo kolonij.
- Mikromorfološke značilnosti – morfologija same celice
 - oblika – koki, bacili, spirili, vibrio ...
 - velikost,
 - prisotnost kapsule,
 - oblika spore,
 - obarvanje po Gramu.

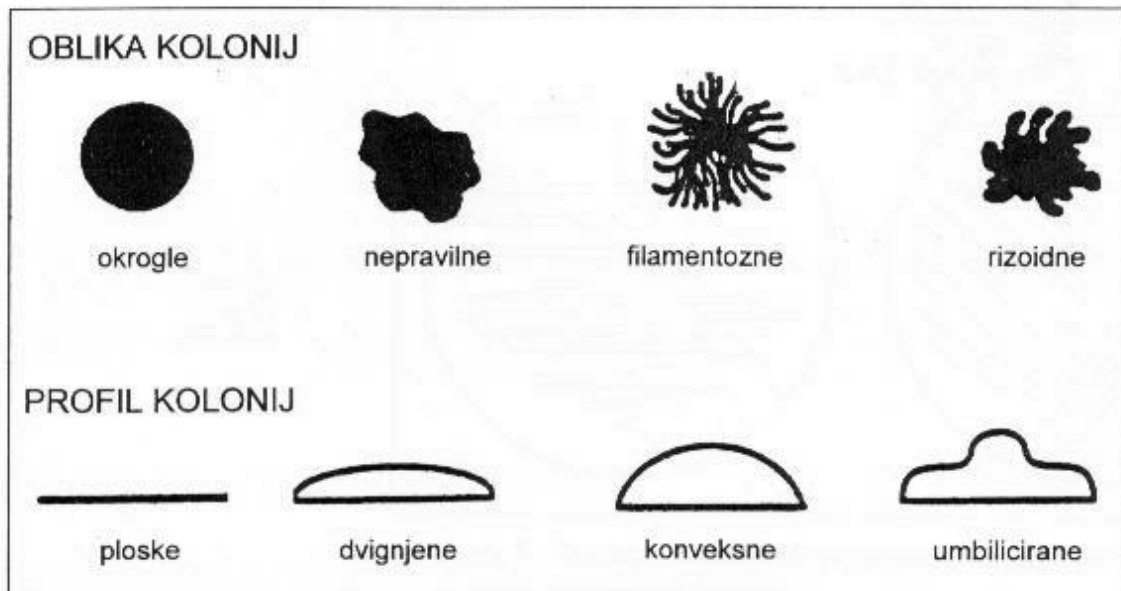
2. Fiziološke značilnosti:

- možnost izrabe različnih ogljikovih hidratov, alkoholov, proteinov, redukcije nitratov, ...
- potreba po kisiku – aerobne, anaerobne, fakultativno anaerobne, aerotolerantne, mikroaerofilne bakterije.

3. Biokemijske značilnosti:

- sposobnost razgradnje različnih substratov – ogljikovih hidratov, beljakovin, škroba, ...
- način razgradnje omenjenih substratov – fermentativno, oksidativno.

Čistost kulture lahko preverimo le, če je plošča »dobro cepljena« (kolone morajo biti dovolj narazen, da lahko zrastejo do za vrsto značilne velikosti in razvijejo druge značilnosti). Tak način cepljenja imenujemo *cepljenje do posameznih kolonij*.



Slika 2: Oblike in profili mikrobioloških kultur.

