

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Andreja Kac

**SINTEZA ZAMREŽENIH ENCIMSKIH
SKUPKOV IZ ENCIMA AMILAZE**

Diplomska naloga

Maribor, julij 2009



UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO



SI - 2000 MARIBOR, Smetanova 17

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa
**SINTEZA ZAMREŽENIH ENCIMSKIH SKUPKOV IZ
 ENCIMA AMILAZE**

Študent: Andreja KAC
 Študijski program: univerzitetni, kemijska tehnologija
 Smer: biokemijska tehnika
 Predvideni strokovni naslov: univ. dipl. inž. kem. tehnol.

Mentorica: izr. prof. dr. Maja HABULIN
 Somentorica: doc. dr. Mateja PRIMOŽIČ

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala sama, prispevki drugih so posebej označeni.
 Pregledala sem literaturo iz področja diplomskega dela po naslednjih elementih:

Vir:	ScienceDirect
Gesla:	zamreženi encimski skupki, CLEA, α – amilaza, mrežni povezovalac, glutaraldehid
Skupine gesel (unija itd.):	imobilizacija encimov
Časovno obdobje:	Od leta 1959 do leta 2007
Število referenc:	29
Število prebranih izvlečkov:	13
Število prebranih člankov:	13
Število pregledanih knjig:	3

Maribor, julij 2009

 podpis študentke

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Maji Habulin za pomoč in vodenje pri opravljanju diplomskega dela. Prav tako se zahvaljujem vsem v laboratoriju za separacijske procese in produktno tehniko, ki so mi pomagali pri mojem vsakodnevem delu, še posebej Franji Šulek za njeno pomoč, podporo in razumevanje pri eksperimentalnem delu.

Posebna zahvala velja staršem, ki so mi omogočili študij in me pri tem spodbujali ter podpirali.

Najlepša hvala vsem.

SINTEZA ZAMREŽENIH ENCIMSKIH SKUPKOV IZ ENCIMA AMILAZE

Povzetek

Delo opisuje sintezo aktivnih encimskih skupkov ali agregatov iz encima α – amilaze in postopek zamreženja le – teh z glutaraldehidom, z namenom priprave končne oblike stabilnih zamreženih encimskih skupkov ali na kratko CLEAs. V splošni praksi je postopek priprave zamreženih encimskih skupkov razdeljen na dva ključna dela, in sicer, na precipitacijo topnega oziroma nativnega encima s pomočjo ustreznega organskega topila ali nasičene anorganske soli ter na nadaljnjo zamreženje tako izoborjenega encima s pomočjo zamrežitvenega agensa. Iz literature je znano, da je glutaraldehid, kot homobifunkcionalna organska molekula, najbolj pogosto uporabljen zamrežitveni agens, ker je relativno poceni in je njegova uporaba zelo enostavna. Pri postopku denaturacije oziroma obarjanja nativnega encima je potrebno preizkusiti čim več različnih denaturantov, z namenom, da se ugotovi, kateri uporabljeni denaturant ne povzroči ireverzibilne denaturacije encima, oziroma zagotovi, da je po ponovni resuspenziji izoborjenega encima v vodni raztopini aktivnost encima ponovno blizu 100 %.

V našem primeru smo uspešno sintetizirali zamrežene encimske skupke iz α – amilaze. Aktivnost CLEAs smo določili z reakcijo hidrolize vodotopnega škroba. Optimalni reakcijski pogoji sinteze zamreženih encimskih skupkov so bili doseženi pri koncentraciji encima α – amilaze $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8$ mg/mL in koncentraciji encima albumina (BSA) $\gamma_{\text{BSA}} = 8$ mg/mL. Za obarjanje smo uporabili $\varphi = 90$ % (v/v) delež različnih topil in $\varphi = 10$ % (v/v) delež raztopljenega encima. Obarjalna agensa, metanol in etanol, v katerih je encim obdržal najvišjo aktivnost, sta bila izbrana za naslednji korak – zamreženje. Reakcija zamreženja je potekala $t = 3$ h pri sobni temperaturi. Ugotovljeno je bilo, da je bila aktivnost zamreženih skupkov iz encima α – amilaze najvišja pri koncentraciji glutaraldehida $\varphi = 1$ % (v/v) in metanolu kot obarjalnemu reagentu.

Končni videz raztopine zamreženih encimskih agregatov je podoben motni suspenziji, v kateri so jasno vidni skupki encimov značilne sferične oblike in premera okrog $1 \mu\text{m}$. Tehnika za sintezo zamreženih encimskih agregatov je zelo enostavna in nasploh zelo obetavna metoda na področju imobilizacij različnih encimov.

Ključne besede: zamreženi encimski skupki, CLEAs, α – amilaza, mrežni povezovalac, glutaraldehid

UDK: 577.15:663.03(043.2)

SYNTHESIS CROSS – LINKED ENZYMES AGGREGATES OF ENZYME AMYLASE

Abstract

This work describe synthesis active enzyme aggregates of α – amylase, further cross – linked with glutaraldehyde in order to obtain the final form of stable cross – linked enzyme aggregates or CLEAs. In practise, the procedure to prepare cross – linked enzyme aggregates generally includes two major steps, that involves first the precipitation of the soluble enzyme with a suitable precipitant such as different organic solvents or inorganic salts and second the crosslinking step with an appropriate cross – linker. Generally, glutaraldehyde is the most common used crosslinking agent, since it is inexpensive and easily applicable. The precipitant of choice to make highly stable cross – linked enzyme aggregates is the one which gives the highest, preferably 100 %, activity yield after the re – suspension of the aggregated enzyme under investigation.

In the present study, the cross – linked enzyme aggregates of α – amylase were successfully produced. The activity of CLEAs was determined by the reaction hydrolysis of starch soluble in water. The optimal conditions for the synthesis of cross – linked enzymes aggregates were predicted as following: α – amylase concentration $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8$ mg/mL and enzyme bovine serum albumin (BSA) concentration $\gamma_{\text{BSA}} = 8$ mg/mL. The reaction of precipitation was conducted with up to $\varphi = 90$ % (v/v) of different precipitants and $\varphi = 10$ % (v/v) of dissolved enzyme. The precipitant agents, metanol and etanol, were further selected or optimization of the reaction of crosslinking. Reaction of crosslinking lasted for $t = 3$ h at room temperature. The highest activity recovery of CLEAs was obtained at glutaraldehyde concentration $\varphi = 1$ % (v/v) and methanol as a precipitant of choice.

The final suspension of CLEAs obtained is moderately turbid and enzyme particles can be normally observed with an average diameter of 1 μm . Moreover, CLEAs, as such, represent a promising and relatively facile technique for the preparation of any immobilized enzyme, respectively.

Key words: cross – linked enzyme aggregates, CLEAs, α – amylase, cross-linker, glutaraldehyde

UDK: 577.15:663.03(043.2)

VSEBINA

ZAHVALA	III
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
VSEBINA	1
SEZNAM SLIK	3
SEZNAM PREGLEDNIC	5
UPORABLJENE KRATICE	6
UPORABLJENI SIMBOLI	7
1 UVOD	8
1.1 CILJ NALOGE	9
2 TEORETIČNI DEL	10
2.1 IMOBILIZACIJA ENCIMA	10
2.2 OBSTOJEČE OBLIKE IMOBILIZACIJE ENCIMA.....	11
2.2.1 Adsorpcija	11
2.2.2 Kovalentna vezava.....	12
2.2.3 Ujetje encima	12
2.2.4 Mikroinkapsulacija.....	13
2.2.5 Nosilci	14
2.3 IMOBILIZACIJA ENCIMOV BREZ NOSILCA	17
2.3.1 CLEs – zamreženi raztopljeni encimi (ang. cross – linked dissolved enzyme).....	17
2.3.2 CLECs – zamreženi encimski kristali (ang. cross – linked enzyme crystal).....	17
2.3.3 CLSDs – zamreženi posušeni encimi (ang. cross – linked spray – dried enzyme).....	17
2.3.4 CLEAs – zamreženi encimski skupki (ang. cross – linked enzyme aggregate)	18
2.4 PRIPRAVA ZAMREŽENIH ENCIMSKIH SKUPKOV	20
2.4.1 Obarjanje ali precipitacija	20
2.4.2 Zamreženje	22
2.5 POLARNOST TOPIL.....	23