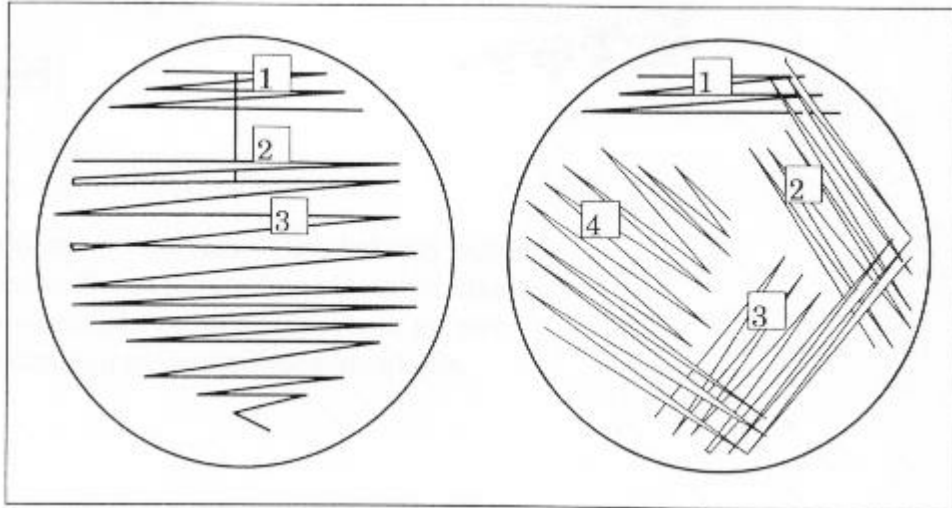
Za želeno vrsto mikroorganizmov lahko iz izhodnega materiala izoliramo na več načinov:

- **z direktno metodo** (Material suspendiramo in primerno rečimo ter nato pod mikroskopom prenesemo eno samo celico v sveže gojišče (Primerna metoda za delo s kvasovkami.)).
- **z indirektno metodo** (Mašano kulturo najprej cepimo na gojišče do posameznih kolonij (Slika 3.). Na plošči z mešano kulturo izberemo kolonijo bakterije, ki jo želimo izolirati v čisti kulturi, ter jo s cepilno zanko precepimo na svežo ploščo. Pri izolaciji čiste kulture je ponavadi potrebnih več zaporednih precepljanj).

Bakterijske kulture lahko shranjujemo na več načinov:

- s precepljanjem na ploščah ali poševnih gojiščih,
- z zamrzovanjem ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, v tekočem dušiku pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ z dodajanjem zaščitnih sredstev, ki preprečujejo nastanek kristalov v celici),
- s sušenjem (na sterilnem filter papirju, v želatini, na granulah silikagela),

- z liofilizacijo (suspencijo mikroorganizmov hitro zamrzujemo pri temperaturi – 54 °C do – 72 °C in v vakuumu odstranimo vodo).



Slika 3: Izolacija čiste kulture s cepilno zanko.

Zgoraj opisani klasični mikrobiološki postopki za identifikacijo bakterij glede na biokemijske lastnosti običajno trajajo 2-3 dni. Posebaj v rutinskih preiskavah (medicinska mikrobiologija, sanitarna mikrobiologija ...) je hitrost identifikacije bakterij zelo pomemben dejavnik. Tudi zato in pa seveda zaradi enostavnosti se uporabljajo številne hitre identifikacijske metode (npr. identifikacija bakterij s hitrim testom - Bujon glukoze z metilenskim modrilom in Durham cevko (Heipha Diagnostics)).

VAJA 2: Izolacija čiste kulture

Material:

- plošča z mešano kulturo
- sveža plošča hranilnega agarja

Potek vaje:

Iz trdega gojišča z mešano kulturo izberite eno izmed kolonij in jo izolirajte v čisti kulturi z redkim cepljenjem na svežo ploščo do posameznih kolonij.

Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje ter narišite poraslo kulturo na svoji plošči. Koliko tipov kolonij opazite? Ali je kultura čista? Kaj je potrebno storiti v primeru, da kultura še zmeraj ni čista? Diskusija.

VAJA 3: Identifikacija bakterij s hitrim testom

Identifikacija bakterij s hitrim testom - Bujon glukoze z metilenskim modrilom in durham cevko (Heipha Diagnostics)

Ta test se uporablja za razlikovanje Gram-pozitivnih in Gram-negativnih bakterij glede na njihovo zmožnost tvorjenja kislin in plina iz glukoze. Gram-pozitivne in Gram-negativne bakterije se med seboj razlikujejo v zgradbi celične stene; Gram-negativne bakterije imajo zraven celične membrane in celične stene tudi zunanjo membrano in lipopolisaharide.

Hranilni medij omogoča hitro rast bakterij. Tvorbo kislin iz glukoze zasledimo s spremembo barve bujona iz zelene v rumeno, medtem ko nastajanje plina zasledimo s pomočjo durham cevke.

Sestava bujona za gojenje bakterij (g/l vode):

- 10 g mesnega peptona,
- 5 g mesnega ekstrakta,
- 5 g NaCl,
- 10 g glukoze,
- 0,024 g metilenskega modrila.

Bujon je prozoren, zeleno modre barve in ima pH $7,4 \pm 0,2$.

Kontrolo rasti bakterij izvedemo na testnih bakterijah, Gram-negativnih bakterijah *Escherichia coli* in *Pseudomonas fluorescens* in mlečno kislinski Gram-pozitivni bakteriji *Lactobacillus acidophilus* (Tabela 1.).

Tabela 1: Karakteristične lastnosti posameznih bakterij po 22 h gojenja v bujonu glukoze z metilenskim modrilom in durham cevko (Heipha Diagnostics).

Bakterija	Sprememba barve iz zeleno modre v rumeno	Tvorba plina
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	-

Inkubacija : 22 h \pm 2 h

Material:

- tekoči vzorec z mikroorganizmom
- stekleničke z bujonom za gojenje bakterij (hitri test)

Potek vaje:

Iz epruvete z vzorcem si s pomočjo razrečevanja pripravite 10^{-4} razredčino. 1 mL pripravljene razredčine odpipetirajte v stekleničko z bujonom glukoze z metilenskim modrilom in durham cevko (Heipha Diagnostics). Stekleničko z bujonom inkubirajte 22 h pri 37 °C.

Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje ter na osnovi dobljenih rezultatov določite s pomočjo tabele 1 vrsto bakterije v dobljenem vzorcu.

VAJA 4: Priprava hranilnih medijev za gojenje bakterij in gliv

Trdi medij za gojenje bakterij (mesni medij)

- 5 g mesnega peptona
- 3 g mesnega ekstrakta
- 0,5 g NaCl
- 5 g D-(+)-glukoze
- 18 g agarja
- 1 l navadne vode

Vse sestavine zatehtamo v 1000 ml bučko in dolijemo 1 l navadne vode. Bučko z raztopino potopimo v vrelo vodno kopel ter jo ob intenzivnem mešanju segrevamo dokler v raztopini ni več opaziti delcev.

Tekoči medij za gojenje bakterij (mesni medij)

- 5 g mesnega peptona
- 3 g mesnega ekstrakta
- 0,5 g NaCl
- 5 g D-(+)-glukoze
- 1 l navadne vode

Vse sestavine zatehtamo v 1000 ml bučko in dolijemo 1 l navadne vode. Bučko z raztopino potopimo v vrelo vodno kopel ter jo ob intenzivnem mešanju segrevamo dokler raztopina ne postane popolnoma bistra.

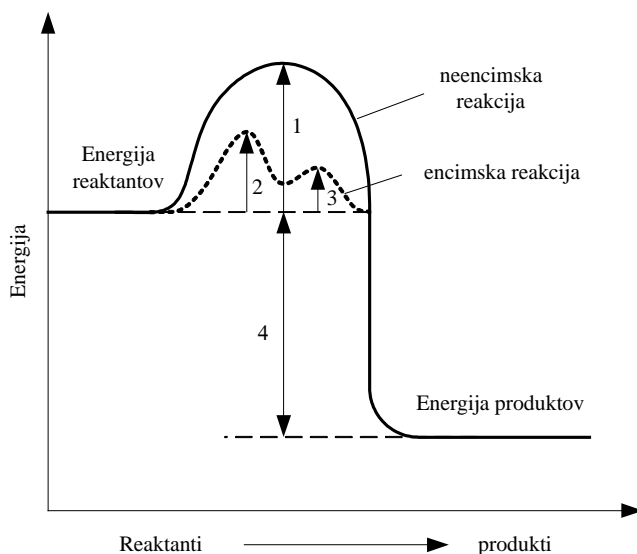
Krompirjev agar za glive

- 39 g krompirjevega dekstroznega agarja (PDA)

Agar zatehtamo v 1000 ml bučko in dolijemo 1 l navadne vode. Bučko z raztopino potopimo v vrelo vodno kopel ter jo ob intenzivnem mešanju segrevamo dokler v raztopini ni več opaziti delcev.