2.6	MREŽNI POVEZOVALEC – GLUTARALDEHID.....	25
2.7	ŠKROB.....	27
2.7.1	Kemijska struktura škroba	28
2.7.2	Hidroliza škroba	29
2.7.3	Glukoza.....	30
2.7.4	Maltoza	30
2.7.5	Dekstrini.....	31
2.8	ENCIMSKA KATALIZA	32
2.8.1	Mehanizem encimsko katalizirane reakcije.....	34
2.9	A – AMILAZA	34
3	EKSPERIMENTALNI DEL	36
3.1	MATERIALI	36
3.1.1	Reagenti.....	36
3.1.2	Laboratorijska oprema.....	36
3.2	OPIS PRIPRAVE CLEAS	37
3.3	OPIS IZVEDBE HIDROLIZE	39
3.4	ANALIZNE METODE	39
3.4.1	Določevanje koncentracije škroba.....	39
3.4.2	Določevanje koncentracije maltoze	40
3.4.3	Določevanje reducirnih sladkorjev	40
3.4.4	DNS metoda	41
3.4.5	Določanje koncentracije proteinov v vzorcu z Bradfordovo metodo.....	41
3.4.6	Aktivnostni test z encimom α – amilazo za razgradnjo škroba.....	42
4	REZULTATI.....	43
	I. DEL - OBARJANJE.....	43
4.1	KVALITATIVNA OCENA	43
4.2	OBARJANJE PROTEINOV BREZ PRISOTNOSTI STABILIZACIJSKEGA PROTEINA ALBUMINA IZ GOVEJEGA SERUMA (BSA).....	47
4.3	OBARJANJE PROTEINOV OB PRISOTNOSTI STABILIZACIJSKEGA PROTEINA ALBUMINA IZ GOVEJEGA SERUMA (BSA).....	49
	II. DEL - ZAMREŽENJE.....	51
4.4	VPLIV KONCENTRACIJE GLUTARALDEHIDA NA AKTIVNOST ZAMREŽENIH SKUPKOV ENCIMA A - AMILAZE	51
	III. DEL: REAKCIJA HIDROLIZE ŠKROBA	62
4.5	REAKCIJA HIDROLIZE Z IMOBILIZIRANO A – AMILAZO NA OSNOVI ZAMREŽENIH ENCIMSKIH SKUPKOV (CLEAS).....	62
4.5.1	Optimalni pogoji za sintezo CLEAs.....	62
4.5.2	Reakcija hidrolize škroba s prosto in imobilizirano α – amilazo.....	63
5	ZAKLJUČEK.....	68
6	LITERATURA.....	70
7	PRILOGE	72

SEZNAM SLIK

Slika 2-1: Struktura kopolimerizacije encima z reaktivnim monomerom.	12
Slika 2-2: Različne metode imobilizacije.	14
Slika 2-3: Vpliv kovalentne vezave na aktivnost imobiliziranih encimov.	15
Slika 2-4: Izgled CLEAs s presevnim elektronskim mikroskopom.	18
Slika 2-5: Postopek priprave zamreženih encimskih agregatov.	20
Slika 2-6: Obarjanje proteina.	22
Slika 2-7: Dipol.	24
Slika 2-8: Zamreženje s prečnim povezovalcem - GA.	25
Slika 2-9: Vezava GA na encim.	27
Slika 2-10: Kemijska struktura amilopektina.	28
Slika 2-11: Kemijska struktura amiloze.	28
Slika 2-12: Mehanizem hidrolize škroba.	29
Slika 2-13: Kemijska struktura glukoze.	30
Slika 2-14: Prostorska struktura glukoze.	30
Slika 2-15: Kemijska struktura maltoze.	31
Slika 2-16: Kemijska struktura dekstrina.	32
Slika 2-17: Encim α – amilaza.	35
Slika 3-1: Vorteks in namizni stresalnik.	36
Slika 3-2: Celoten postopek priprave CLEAs.	37
Slika 3-3: Priprava za obarjanje.	38
Slika 4-1: Obarjanje z acetonom. Pri reakciji obarjanja se encim ne izobori.	45
Slika 4-2: Obarjanje z acetonom. Po centrifugiranju ostane supernatant.	45
Slika 4-3: Obarjanje z metanolom. Nastanek oborine iz encima α – amilaze po centrifugiranju.	46
Slika 4-4: Relativna aktivnost resuspendiranega encima α – amilaze po obarjanju z različnimi obarjalnimi reagenti.	48
Slika 4-5: Relativna aktivnost resuspendiranega encima α – amilaze po obarjanju z različnimi obarjalnimi reagenti in dodatku ogrodnega proteina BSA.	50

Slika 4-6: Relativna aktivnost resuspendiranega encima α – amilaze z in brez dodatka ogradnega proteina BSA.	51
Slika 4-7: Relativna aktivnost zamreženih encimskih skupkov iz encima α – amilaze pri uporabi različnih obarjalnih agensov.	54
Slika 4-8: Vpliv koncentracije GA (% (v/v)) na aktivnost zamreženih encimskih skupkov	59
Slika 4-9: Vpliv koncentracije GA (% (v/v)) na aktivnost zamreženih encimskih skupkov	59
Slika 4-10: Primerjava vpliva koncentracije GA (% (v/v)) na aktivnost zamreženih encimskih skupkov α – amilaze pri obarjanju z metanolom in etanolom.	60
Slika 4-11: Primerjava relativnih aktivnosti v frakcijah supernatant, spiranje I, II in III pri sintezi CLEAs iz encima α – amilaze pri obarjanju z etanolom in metanolom ter stalni koncentraciji GA (1%, v/v)).	61
Slika 4-12: Reakcija hidrolize vodotopnega škroba, katalizirana s prosto in imobilizirano α – amilazo.	64
Slika 4-13: Primerjava reakcije hidrolize vodotopnega škroba, katalizirano s prosto α – amilazo in s frakcijo supernatanta po sintezi CLEAs iz α – amilaze.	65
Slika 4-14: Reakcija hidrolize vodotopnega škroba z imobilizirano α – amilazo.	66
Slika 4-15: Reakcija hidrolize vodotopnega škroba katalizirana s preostakom supernatanta po sintezi zamreženih encimskih skupkov α – amilaze.	67

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica 1.1: Lastnosti encima α – amilaze.	9
Preglednica 2.1: Primerjava različnih imobilizacijskih tehnik.	16
Preglednica 2.2: Polarnost in topnost za posamezna topila.	24
Preglednica 4.1: Kvalitativno preverjanje reakcije obarjanja.	44
Preglednica 4.2: Reakcija obarjanja z izbranimi topili brez ogrodnega proteina (BSA – albumin iz govejega seruma).	47
Preglednica 4.3: Reakcija obarjanja z izbranimi topili v prisotnosti ogrodnega proteina (BSA – albumin iz govejega seruma).	49
Preglednica 4.4: Zamreženje skupkov iz α – amilaze pri stalni koncentraciji GA (1 % (v/v)) in različnih obarjalnih reagentih.	52
Preglednica 4.5: Zamreženje skupkov iz α – amilaze pri stalni koncentraciji GA (1 % (v/v)) in različnih obarjalnih reagentih.	53
Preglednica 4.6: Vpliv koncentracije GA na aktivnost CLEAs pri uporabi metanola kot obarjalnega reagenta.	55
Preglednica 4.7: Vpliv koncentracije GA na koncentracijo proteina pri uporabi metanola kot obarjalnega reagenta.	56
Preglednica 4.8: Vpliv koncentracije GA na relativno aktivnost CLEAs pri uporabi etanola kot obarjalnega reagenta.	57
Preglednica 4.9: Vpliv koncentracije GA na koncentracijo proteina pri uporabi etanola kot obarjalnega reagenta.	58
Preglednica 4.10: Pogoji za sintezo CLEAs iz α – amilaze.	62

UPORABLJENE KRATICE

ang	angleško
CLEAs	zamreženi encimski skupki
CLECs	zamreženi encimski kristali
CLEs	zamreženi raztopljeni encimi
CSDEs	zamreženi posušeni encimi
BSA	albumin iz govejega seruma
DME	dimetil dioksan etanol
DMF	dimetil formamid
DMSO	dimetil sulfoksid
PEG	polietilenglikol različnih molskih mas (1500, 6000, 20000)
DNS	dinitrosalicilna kislina
PBS	fosfatni pufer
HCl	klorovodikova kislina
NaOH	natrijev hidroksid
KI	kalijev jodid
I ₂	jod
(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	škrob
C ₆ H ₁₀ O ₆	glukoza
IP	izoelektrična točka
KI ₃	jodovica
(NH ₄) ₂ SO ₄	amonijeva sol
Abs	absorbanca

UPORABLJENI SIMBOLI

T	temperatura	°C
γ	masna koncentracija	mg/mL
IU	aktivnost encima	$\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$
t	čas	h
M	molska masa	g/mol
ρ	gostota	g/mL
λ	valovna dolžina	nm
v	hitrost	rpm
m	masa	mg
V	prostornina	mL
X	presnova	%
r	premer	m
φ	prostorninski delež	% (v/v)
pH	pH raztopine	/
w	masni delež	% (w/w)
c	množinska koncentracija	mol/L

1 UVOD

Encimi so proteini, ki katalizirajo kemijske reakcije in se ne porabijo v procesu, v katerem sodelujejo. So biološke makromolekule, ki jih najdemo v vseh živih bitjih. Kljub temu da so sestavljeni iz skromnega nabora osnovnih gradnikov (aminokislin), izkazujejo osupljivo sposobnost tvorbe različnih struktur z visoko specifičnimi katalitičnimi mesti na površini. Posledično proteini na različnih fizioloških nivojih izvajajo vse zahtevne in zapletene procese v živih bitjih. Za ilustracijo si pogledajmo znameniti citat A. M. Leska:

"In the drama of life on a molecular scale, proteins are where the action is."[1]

Encimi so vključeni v biotehnološke procese, kot na primer v prehrabeni industriji (sirjenje, varjenje piva, proizvodnja vina, sadnih sokov, pretvorba škroba, proizvodnja mleka, pečenje, itd.), v proizvodnji krme za živali, tekstilni, papirni, kozmetični, farmacevtski industriji ter pri razvoju biosenzorjev in biogoriv. Napredek teh procesov pa temelji na genetiki ter inženirstvu proteinov.[2]

Uporaba encimov v tehnoloških procesih je omejena zaradi njihove termo–nestabilnosti, porabe v procesu, kontaminacije produkta z encimom, saj njegovo odstranjevanje zahteva dodatne stroške čiščenja, ter denaturacije pri višji temperaturi in v organskih topilih.

Vse to so razlogi za imobilizacijo encimov. Prednost imobiliziranih encimov je enostavna ločitev iz reakcijske mešanice, z njimi lahko dosežemo zelo visoko encimsko koncentracijo ter lahko zadržijo aktivnost dlje časa, zato so uporabni za kontinuirane procese.[3]

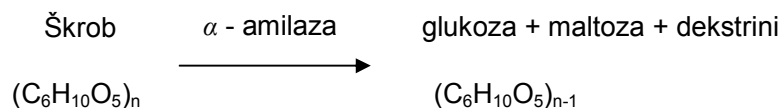
1.1 Cilj naloge

Cilj naloge je bil pripraviti zamrežene encimske skupke iz encima α - amilaze z lastnostmi, ki so prikazane v preglednici 1.1:

Preglednica 1.1: Lastnosti encima α – amilaze.

ENCIM AMILAZA	OPTIMALNA TEMPERATURA	OPTIMALEN pH	LASTNOSTI
Fungamyl T800 α – amilaza (proizvajalec Novozymes Nizozemska)	30 °C	4 – 6	bazične

Aktivnost zamreženih encimskih skupkov smo določili na osnovi reakcije hidrolize vodotopnega škroba, ki razpade na sledeče produkte:



Pri pripravi zamreženih encimskih skupkov, smo se osredotočili na optimizacijo ključnih parametrov:

- določitev vrste in volumskega deleža obarjalnega agensa ali precipitanta,
- določitev optimalne koncentracije glutaraldehida (GA) in
- določitev optimalne koncentracije uporabljenega encima.

Zamrežene encimske skupke smo sintetizirali tudi v prisotnosti ogrodnega proteina albumina iz govejega seruma (BSA), za doseganje višje stabilnosti encimskih skupkov. Vpliva volumskega deleža obarjalnega agensa in časa reakcije zamreženja nismo proučevali, ker literatura navaja, da sta optimalna pri $\varphi = 90\%$ (v/v) in $t = 3\text{ h}$. [4]

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Imobilizacija encima

Imobilizirani encimi so definirani kot encimi, ki so fizično zaprti ali lokalizirani, tako da zadržujemo njihovo katalitično aktivnost. Uporabimo jih lahko večkrat in nepretrgoma.[5]

Za enostavno pot separacije encima in produkta med reakcijo uporabljamo dvo – fazni sistem: ena faza vsebuje encim in druga produkt. Encim je zaprt znotraj ene faze in s tem je omogočena ponovna uporaba oziroma kontinuirana raba, toda preprečiti moramo kontaminacijo s produktom. Ostale molekule (reaktanti) pa imajo prosto pot med obema fazama. Ta pojav je poznan kot imobilizacija in jo lahko opravimo s fiksiranjem encima na material ali znotraj drugega materiala. Izraz »imobilizacija« ne pomeni nujno, da se encim ne more prosto gibati znotraj faze, čeprav je to najpogostejši pojav. Veliko netopnih materialov lahko uporabimo za imobilizacijo encimov, in s tem ko jih vežemo na nosilec, jih naredimo netopne. Ti nosilci so navadno inertne polimerne ali anorganske matrice.[6]

Brez imobilizacije bi encim skupaj s končnim produktom zapustil reaktor. Ne samo, da moramo izgubljen encim nadomestiti z novim, temveč lahko tudi encim, ki se izloči s produktom, predstavlja nezaželene nečistote, ki jih moramo odstraniti. Imobilizirani encimi dlje obdržijo svojo aktivnost in jih lahko fiksiramo v bližino drugih encimov, ki sodelujejo pri katalizi ter s tem povečamo učinkovitost reakcije. Imajo velik vpliv na rezultate biokatalize, ki vključuje parametre kot so: aktivnost, učinkovitost, deaktivacija, regeneracijske sposobnosti in stroški. Upoštevati pa moramo tudi toksičnost imobilizacijskih reagentov.[7]

Najpomembnejša prednost imobilizacije je enostavna separacija encima od produkta pri katalitični reakciji. To prepreči onesnaženje encima s produktom, zmanjša stroške tokovnega procesa in probleme z odpadnimi vodami. Omogoča kontinuirane procese z manjšo porabo encima, laboratorijskimi in drugimi stroški. Produktivnost imobiliziranih encimov je večja v primerjavi s prostimi encimi, če v daljšem časovnem obdobju dovajamo višje koncentracije substrata. Prednost encimov na splošno je tudi ta, da lahko delujejo že pri blagih reakcijskih pogojih.[6]

Imobiliziran encim mora obdržati čim več prvotne katalitične aktivnosti. To lahko zagotovimo z zmanjšanjem količine encima, vezanega v nekatalitični konformaciji. Imobilizacija encima v prisotnosti nasičenih koncentracij substrata, produkta ali

kompetitivnega inhibitorja zagotavlja, da ostane aktivno mesto med kovalentno vezavo aktivno in da se zmanjša nastanek neproduktivnih konformacij biokatalizatorja. Aktivnost imobiliziranega encima se obnovi z izpiranjem in odstranjevanjem molekul iz aktivnega mesta.[8]

Cilj tega dela je izvesti encimsko hidrolizo škroba pri optimalnih reakcijskih parametrih, kot so temperatura, rotacijska hitrost, koncentracija encima, substrata in učinek specifičnosti substrata. V ta namen smo uporabili substrat – škrob, topen v vodi ter izvedli test specifičnosti substrata na encim α – amilaza. Nato smo encim α – amilazo pri optimalnih pogojih oborili in zamrežili, tako da smo dobili zamrežene encimske skupke ali agregate.

2.2 Obstoječe oblike imobilizacije encima

Poznamo več različnih metod, s katerimi lahko encim lokaliziramo. V splošnem poznamo naslednje načine imobilizacije: kemijske metode, kjer se tvorijo kovalentne ali ionske vezi z encimom, ter fizikalne metode, ki vsebujejo šibke interakcije z encimom.[7]

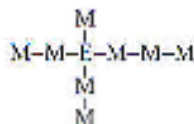
2.2.1 Adsorpcija

Adsorpcija je najenostavnejši način imobilizacije biokatalizatorjev. Pri tem načinu je encim nekovalentno adsorbiran na netopni nosilec. To lahko dosežemo tako, da vodna raztopina encima pride v stik z nosilcem. Vezava je omogočena zaradi kombinacije hidrofobnega učinka in tvorbe različnih soli v verigi encimske molekule. Primeri adsorbentov so: aluminij, anionsko izmenjevalne smole, kalcijev karbonat, kationsko izmenjevalne smole, celuloza, kolagen, koloidni ioni, kondicionirane kovine, steklene plošče, diatomejska zemlja, hidroksiapatit, porozni ogljik, glina, kovinski oksidi, stekla ali polimerne aromatske smole. Prednosti adsorpcijskih tehnik so: enostavnost; imobilizirani encim je možno ločevati in čistiti; običajno se encimi z adsorpcijo ne deaktivirajo; ter adsorpcija je reverzibilen proces. Pomanjkljivosti adsorpcijskih tehnik so: šibke sile v povezavi; imobilizacijsko stanje je zelo občutljivo na pH raztopine in temperaturo; ter nizka koncentracija encima, nanesenega na enoto nosilca.[6,7]

2.2.2 Kovalentna vezava

Imobilizacija encimov s kovalentnim vezanjem na netopno podlago je zelo razširjena tehnika. Jakost te vezave je zelo močna, vendar se kljub temu zgodi, da majhen del encima uhaja z nosilca. Uporabnost tvorbe kovalentne vezi je odvisna od koristnosti, reaktivnosti in stabilnosti takšne vezave. S pomočjo kovalentne vezave se na primer primarne skupine -NH, -OH, -SH, -COOH vežejo na encim ali na organske in anorganske (porozne ali neporozne) nosilce. Porozni nosilci imajo visoko površino na enoto mase, ki omogočajo visoko encimsko nosilnost. Glavna slabost imobilizacije poroznih nosilcev, posebej pri hidrolizi škroba, je primernost površine za encimsko vezavo. Pore morajo biti dovolj velike, ne samo za encim, ampak tudi za substrat. Za kovalentno encimsko povezavo se uporabljajo naravni (npr. celuloza, agaroz, CM celuloza, dekstran) in sintetični nosilci (npr. derivati poliakrilamida, poliaminopolistiren), ki so narejeni iz netopnih materialov. Ostali materiali, ki se uporabljajo kot nosilci imobiliziranih encimov, vključujejo še keramiko, steklo ter kovinske okside.[6,7]

Druga možnost imobilizacije s kovalentno vezavo je *kopolimerizacija* encima z reaktivnim monomerom (M): $nM + E \rightarrow M_nE$, kjer ima M_nE strukturo, ki jo prikazuje slika 2 – 1:



Slika 2-1: Struktura kopolimerizacije encima z reaktivnim monomerom.