ENCIMSKO KATALIZIRANE REAKCIJE

Velik del kemijskih reakcij ne poteka dovolj hitro. Potrebno aktivacijsko energijo za kemijske reakcije najpogosteje dovajamo s segrevanjem, kar vodi do povišanja temperature reakcijske zmesi. Možna pot pa so tudi katalizatorji. Ti namreč znižujejo potrebno količino aktivacijske energije ter tako omogočajo potek reakcij, ki ob istih energetskih pogojih ne bi bile možne. Katalizatorji pospešujejo kemijske procese in se pri tem ne porablajo. To pomeni, da katalizatorji vstopijo v sam proces, in ko je ta končan, izstopijo iz njega nespremenjeni. Encimi so zelo aktivni katalizatorji, ki pospešijo reakcijo tudi do 10^{29} krat in zaradi tega v reakcijskem mediju delujejo uspešno v malih količinah. Reakcijo vodijo po drugi (ponavadi večstopenjski) poti, ki terja nižjo aktivacijsko energijo, torej energijo, potrebno, da pri trkih med delci pride do reakcije. Reakcije v živih organizmih se morajo odvijati po principu znižanja aktivacijske energije, kar se dogaja s pomočjo biokemijskih katalizatorjev, encimov. Slika 4 prikazuje zniževanje aktivacijske energije s katalizatorji.



- 1 – aktivacijska energija neencimske reakcije
- 2 – aktivacijska energija za tvorbo kompleksa encim – substrat
- 3 – aktivacijska energija za encimsko reakcijo
- 4 – sprememba notranje energije (ΔG)

Slika 4: Znižanje aktivacijske energije s katalizatorji.

Potek encimske katalize lahko razdelimo v tri faze:

1. v prvi fazi se stvori kompleks encim – substrat, ki ima nižjo aktivacijsko energijo kot sam substrat. Nastajanje kompleksa mora biti hitro in reverzibilno;
2. v drugi fazi nastane produkt, ki je vezan na aktivno mesto encima – nastane torej kompleks encim – produkt;
3. v tretji fazi nastopi "osvobajanje" produkta. Kompleks encim – produkt razpade v encim + produkt. Tako se encim regenerira in lahko ponovno vstopi v reakcijo s substratom.

Specifičnost encimske katalize

Za razliko od anorganskih katalizatorjev, kot so kisline, baze, kovine in kovinski oksidi, encimi kažejo lastnosti specifičnosti. Nekateri encimi so strogo specifični in delujejo samo na en določen substrat, drugi so manj specifični in katalizirajo več različnih reakcij, nekateri pa so specifični samo za neko skupino substratov. Specifičnost encimov je pogojena z dvema dejavnikoma:

1. *geometrijsko ujemanje encima in substrata*: molekula substrata se mora natančno prilegati v "kalup" encima;
2. *ujemanje v naboju in možnost približanja nabitih delov*: naboja encima in substrata z nasprotnim predznakom se morata čim bolj približati.