Aktivni polimeri se v postopku imobilizacije enostavno zmešajo z encimom. Običajno moramo naravne ali sintetične polimere aktivirati z reagenti pred dodajanjem encima. Aktivacija je kemijska presnova funkcionalne skupine polimera. Aktivno mesto encima ne sme biti udeleženo pri vezavi z nosilcem.[6,7]

2.2.3 Ujetje encima

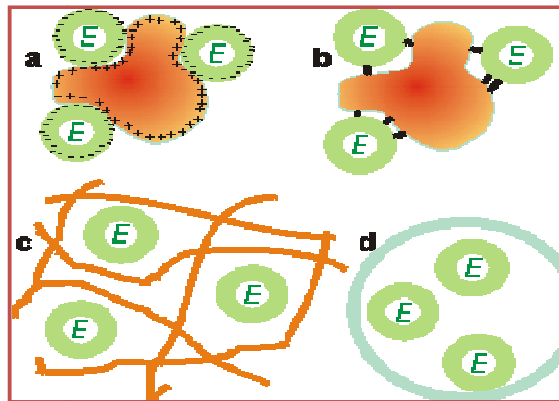
Ujetje encima z gelom ali vlakni je primerna metoda za procese, ki obsegajo nižje molekulske mase substrata ali produkta. Količina, ki jo lahko ujamemo, ne sme preseči 1 gram encima na gram gela ali vlakna. Proces ujetja encima deluje kot kletka in je fizikalna metoda. Encimi so ujeti v zamrežen polimer. Največja prednost metode je, da ni kemijske modifikacije encima ter se njegove lastnosti ne spremenijo. Encim se lahko deaktivira med formacijo gela. Problem je izguba encima. Najbolj pogosto uporabljen zamrežen polimer je poliakrilamidni gel. Na poliakrilamidni gel so imobilizirali encime: alkoholno dehidrogenazo, glukoza oksidazo, aminokislinsko oksidazo, heksokinazo, glukoza izomerazo, ureazo idr.

Ta metoda ima široko uporabo, saj z njo lahko imobiliziramo različne vrste encimov, mikrobnih, živalskih ali rastlinskih celic ter organelov.[6,7]

2.2.4 Mikroinkapsulacija

Mikroinkapsulacijo ali membransko omejitev encima lahko dosežemo s številnimi različnimi metodami, ki so odvisne od uporabe semi-permeabilne narave membrane. Ta omejitev encima omogoča prosti prehod za reakcijske produkte in substrate. Preprostost te metode lahko dosežemo, če namestimo encim na eni strani semi-permeabilne membrane, medtem ko je tok produktov in substratov prisoten na drugi strani te membrane. Membrana je prepustna le za molekule z manjšo molsko maso od molske mase encima. Ta postopek je drag, vendar enostaven za različne vrste encimov (vključno z regeneriranimi koencimskimi sistemi). Mehanizem ujetja encima lahko razdelimo v dve skupini: a) encim je lahko vložen v polimerno mrežo, in b) encim v raztopini zadržimo s prepustno membrano, ki pa je prepustna le za substrat in reakcijski produkt. Najbolj uporabna za encimsko ujetje je polimerna mreža iz poliakrilamidnega gela, ki je narejena z zamreženjem akrilamida v prisotnosti encima. Encimi ostanejo v raztopini, in ker je ta fizično zaprta, encimi ne morejo uhajati. Druga imobilizacijska tehnika je mikroinkapsulacija, kjer so encimi ujeti v kapsulo, ki ima premer, $r = 300 \mu\text{m}$. Takšna kapsula je obdana s sferično membrano, ki skozi pore prepušča majhne substrate in molekule produkta. Pore zadržijo encim in ostale velike molekule. Ločimo dve različni verziji semi-permeabilne mikrokapsule. Prva ima permanentno polimerno membrano. Za tvorbo te vrste membrane je potrebna kopolimerizacijska reakcija, ki vodi do vmesne faze med organsko in disperzijsko vodno fazo, ki vsebuje encim. Kopolimerizacijska reakcija se zgodi samo v bližini te vmesne faze. Druga metoda za permanentno mikrokapsulo vključuje fazno separacijo v polimerni raztopini in koncentriranje polimera v vmesni fazi. Nepermanentne mikrokapsule lahko naredimo z emulgiranjem vodne encimske raztopine. Te oblike kapsul obkrožajo membrane s tekočim površjem in jih lahko dodamo v vodno raztopino substrata. Membrana je v nekaterih primerih narejena tako, da selektivno prepušča samo določene substrate. Membrana je prav tako pomembna bariera za masni transfer, tako da je učinkovitostni faktor encimov majhen. Te tehnike pa niso uporabne, kadar je velikost molekul substrata približno enaka molekulam encima.[6,7]

Zgoraj opisane metode so prikazane na sliki 2 – 2. Pod točko a) je razvidna adsorpcija, kjer je encim nekovalentno adsorbiran na netopni delec. Kovalentno vezavo lahko vidimo pri točki b), saj je encim kovalentno povezan z netopnimi delci. Ujetje je prikazano pod točko c), kjer je encim ujet znotraj netopnega delca z zamrežitvenim polimerom. Točka d) pa prikazuje mikroinkapsulacijo, pri tem načinu imobilizacije pa encim omejimo s semi-permeabilno membrano.[6]



Slika 2-2: Različne metode imobilizacije.[6]

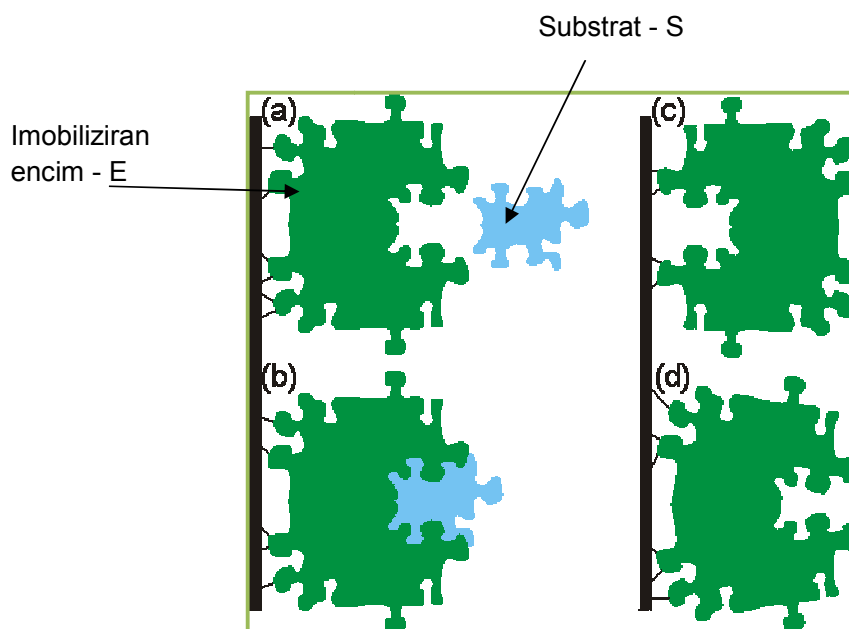
2.2.5 Nosilci

Izbor nosilca je odvisen od njegovih površinskih lastnosti: Ali se bo encim adsorbiral na površino? Ali ima material funkcionalne skupine, ki se bodo uporabile za vezavo z encimom? Ali lahko površino nosilca kemijsko modificiramo?

Nosilci za encimsko imobilizacijo z adsorpcijo in kovalentno vezavo morajo biti izbrani previdno, saj vplivajo na aktivnost encima in navidezno kinetiko. V industrijskih procesih je pomembno razmerje stroškov za nosilce v primerjavi s celotnimi stroški procesa. Idealen nosilec je poceni, inerten, fizično močan in stabilen, poveča specifičnost encima in zmanjša inhibicijo s produktom, pomakne pH optimuma k želeni vrednosti za proces in onemogoča mikrobo rast. Oblika, gostota, poroznost, porazdelitev por, stabilnost in porazdelitev velikosti delcev nosilca vplivajo na konfiguracijo reaktorja, v katerem bomo uporabili imobiliziran biokatalizator.

Pomembne interakcije med površino nosilca in reakcijsko zmesjo so: sprememba pH raztopine z uporabo nabitega nosilca (sprememba katalitične aktivnosti), hidrofilnost in hidrofobnost nosilca.

Nekatere matrice imajo tudi ostale lastnosti, kot na primer feromagnetizem (npr. magnetni železovi oksidi omogočajo transport biokatalizatorjev na magnetno področje), katalitično površino (manganov oksid katalitično odstrani vodikov peroksid, ki ga proizvaja večina oksidaz) ali zmanjšanje površinskega okolja (titan z oksidacijo inaktivira encim).[7,9]



Slika 2-3: Vpliv kovalentne vezave na aktivnost imobiliziranih encimov.[6]

Slika 2 – 3 prikazuje pod točko a) imobiliziran encim (E), ki ima aktivno mesto nespremenjeno in je zmožen sprejeti molekulo substrata (S), kot kaže slika 2 – 3 b). Slika 2 – 3 c) prikazuje encimsko vez, ki je v neproduktivnem stanju zaradi nedostopnosti aktivnega mesta. Na sliki 2 – 3 d) pa lahko vidimo zvitje aktivnega mesta, ki povzroči inaktivacijo imobiliziranega encima. S tem neproduktivnim načinom preprečimo reverzibilno vezavo velikih molekul v ali blizu aktivnega mesta. Zvitje ovira molekulo med procesom vezave substrata na aktivno mesto encima. Tako slika 2 – 3 c) kot 2 – 3 d) zmanjšata prostor med encimom in nosilcem ter vplivata na sferično površino encima.[6]

V preglednici 2.1 so prikazane karakteristike različnih imobilizacijskih tehnik in njihova primerjava.[6]

Preglednica 2.1: Primerjava različnih imobilizacijskih tehnik.

Karakteristike	Adsorpcija	Kovalentna vezava	Ujetje	Membrana
priprava	enostavna	težavna	težavna	enostavna
stroški	nizki	visoki	zmerni	visoki
vezna sila	variabilna	močna	šibka	močna
uhajanje encima	da	ne	da	ne
uporabnost	široka	selektivna	široka	zelo široka
problemi delovanja	veliki	majhni	veliki	veliki
vpliv matrice	da	da	da	-
velike difuzijske omejitve	ne	ne	da	da
mikrobna zaščita	ne	ne	da	da

V drugi polovici prejšnjega stoletja so se številni avtorji posvetili razvoju nosilcev za imobilizacijo encimov, z namenom, da bi pospešili njihovo uporabo pri kontinuiranih procesih. S takšnimi encimi bi lahko zmanjšali stroške proizvodnje in omogočili boljše separacijo, reciklažo ter lažje kontrolirali procese. Nadalje bi lahko izboljšali učinek encimov: stabilnost, selektivnost in aktivnost. Na žalost uporaba posebnih polimerov, kot nosilcev, vodi do slabljenja aktivnosti imobiliziranih encimov zaradi uvajanja večjih količin nekatalitične mase, ki se razprostira od 90 % do 99,9 %. To vodi do manjšega donosa in nižje produktivnosti. Imobilizacija encima na nosilec vodi do izgube več kot 50 % prvotne aktivnosti encima. To vpliva na razvoj imobiliziranih encimov brez nosilca, kot so na primer zamreženi encimski kristali (CLECs), zamreženi raztopljeni encimi (CLEs) in zamreženi encimski agregati (CLEAs). Ti imajo številne prednosti, kot so: višja koncentracija encimske aktivnosti katalizatorja, višja stabilnost in nižji stroški proizvodnje.[9]

Če povzamemo, imobilizirane encime definiramo kot sestavino dveh bistvenih komponent: nekatalitične komponente (nosilec), ki je oblikovana tako, da pospešuje ločitev in kontrolo procesov, ter katalitične komponente (encim), ki je oblikovana tako, da preoblikuje substrat v zadovoljive in zahtevane produkte. Nekatalitičen del je povezan s fizikalno in kemijsko naravo nosilca, medtem ko so katalitični parametri povezani z aktivnostjo, selektivnostjo in stabilnostjo encima.[10]

2.3 Imobilizacija encimov brez nosilca

Imobilizirani encimi brez nosilca so večinoma pripravljene direktno z zamreženjem različnih encimskih preparatov, kot so na primer zamreženi raztopljeni encimi (CLEs), zamreženi encimski kristali (CLECs), zamreženi posušeni encimi (CSDEs) in encimski skupki ali agregati (CLEAs). Ti se med seboj razlikujejo le v mrežno – prečnih povezovalcih, ki se uporabljajo pri zamreženju encimskih molekul.

2.3.1 CLEs – zamreženi raztopljeni encimi (ang. cross – linked dissolved enzyme)

Termo–stabilnost encimov lahko povečamo z zamreženjem raztopljenih encimov, ki zahtevajo ravnotežje med količino zamrežitvenega reagenta, temperaturo, pH ter ionsko močjo. Intermolekularna zamrežitev raztopljenega encima ima številne slabosti, in sicer slabšo aktivnost encima (približno 50 % prvotnega encima), revno reprodukcijo in nizko stabilnost. Stabilnost raztopljenih encimov lahko povečamo, če ujamemo encim oz. zamrežimo encime v gelu ali jih adsorbiramo na inertni nosilec ali membrano.

2.3.2 CLECs – zamreženi encimski kristali (ang. cross – linked enzyme crystal)

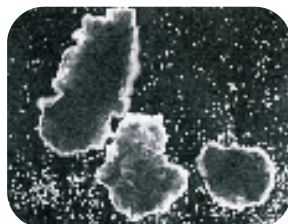
Pomembne lastnosti zamreženih encimskih kristalov so, da povečajo termo in mehansko stabilnost. Imajo široko pH stabilnost in povečajo stabilnost organskih raztopin. Ti encimi zmanjšujejo velikost kristala in so odločilni za zadrževanje visoke aktivnosti. Tolerantni so tudi v nekonvencionalnih medijih. Njihova pozitivna karakteristika je tudi visoka stabilnost pri ekstremnih pogojih (pH, temperatura, topnost v organskih topilih). Imajo velikosti od 1 do 100 μm . V industrijskem merilu se CLECs uporabljajo pri hidrolizah (lipaze, proteaze in amilaze) kot biokatalizatorji za asimetrične sinteze, uporabljajo pa se tudi kot mikroporozni material za kromatografijo ali kot kontrolni proteini zdravil.

2.3.3 CLSDs – zamreženi posušeni encimi (ang. cross – linked spray – dried enzyme)

»Posušene« encime lahko uporabljamo za pripravo zamreženih encimov. Aktivnost CLSDs je v primerjavi z CLECs, CLEAs in imobilizacijo na nosilec nižja.[9]

2.3.4 CLEAs – zamreženi encimski skupki (ang. cross – linked enzyme aggregate)

Slaba stran CLECs je, da potrebujemo čist encim in kristalizacija encima. Vse to lahko enostavno odpravimo z uporabo CLEAs. Ta način imobilizacije šele prihaja v uporabo.



Slika 2-4: Izgled CLEAs s presevnim elektronskim mikroskopom.[4]

Topne encime lahko preoblikujemo v skupke ali agregate, ki se po zamreženju imenujejo CLEAs. Te skupke, ki jih prikazuje slika 2 – 4, dobimo s spreminjanjem hidratacijskega stanja encimskih molekul ali elektrostatične konstante v raztopini. Podobno kot zamrežene encimske kristale, lahko netopne agregate zamrežimo z zmesjo bifunkcionalnega zamrežitvenega reagenta.[9]

Prednost zamreženih encimskih skupkov je tudi v tem, da izvedemo čiščenje in imobilizacijo encima v enem koraku.

Dodatek anorganskih soli, organskih topil, neionskih polimerov ali kislin vodi do reakcije obarjanja ali precipitacije. Je splošno uporabljena metoda za postopek očiščevanja ali izolacije proteina. Skupki, ki se med reakcijo obarjanja formirajo, so supermolekularne strukture, povezane z nekovalentnimi vezmi in se z dodatkom vodne raztopine ustrezne pH vrednosti ponovno suspendirajo. Pri postopku obarjanja oziroma denaturacije nativnega encima ob dodatku ustreznega obarjalnega agensa, je potrebno preizkusiti čim več različnih denaturantov, z namenom, da se ugotovi, kateri od uporabljenih ne povzroči ireverzibilne denaturacije encima, oziroma, da je po ponovni resuspenziji izoborjenega encima v vodni raztopini njegova aktivnost ponovno blizu 100 %.[4,11]

Naslednja faza za pripravo CLEAs je zamreženje encimskih skupkov. V ta namen se najpogosteje kot bifunkcionalni mrežni povezovalci uporablja GA, saj je relativno poceni in enostaven za uporabo. Le – tega dodamo po postopku obarjanja. Kadar kot mrežni povezovalci uporabljamo GA, se lahko pojavi deaktivacija encima, saj lahko GA reagira z amino – kislinskimi deli encima, ki so odločilni za njegovo aktivnost. Zaradi tega je optimizacija koncentracije GA nujno potrebna, z namenom, da se uporabi minimalna količina mrežnega povezovalca. Šele zamreženje generira končno obliko zamreženih

encimskih agregatov ali CLEAs. Tako encim postane trajno netopen, in s tem ohrani katalitično aktivnost. Po končani reakciji zamrežene encimske skupke iz reakcijske zmesi ločimo s centrifugiranjem.

Molekule encima v obliki zamreženih encimskih skupkov so povezane s kovalentnimi, medmolekularnimi vezmi, ki so nastale z dodatkom mrežnega povezovalca. Končni videz raztopine zamreženih encimskih agregatov je podoben motni suspenziji, v kateri so jasno vidni skupki encimov, značilne sferične oblike in premera okrog, $r = 1 \mu\text{m}$. Dodatek BSA k zamreženim encimskim skupkom poveča stabilnost encimskih agregatov, kar poenostavi postopek zamreženja encimskih delcev z GA. Tehnika za sintezo zamreženih encimskih agregatov je zelo enostavna in nasploh zelo obetavna metoda na področju imobilizacije različnih encimov.[4,12]

V nekaterih primerih je bila opažena hiperaktivacija, kar pomeni, da je bila aktivnost v primerjavi s prostim encimom neprimerljivo višja. Ta fenomen hiperaktivacije je najverjetneje posledica konformacijskih sprememb v proteinu v obliki skupkov ali agregatov.[11]

CLEAs je zanimiva zaradi enostavne in natančne sinteze, široke uporabnosti, visoke stabilnosti ter volumske aktivnosti. Bistvene slabosti prve generacije CLEAs so bile, da je bila velikost delca običajno pod $10 \mu\text{m}$.[10]

Za proteinsko agregacijo se pogosto uporablja primarna metoda proteinskega čiščenja, priprava CLEAs, odstranitev visoko čistega encima in kristalizacija. Vsak encim s spremenljivo čistostjo lahko tvori obliko agregatov. Če primerjamo CLEAs z ostalimi imobiliziranimi encimi brez nosilca, ta način imobilizacije šele prihaja v uporabo. Čeprav ima CLEAs številne podobnosti z ostalimi načini imobilizacije brez nosilca, predvsem s CLECs, ima tudi številne prednosti, kot sta visoka aktivnost ter stabilnost.