Faktorji, ki vplivajo na encimsko katalizirane reakcije

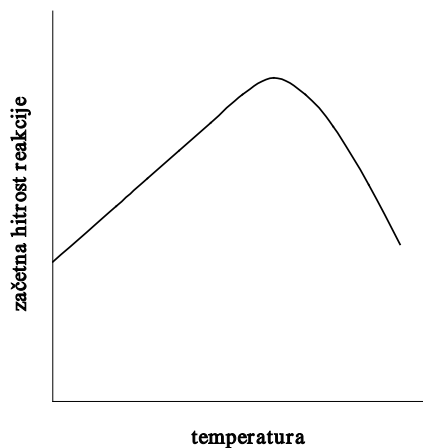
Encimsko katalizirane reakcije so odvisne od vrste faktorjev, ki vplivajo na samo delovanje encimov. Ker so encimi proteini, so zelo občutljivi na visoko temperaturo in delujejo samo v določenem temperaturnem intervalu. Pri nižjih temperaturah so bistveno manj aktivni, pri višjih pa se lahko denaturirajo. Naboj encimov je odvisen od pH, zato delujejo samo v določenem območju pH. Na encimsko katalizirane reakcije poleg temperature in pH vplivata tudi koncentracija encima in substrata.

Vpliv temperature na hitrost encimsko katalizirane reakcije

Pri povišani temperaturi encimsko katalizirane reakcije so dogajata dve stvari:

1. Poveča se hitrost reakcije, tako kot pri večini kemijskih reakcij.
2. Stabilnost proteina se zmanjša zaradi termične deaktivacije. Fizikalni mehanizem za ta fenomen je naslednji: z zviševanjem temperature imajo atomi v molekulah encima višjo energijo in s tem večjo tendenco h gibanju. Torej pridobijo dovolj energije, da le-ta preseže energijo šibkih interakcij, zaradi katerih se obdrži globularna struktura proteina. Temu sledi deaktivacija, ki je lahko reverzibilna, ireverzibilna ali kombinirana.

Za odvisnost začetne hitrosti reakcije od temperature dobimo krivuljo zvonaste oblike, katere maksimum je časovno odvisen (Slika 5.). Zato je pojem temperaturni maksimum točno določen s temperaturnimi parametri.



Slika 5: Vpliv temperature na hitrost reakcije.

Iz Arrheniusovega grafa lahko razberemo do katere temperature se aktivnost encima povečuje in pri kateri temperaturi nastopi deaktivacija encima.

Arrheniusova enačba (1) opisuje temperaturno odvisnost aktivnosti encima:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}} \quad (1)$$

kjer je :

A – Arrheniusova konstanta,

k - konstanta reakcijske hitrosti,

E_a – aktivacijska energija,

R – plinska konstanta,

T – absolutna temperatura.

Esterifikacija oleinove kisline z 1-oktanolom

Estri so eni izmed najpomembnejših razredov organskih komponent in jih je mogoče sintetizirati na različne načine:

- z reakcijo med alkoholi in karboksilnimi kislinami (esterifikacija) z odstranitvijo vode,
- z menjavo acilnih skupin med estri in kislinami (acidoliza),
- z menjavo acilnih skupin med estri in alkoholi (alkoholiza) ali glicerolom (gliceroliza),
- z menjavo acilnih skupin med estri (transesterifikacija).

Produkti esterifikacije kislin z daljšo verigo (12–20 ogljikovih atomov) in višjih alkoholov (z daljšo verigo) se uporabljajo kot maziva za stroje in kot mehčalci za zelo natančne stroje.

Estri, dobljeni z reakcijo med kislinami z daljšo verigo (12–20 ogljikovih atomov) in nižjimi alkoholi (3–8 ogljikovimi atomi), se uporabljajo kot dodatki v prehrabeni, kozmetični, farmacevtski industriji in industriji detergentov.

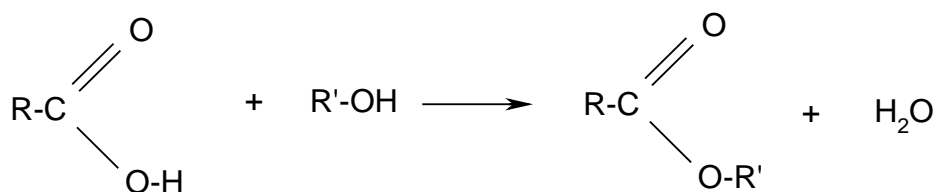
Produkti med kislinami s kratko verigo (2–8 ogljikovih atomov) in alkoholi so pomembne arome in komponente dišav v prehrabeni, kozmetični, farmacevtski industriji in industriji pijač.

Etil-, izopropil-, butil-, izobutil- in amil acetati se uporabljajo pri proizvodnji lakov zaradi dobre hlapljivosti.

Etil-, izobutil-, amil- in izoamil acetati se pogosto uporabljajo tudi kot komponente za dišave in arome, izopropil-, benzil-, oktil- ter metilni estri pa kot dodatki k parfumom.

Estri višjih maščobnih kislin, pridobljeni z esterifikacijo med višjimi alkoholi in maščobnimi kislinami, imajo velik pomen v proizvodnji maziv, farmacevtskih izdelkov in kozmetike. Prav tako jih uporabljajo kot »nosilce« za v vodi ne topne snovi zaradi njihovih emulziskih lastnosti. Estri višjih maščobnih kislin so zanimivi za industrijsko uporabo, ker niso nevarni, so biorazgradljivi in jih lahko proizvedemo iz obnovljivih virov. Njihova uporaba kot emulgatorji je razširjena; v kozmetični industriji (losioni, kreme ...), v prehrabeni industriji (omake, kreme ...), v farmacevtski industriji (mazila za rane ...), v industriji barv za slikanje, v gradbeništvu (emulgirani katran), v agrokemiji (fitosanitarni produkti), pri proizvodnji čistil in pri proizvodnji železa ter jekla.

Predvsem *n*-oktil oleat in lavril oleat se uporabljata pri proizvodnji industrijskih površinsko aktivnih snovi, maziv in mehkega usnja. Prav tako sta sestavni komponenti pri proizvodnji izdelkov za osebno nego (zobna pasta, šamponi, geli za prhanje ...). Uporabljata se tudi kot dodatka v farmacevtski industriji in v industriji polimerov (mehčalec).



Slika 6: Encimsko katalizirana sinteza estrov višje maščobnih kislin.

Pri encimsko katalizirani sintezi estrov višje maščobnih kislin se kot katalizatorji uporabljajo encimi lipaze (EC 3.1.1.3), ki spadajo v razred hidrolaz.

Le-ti so lahko prosti (nativni) ali imobilizirani na različne nosilce (smole itd.). Prednost imobiliziranih encimov pred neimobiliziranimi je predvsem v možnosti večkratne uporabe, enostavni ločitvi od reakcijske zmesi in največkrat tudi v boljši termični obstojnosti. Čeprav

znižajo obratovalne stroške (možnost večkratne uporabe), pa je njihova nabavna vrednost dokaj visoka.

Lipaze, kakor tudi druge encime, lahko pridobivamo iz različnih virov. Tako npr. so lipaze lahko živalskega izvora (trebušna slinavka) ali mikrobnega izvora npr. iz gljiv (vrsta: *Rhizopus*) ali iz kvasovk (npr. rod: *Candida*) itd.

VAJA 5: Proučevanje vpliva temperature na potek sinteze *n*-oktil oleata in na aktivnost encima

Material:

- oleinska kislina
- 1-oktanol
- NaOH (0,1 M)
- 0,1 % raztopina fenolftaleina v etanolu
- nativni ali imobilizirani encim
- pipete
- vodna kopel
- bučka s povratnim hladilnikom

Potek vaje:

- Reakcijska zmes vsebuje oleinsko kislino in 1-oktanol v množinskem razmerju 1 proti 1.
- Reakcijsko zmes inkubirajte v reakcijski bučki s povratnim hladilnikom v vodni kopeli pri dani temperaturi.
- Iz inkubirane raztopine odvzamite pri času t_0 0,5 ml vzorca (slepi vzorec), zapišite maso odvzetega vzorca in ga analizirajte po spodaj opisanem postopku.
- Nato dodajte 5 % (g/g substrata) imobiliziranega encima lipaze (Lipozyme RM IM - NOVO Nordisk, Danska). V trenutku, ko dodate encim v reakcijsko zmes, začnite meriti čas reakcije.
- Nato jemljite po 0,5 ml vzorca iz reakcijske zmesi v sledečem časovnem zaporedju: 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h.
- Vzorčite s pipeto v centrifugirke in zapišite maso odvzetega vzorca. Vsak vzorec sproti analizirajte po spodaj opisani metodi.