Pomembna so dejstva, kako kontrolirati velikost delca v encimskem agregatu brez povzročitve difuzijske sile, kako narediti encimsko strukturo gibčno, ter kako prilagoditi encimsko aktivnost in selektivnost s spremembo agregacijskih pogojev. Cilj je ustvariti fleksibilno tehnologijo za projektiranje in ustvarjanje robustne CLEAs za široko uporabo.[11]

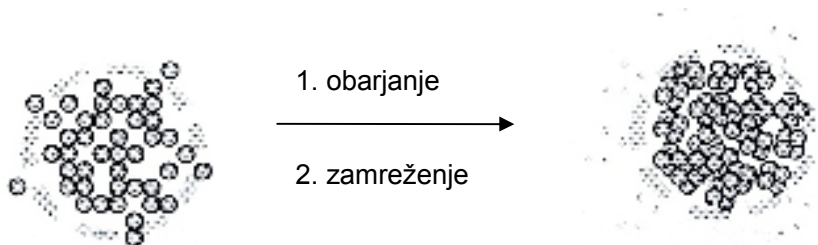
Če primerjamo katalitične aktivnosti imobiliziranih encimov brez nosilca (npr. CLEAs ali CLECs), lahko ugotovimo 10 – 1000 –krat višjo volumetrično aktivnost ($IU/\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}}$) kot pri imobiliziranih encimih na nosilce. Uporaba imobiliziranih encimov brez nosilca je koristna za procese z visoko produktivnostjo in za procese, ki vključujejo labilne encime, ki se niso sposobni stabilizirati po navadni metodi imobilizacije. Pri tehnoloških procesih je s tem načinom imobilizacije možno oskrbeti reaktor z večjimi količinami encima.

S tem ne podaljšamo reakcijskega časa in ti encimi zasedejo le 10 – 20 % prostora v reaktorju.

Uporaba imobiliziranih encimov brez nosilca v biokatalizi nudi številne prednosti predvsem za industrijsko uporabo: enostavna priprava, nižji stroški, fleksibilnost in širok doseg.[10]

2.4 Priprava zamreženih encimskih skupkov

Priprava zamreženih encimskih skupkov ali agregatov je bila uspešno izvedena za različne encime, med njimi za lipaze, nitrilaze, oksinitrilaze in različne oksidoreduktaze. Metoda priprave zamreženih encimskih skupkov je preprosta in čas, potreben za sintezo le – teh, je v primerjavi z ostalimi metodami imobilizacije znatno krajši. Postopek za pripravo stabilnega katalizatorja na osnovi zamreženih encimskih agregatov je preprost in sestoji iz dveh stopenj, kot je razvidno iz slike 2 – 5: obarjanja ali precipitacije in zamreženja. Encime, obkrožene z membrano, s postopkom obarjanja in zamreženja imobiliziramo v CLEAs.



Slika 2-5: Postopek priprave zamreženih encimskih agregatov.

2.4.1 Obarjanje ali precipitacija

Obarjanje ali precipitacija encima je splošno uporaben postopek za koncentriranje ali selektivno ločevanje encima iz reakcijske zmesi. Pri dodatku ustreznega topila se zgodi, da se encim izobori, in opazimo lahko prehajanje topne oblike encima v netopno. Pravimo, da encim izgublja svojo nativno, naravno strukturo, in se zato izobori ali precipitira. Z nekaterimi obarjalnimi reagenti, kot je SDS (Na – dodecil sulfat), lahko encim nepovratno poškodujemo ali denaturiramo. To pomeni, da pri ponovni vzpostavitvi naravnega okolja encima, torej z dodatkom vodne raztopine določene ionske jakosti in pH vrednosti, ostane encim neaktiven ali pa kaže neprimerljivo nizko aktivnost.

Med postopkom obarjanja encim oborimo iz raztopine z dodatkom ustreznega denaturanta. Največkrat uporabljeni obarjalni reagenti so anorganske soli (amonijeve sol) in vodotopna organska topila (aceton, 2 – propanol, *t* – butil alkohol ...), sem spadajo tudi nekateri polimeri kot polietilen glikol (PEG). Iskanje najboljšega obarjalnega agensa za posamezni encim, ki pri tem ne poškoduje strukture encima, lahko poenostavimo s poznavanjem izoelektrične točke (IP) encima. Znano je, da se encim pri IP, ki je določena za vsak encim posebej, izobori iz medija že sam od sebe. Dodatek ustreznega topila postopek obarjanja samo pospeši, saj daljše ali prekomerno izpostavljanje encima delovanju denaturanta lahko encim trajno, ireverzibilno poškoduje. Na koncu postopka obarjanja nastanejo skupki encima, ki se v naslednji stopnji zamrežijo z ustreznim zamrežitvenim agentom.[4]

Pri uporabi amonijevega sulfata ali PEG se vsak protein obori s karakteristično koncentracijo reagenta in to lastnost izkoriščamo za separacijo različnih proteinov. Za vsak protein mora biti preizkušena meja obarjanja oziroma koncentracijsko območje reagenta, v katerem se zgodi obarjanje encima.[13]

Pri postopku priprave zamreženih encimskih agregatov (CLEAs) moramo najti primerno topilo, ki encima ne poškoduje in da je hkrati po resuspenziji izoborjenega encima v vodni raztopini aktivnost encima ponovno blizu 100 %, torej aktivnost imobiliziranega encima je približno enaka aktivnosti nativnega, prostega encima. Pri obarjanju encima dobimo dvo – fazni sistem: trdno usedlino svetle barve (ang. pellet), ki predstavlja izoborjeni encim in tekočino (supernatant), ki predstavlja topilo. Velikokrat se zgodi, da nekaj neizoborjenega encima ostane v tekoči frakciji, zato je preverjanje aktivnosti v supernatantu nujno. Na takšen način ugotovimo, kateri obarjalni reagent ja najbolj učinkovit, da poteče obarjanje 100 % brez morebitne denaturacije encima. V nekaterih primerih do obarjanja sploh ne pride. V tem primeru vzamemo celoten volumen reakcijske zmesi kot supernatant. Vzroki so predvsem fizikalni: pH vrednost topila, neprimerna ionska moč topila itd.[4]

Slika 2 – 6 prikazuje postopek obarjanja proteina. Oborina nastane iz encimskih molekul zaradi spremembe električnega naboja na površini molekul encima.[4]



Slika 2-6: Obarjanje proteina.[4]

2.4.2 Zamreženje

Imobilizacija encima v velikostih le nekaj nanometrov se izvaja tudi s postopkom zamreženja nativnega encima. Takšen postopek je zelo atraktiven predvsem zato, ker je končni produkt sestavljen iz čistega, nativnega encima. Koncentracija encima na enoto volumna je v zamreženem encimskem preparatu izredno visoka, to je tudi odločujoč dejavnik, zakaj se danes veliko pozornosti namenja prav tej tehniki vezave encima in njenim izboljšavam. S tehniko zamreženja lahko dobimo dva končna encimska produkta:

- zamreženi encimski kristali ali cross – linked enzyme crystals (CLEACs) in
- zamreženi encimski agregati ali cross – linked enzyme aggregates (CLEAs).

Priprava zamreženih encimskih kristalov se danes v biokatalizi raje opušča, ker je postopek drag in izredno dolgotrajen, navkljub visoki aktivnosti in stabilnosti encimskih kristalov v vlogi biokatalizatorjev. Strategija izdelave postopka priprave zamreženih encimskih kristalov ni nujno, da je primerna prav za vse vrste encimov, kar še dodatno omejuje njeno uporabnost.

Večja pozornost je zato usmerjena v pripravo visoko zamreženih encimskih agregatov, ki postaja vedno bolj popularna tehnika imobilizacije biokatalizatorja. Je enostavna in hitra metoda za sintezo visoko aktivnih encimskih skupkov, sestavljena iz treh glavnih stopenj:

- raztapljanje encima;
- obarjanje encimskih skupkov v organskih topilih ali z anorganskimi solmi;
- zamreženje z ustreznim reagentom (ang. cross – linker).[4]

Končni produkt so »clustri« ali skupki molekul encima, ki so mehansko stabilni in jih lahko neposredno uporabimo pri katalizi specifične reakcije. Zamreženi skupki, sestavljeni iz molekul čistega encima, so vsestranska in robustna oblika imobiliziranega encima, ki jih lahko uporabimo tako v vodnih kot nevodnih reakcijskih medijih. Priljubljenost opisane metode narašča predvsem zaradi dejstva, da se pri pripravi imobiliziranega encima uporabi samo encim, ki je lahko tudi polčist. Metoda samo po sebi omogoča tudi ko – imobilizacijo še dodatnega encima (combiCLEA) v kaskadnih reakcijah, v katerih sodelujeta dva ali več encimov hkrati.[11]

Zamreženje je zaključni proces pri pripravi končne oblike zamreženih encimskih skupkov ali CLEAs. Postopek je preprost, dodati je potrebno samo mrežni ali prečni povezovalac, to je lahko GA (homobifunkcionalna molekula, ki vsebuje dve prosti keto (-CO) skupini na obeh ekstremnih koncih molekule). Pri postopku zamreženja moramo biti pozorni na čas reakcije zamreženja in koncentracijo dodanega GA. V primeru previsoke koncentracije mrežnega povezovalca se pojavi postopna deaktivacija encima (GA je strupen). Obratno, če je koncentracija GA prenizka, je zamreženje nepopolno. Pomeni, da encim uhaja (ang. enzyme leakage) iz zamrežene strukture. Tako so sledovi encimske aktivnosti prisotni tudi v supernatantu in frakcijah po spiranju s puferno raztopino.[4]

2.5 Polarnost topil

Pri kovalentnih spojinah srečamo pojem polarne in nepolarne molekule. Pojem se nanaša na razporeditev naboja v molekuli, ki je posledica vrste in razporeditve atomov v molekuli.