Analizna metoda

Določanje prostih maščobnih kislin s titracijsko metodo

Vsebnost prostih maščobnih kislin v reakcijski zmesi se lahko določi s titrimetrično metodo. 0,1 g vzorca je potrebno zatehtati v erlenmajerico in razredčiti z 20 ml raztopine 0,1 % fenolftaleina v etanolu ter titrirati z 0,1 M NaOH.

Vsebnost prostih maščobnih kislin lahko izračunamo iz enačbe 2:

$$\% \text{ (PK)} = \frac{V \cdot N \cdot M_K}{10 \cdot m} \quad (2)$$

kjer je:

M_K – molska masa kisline ($M=282,46$ g/mol),

V – volumen porabljenega NaOH ($\gamma=0,1$ mol/l),

PK – utežni % kisline,

m – masa zatehtanega vzorca (g),

N – normaliteta NaOH (0,1 N).

Izračun koncentracije nastalega estra

V določenih časovnih intervalih je potrebno meriti vsebnost prostih maščobnih kislin v vzorcih, katere je potrebno predhodno stehtati. S pomočjo spodaj navedenih enačb lahko izračunamo koncentracijo nastalega estra.

a) V primeru uporabe nativnega encima

Pred pričetkom reakcije v času $t = 0$ je bilo prisotnih:

$$\begin{array}{lcl} \mathbf{a} \text{ mol 1-oktanola} & = \mathbf{n_a} \cdot M_A & = \mathbf{A} \text{ g} \\ \mathbf{k} \text{ mol oleinske kisline} & = \mathbf{n_k} \cdot M_K & = \mathbf{K} \text{ g} \\ \text{skupno} & & \underline{= \mathbf{G_0} \text{ g}} \end{array}$$

Prisoten encim se v reakcijski zmesi raztaplja in tako ostaja razmerje encim/substrat po vzorčenjih enako. Koncentracija encima in ostalih komponent tako s časom variira.

Z vsakim molom oleinske kisline reagira 1 mol 1-oktanola in nastane 1 mol estra in 1 mol vode.

Množino kisline (n_k) in množino nastalega estra (n_e) pri določenem času ($t = t_n$) izračunamo po sledečih enačbah:

$$n_k(t = t_n) = \frac{\%PK(t = t_n) \cdot G_0}{M_K \cdot 100} \quad [\text{mol}] \quad (3)$$

$$n_e(t = t_n) = n_k(t = 0) - \frac{\%PK(t = t_n) \cdot G_0}{M_K \cdot 100} \quad [\text{mol}] \quad (4)$$

Koncentracija posameznih komponent (c_k - množinska koncentracija kisline; c_e - množinska koncentracija estra) v času $t = t_n$:

$$c_k(t = t_n) = \frac{\%PK(t = t_n)}{M_K \cdot 100} \quad [\text{mol/g}] \quad (5)$$

$$c_e(t = t_n) = \frac{n_k(t = 0)}{G_0} - \frac{\%PK(t = t_n)}{M_K \cdot 100} \quad [\text{mol/g}] \quad (6)$$

b) V primeru uporabe imobiliziranega encima

V primeru uporabe imobiliziranega encima se koncentracija encima s časom ne spreminja. Koncentracija ostalih komponent s časom variira. Pri izračunu je potrebno upoštevati da, razmerje substrat/encim ni konstantno ves čas reakcije.