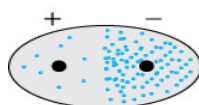
Nepolarne molekule so tiste molekule, kjer sta težišči pozitivnega in negativnega naboja na istem mestu oziroma sovpadata. To se zgodi v primeru, ko je molekula sestavljena iz istovrstnih atomov, pa tudi v primeru, ko je sestavljena iz različnih atomov, ki pa so v molekuli razporejeni tako (simetrično), da se težišči nabojev ujameta.[14]

Večina bioloških molekul, vključno z vodo in proteini, je električno polarnih. To pomeni, da imajo vsaj en dipolni moment. Permanentni dipol ali multipol je posledica različne elektronegativnosti atomov v molekuli in prisotnost nabitih skupin. Nastanek inducirane dipola pa omogočajo skupni delokalizirani elektronski oblaki, npr. v aromatskih in metilnih skupinah aminokislin. Elektrostatične interakcije dipolov opisujejo Van der Waalove sile, ki so treh tipov: permanentni dipol – permanentni dipol, permanentni dipol – inducirani dipol, inducirani dipol – inducirani dipol ali Londonove sile. Van der Waalove sile so pomembne predvsem pri hidrofobnih interakcijah proteinov, ki omogočajo vzpostavitev funkcionalne konformacije.

Polarne molekule so tiste molekule, kjer težišči pozitivnega in negativnega naboja nista na istem mestu, se ne ujemata, ampak sta odmaknjena na določeni razdalji r . Zato nastane dipol oziroma polarna molekula, kot je prikazano na sliki 2 – 7. To se zgodi v primeru, ko je molekula sestavljena iz raznovrstnih atomov, ki so v molekuli razporejeni tako (asimetrično), da se težišči nabojev ne ujameta. Lažje je polarizirati velike molekule z več

elektroni (polarizabilnost molekul). Težišče negativnega naboja (-) je premaknjeno k atomu, ki je bolj elektronegativen (bolj privlači elektrone), težišče pozitivnega naboja (+) pa je na sosednjem atomu, ki je manj elektronegativen.[15]

Pri sintezi zamreženih skupkov encima α – amilaze uporabljamo različna organska topila, v katerih se encim obori. Topila se v grobem lahko razdelijo na polarna in nepolarna topila. Največkrat uporabljeno merilo za obarjanje encima v določenih topilih je polarnost. Polarne ali ionske snovi se bodo načeloma raztopile samo v polarnih topilih.



Slika 2-7: Dipol.

V preglednici 2.2 so predstavljena vsa topila, ki smo jih pri našem delu uporabili glede na polarnost in topnost v vodi. Vsa topila pa lahko primerjamo z vrednostjo vode. Iz tabele lahko vidimo, so najbolj polarna naslednja topila: dimetil sulfoksid > dimetil formamid > acetonitril > etanol > aceton, metanol. Vsa ta topila so v vodi topna 100 %.[16]

Preglednica 2.2: Polarnost in topnost za posamezna topila.

Topila	Polarnost	Topnost v vodi [%]
voda	9	100
dimetil sulfoksid (DMSO)	7,2	100
dimetil formamid (DMF)	6,4	100
acetonitril	5,8	100
etanol	5,2	100
metanol	5,1	100
aceton	5,1	100
kloroform	4,1	0,815
tetrahidrofuran	4	100
2 – propanol	4	100
1 – propanol	4	100
<i>t</i> – butanol	4	0,43
dietileter	2,8	6,89

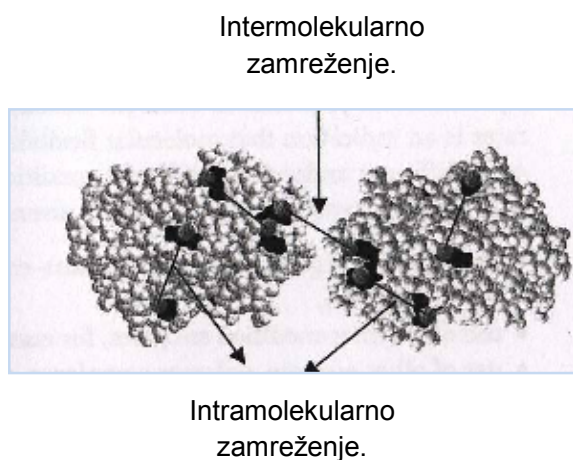
2.6 Mrežni povezovalac – glutaraldehid

Reagenti, ki se uporabljajo za zamreženje, v splošnem vsebujejo karboksilne, diazo, izocianatne, alkil jodidne, jodoacetamidne, aldehydne ali arilamino skupine. Primer zamrežitvenega agensa, ki vsebuje aldehydno skupino je GA. Zamrežitveni agens z arilamino skupino je *p* – nitro benzoilklorid.

V splošnem se zamrežitveni agensi razlikujejo po molški masi ali velikosti in funkcionalnosti. Polifunkcionalni polimeri z molško maso med 10 in 20 kDa so tudi učinkoviti pri zamreženju encima, saj vsebujejo številne aldehydne funkcionalne skupine, ki med zamreženjem reagirajo s funkcionalnimi skupinami na površini encima.[17]

Zamrežitveni agensi so številni, med vsemi je najbolj uporaben GA, ker je poceni in enostaven za uporabo ter lahko povzroči intermolekularno (možno pa je tudi intramolekularno) zamreženje z amino skupinami:[18]

- - . (2.1)



Slika 2-8: Zamreženje s prečnim povezovalcem - GA.[4]

GA (pentandial) je brezbarvna, viskozna tekočina z ostrim vonjem ($M = 100,12$ g/mol, $\rho = 1,06$ g/mL). Po izgledu je oljnata tekočina, ki je topna v vodi, benzenu in alkoholih.

Od vseh komercialno dostopnih zamrežitvenih reagentov ima GA nedvomno široko uporabo. Uporablja se za imobilizacijo proteinov, pri encimskih reakcijah, afinitetni kromatografiji, pri imunokemijskih raziskavah ter kot zamrežitveni reagent za biosenzorje.

Slabost delovanja GA je v tem, da zaradi visoke reaktivnosti in majhnosti lahko reagira z aktivnim mestom na encimu in povzroča njegovo deaktivacijo.

Poznamo dva osnovna mehanizma za izvajanje imobilizacije z GA:

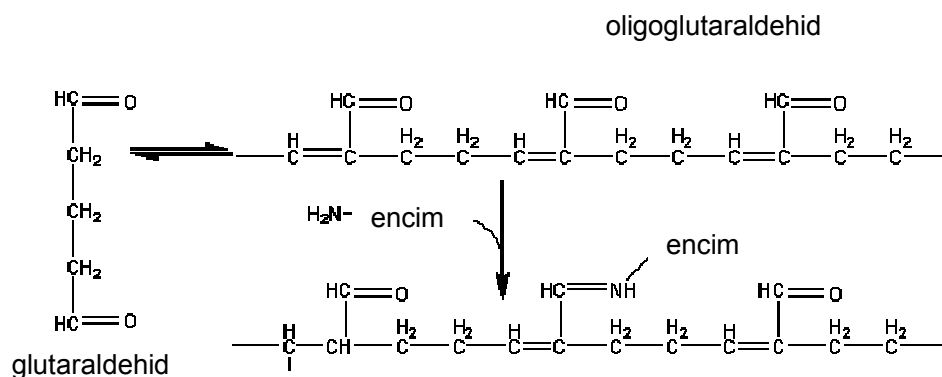
- aktivacijo encimskih nosilcev (poliakrilamid, pore stekla),
- zamreženje encima, pri čemer GA encimske molekule medsebojno povežejo, da nastane gel (membrane pri encimskih elektrodah, optični senzorji).

Uporaba GA je zelo razširjena pri encimski in celični imobilizaciji. GA se kot zamrežitveni reagent uporablja tudi v industrijskih procesih, in sicer pri imobilizaciji laktoze na ogljik z adsorpcijo ter pri imobilizaciji penicilin acilaze za proizvodnjo β – laktamskih antibiotikov. Z GA lahko reagirajo različni materiali, kot na primer najlon, pore stekla, želatina, albumin iz govejega seruma ter polimeri z amino skupino.

GA se lahko uporablja v imuno – kemiji:

- deluje kot imunogenik,
- absorbira zamrežitvena antitelesa (Ab) ali antigene (Ag) na trdno podporo in s tem poveča njihovo stabilnost,
- pritrdi celice,
- združuje antitelesa in antigene z encimom.[17]

GA je reagent, ki ga uporabljamo za hitro in zanesljivo imobilizacijo. Je poceni in enostaven za uporabo. Nahaja se v različnih oblikah, odvisno od pogojev raztopine. Reakcija je shematsko prikazana na sliki 2 – 9, ter ga pri kisljih ali nevtralnih raztopinah najdemo kot monomer kot prosto aldehidno obliko, hidrat ali hemiacetal. Pri višji koncentraciji pa polimerizira do oligomernega hemiacetala. Vse te oblike lahko reagirajo s proteini v različnih smereh in vodijo do imobilizacije. Pri bazičnih pogojih je izpostavljen aldolni kondenzaciji, ki tvori α, β – nenasičene aldehide. Ti produkti reagirajo s proteini in stabilizirajo Schiffovo bazo. Polimerni GA ima izboljšano zmožnost imobilizacije kot linearni ali ciklični.[6]



Zapletena uporaba GA ne sme biti zadržek za imobilizacijo proteinov. Dejstvo je, da vse kaže na sposobnost reagiranja in zamreženja proteinov. Lahko je uspešno sredstvo za imobilizacijo, če upoštevamo pogoje za skladiščenje in reakcijo.[17]