Pri času $t = t_1$ se je masa reakcijske zmesi zmanjšala za maso odvzetega vzorca (Δg_1).

$$\begin{aligned} G'_0(t = t_1) &= G_0(t = 0) - \Delta g_1 && \text{[g]} && (7) \\ & \dots\dots\dots \\ & \dots\dots\dots \\ \text{za } t = t_n \quad G'_0(t = t_n) &= G'_0(t = t_{n-1}) - \Delta g_n \end{aligned}$$

Množini posameznih komponent po odvzemu vzorca sta

$$n'_k(t = t_n) = n_k(t = t_n) - \Delta g_n \cdot c_k(t = t_n) \quad \text{[mol]} \quad (8)$$

$$n'_e(t = t_n) = n_e(t = t_n) - \Delta g_n \cdot c_e(t = t_n) \quad \text{[mol]} \quad (9)$$

Za izračun množin $n_k(t = t_n)$ in $n_e(t = t_n)$ uporabimo enačbi 3 in 4.

Koncentraciji obeh komponent pri času $t = t_n$ določimo po naslednjih enačbah:

$$c_k(t = t_n) = \frac{n'_k(t = t_n)}{G'_0(t = t_{n-1})} \quad \text{[mol/g]} \quad (10)$$

$$c_e(t = t_n) = \frac{n'_e(t = t_n)}{G'_0(t = t_{n-1})} \quad \text{[mol/g]} \quad (11)$$

Potrebno je upoštevati še maso encima v reakcijski zmesi, ki je ves čas reakcije konstantna. Tako se koncentracija produkta v primeru uporabe imobiliziranega encima izraža kot koncentracija na gram encima:

$$\bar{c}_e(t = t_n) = \frac{n'_e(t = t_n)}{m_{\text{encima}} \cdot \frac{G'_0(t = t_{n-1})}{G'_0(t = t_{n-1})}} \quad [\text{mol/g/g}_{\text{encima}}] \quad (12)$$

Rezultati in diskusija:

Na diagramu prikažite odvisnost koncentracije nastalega produkta od časa poteka reakcije pri različnih temperaturah. Določite začetne hitrosti posameznih reakcij, skonstruirajte Arrheniusov diagram ter določite termodinamske parametre za dano reakcijo. Tabelarično podajte vse meritve, kot prikazuje tabela 1 ter navedite svoja opažanja in ugotovitve.

Tabela 1: Tabelarični prikaz rezultatov.

t/h	$m_{\text{odvzetega vzorca}}/g$	$m_{\text{zatehte za analizo}}/g$	V_{NaOH}/ml	PK /%
0			
0,083		
....		
3		

t/h	PK /%	n_k /mmol	n'_k /mmol	n_e /mmol	n'_e /mmol	c_k /(mmol/g)	c_e /(mmol/g)	\bar{c}_e /(mmol/g/g _{encima})
0							
...
....
3						

Literatura:

- Brzin, B., Budič, S., Gubina, M., Kozak, M., Likar, M., Stropnik, Z., Vozelj, M., Zajc-Satler, J. *Praktikum iz mikrobiologije in parazitologije*. Likar, M. (ur.). Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo medicinske fakultete v Ljubljani, Ljubljana : Univerza v Ljubljani, 1972.
- Janc, M., Rupnik, M. *Splošna mikrobiologija : navodila za vaje*, (Knjižna zbirka Scripta, Mikrobiologija). Ljubljana : ŠOU, Študentska založba, 1998.
- Süssmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag : Stuttgart· New York, 1999.
- Bole-Hribovšek, V., Hostnik, P. *Osnove dela v mikrobiološkem laboratoriju, Priročnik za vaje iz mikrobiologije za veterinarje*. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1996.
- Kapun-Dolinar, A. *Mikrobiologija*. Kurnik, U. (ur.), Lorenčič, A. (ur.). 1. natis, Zavod RS za šolstvo, Ljubljana, 2001.
- Likar, M. *Mikrobiologija*. 2. izdaja, Dopisna delavska univerza Univerzum Ljubljana, 1979.
- *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A.L. (ur.), Davies, J.E., (ur.), 2. izdaja, American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 1999.