2.7 Škrob

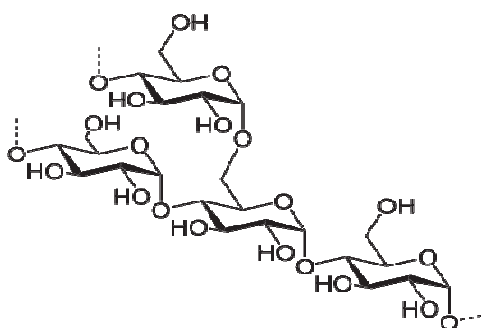
Škrob je glavni rezervoar energije višje razvitih rastlin in vir energije vseh živali in ljudi. Pridobivamo ga iz različnih rastlin in ga v velikih količinah uporabljamo v papirni, prehrabeni industriji, ter v industriji krmil in lepil. Najpomembnejši viri komercialnega škroba so koruza, krompir, tapioka in pšenica.[19]

Škrob lahko hidroliziramo v preproste ogljikove hidrate s kislinsko in encimsko hidrolizo, uporablja se celo kombinacija obeh reakcij. Škrob se hidrolizira do glukoze, maltoze in malto – oligo – saharidov z α – amilazo in ostalimi sorodnimi encimi. Najpomembnejši produkt, ki ga dobimo s hidrolizo škroba, je glukoza. Iz nje v procesu fermentacije dobimo etanol. V današnji družbi uporaba obnovljivih bioloških virov pridobiva vedno večji pomen, saj se zavedamo ekološke osveščenosti.[20]

2.7.1 Kemijska struktura škroba

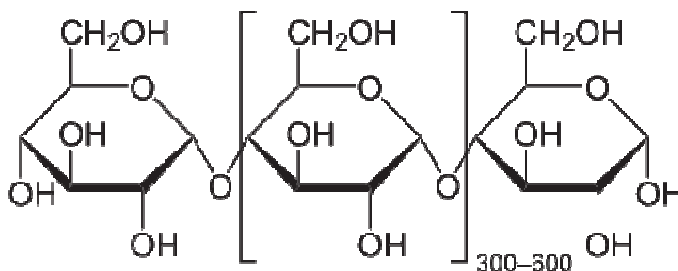
Škrob spada med ogljikove hidrate in je sestavljen iz glukočnih enot, ki so med seboj povezane z α - (1→4) in α - (1→6) vezmi. Dve glavni komponenti, ki tvorita popolno molekulo škroba, sta amiloza in amilopektin.

Amilopektin, ki ga prikazuje slika 2 – 10, je dolg heterogeno razvejan polisaharid, ki je sestavljen iz stotih kratkih α - (1→4) glikozidnih vezi, ki so povezane z α - (1→6) vezmi. Povprečna dolžina verige večine amilopektinov je 18 – 24 enot glukoze. Škrob je sestavljen iz 70 % amilopektina.



Slika 2-10: Kemijska struktura amilopektina.

Amiloza je definirana kot linearna molekula, sestavljena je iz šibko razvejane ali ne razvejane verige z molekulsko maso 105 – 106 Da. Njena kemijska struktura je razvidna iz slike 2 – 11. Normalno, kadar ni mutacije, škrob vsebuje 25 % amiloze in 75 % amilopektina.



Slika 2-11: Kemijska struktura amiloze.

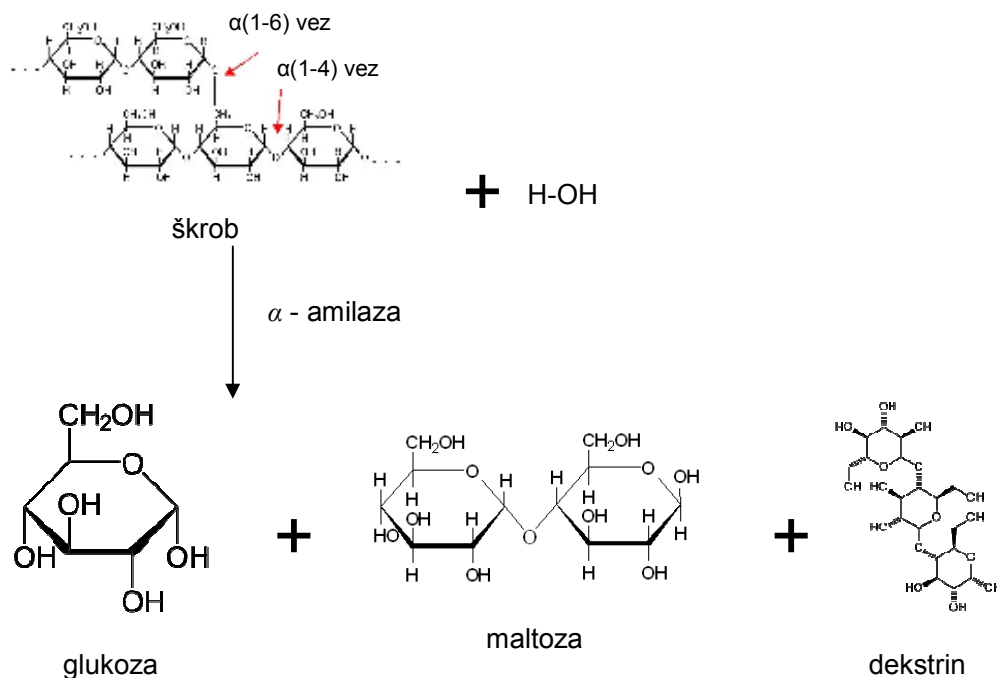
Za karakterizacijo škroba se uporablja kolorimetrična metoda, kjer pri dodatku joda nastane med amilozo in amilopektinom razlika v barvi. Kompleks škrob – jod se uporablja za kvantitativno določitev celotne vsebnosti škroba. Amiloza reagira z jodom in tvori moder spiralen kompleks z maksimalno absorbanco pri valovni dolžini med, $\lambda_{\max} = 620$ in 650 nm. Ta interakcija je za amilopektinske verige šibka, saj tvori vijoličen kompleks z maksimalno valovno dolžino pri približno, $\lambda_{\max} = 550$ nm.[20]

2.7.2 Hidroliza škroba

Škrob lahko hidroliziramo do preprostih ogljikovih hidratov (glukoza, maltoza in maltooligosaharidi) z α – amilazo in ostalimi sorodnimi encimi. Najpomembnejša produkta, ki ju dobimo pri hidrolizi škroba, predstavljata maltoza in glukoza.

Koncentracija škroba upada s časom, pri tem pa narašča koncentracija maltoze. Reakcija hidrolize je zelo hitra, v prvih dveh minutah se koncentracija škroba znatno zmanjša, skoraj ves škrob se hidrolizira. Nato se tvori maltodekstrin, ki ima absorbanco pri enaki valovni dolžini kot škrob ($\lambda = 550$ nm) in moti merjenje koncentracije škroba.

Pri reakciji na sliki 2 – 12 hidroliziramo glikozidno vez s porabo vode. Hidrolaze delujejo na nereducirne ali reducirne konce polimera (ekso) ali znotraj polimerne verige (endo).[20]

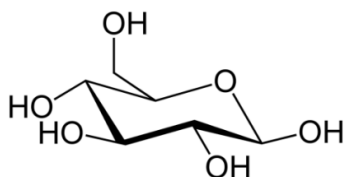


Slika 2-12: Mehanizem hidrolize škroba.

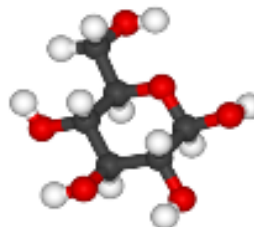
2.7.3 Glukoza

D – glukoza, (tudi grozdni sladkor, dekstroza) je enostavni sladkor (monosaharid) z molekulsko formulo $C_6H_{12}O_6$, ki vsebuje šest atomov ogljika, eden izmed njih je del aldehydne skupine in zato jo pripisujemo k aldoheksozam. Njena kemijska in prostorska struktura je razvidna iz slik 2 – 13 in 2 – 14. Molekula glukoze obstaja v odprti verigi (aciklična) in v obroču (ciklična). Ti dve obliki najdemo v ravnotežju, kar je rezultat kovalentnih vezi med aldehydnim C atomom in C – 5 hidroksilno skupino, ki tvorijo šest členski ciklični hemiacetal. V mislih imamo *D* – glukozo. Njen optični izomer *L* – glukoza se ne pojavlja v naravi.

Grozdni sladkor spada med enostavne sladkorje, torej med ogljikove hidrate. Je najpomembnejši vir energije za organizem. Žive celice glukozo uporabljajo kot vir energije ter kot posrednik metabolizma. Je topni kristal. Lahko jo najdemo v vodni raztopini. Glukoza je bila najprej sintetizirana iz klorofila rastlin, ki uporabljajo ogljikov dioksid iz zraka in sončno svetlobo kot vir energije.[21]



Slika 2-13: Kemijska struktura glukoze.



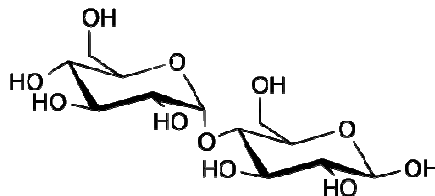
Slika 2-14: Prostorska struktura glukoze.

2.7.4 Maltoza

Maltoza ali slad (slika 2 – 15) je disaharid, ki je sestavljen iz dveh enot glukoze povezanih z α – (1→4) vezmi. Spada med člene pomembnih biokemijskih vrst glukočnih verig. Če jo dodamo k drugim glukočnim enotam, dobimo maltotriozo. Iz maltoze lahko dobimo tudi dekstrine (maltodekstrine) in škrob.

S hidrolizo lahko maltozo razčlenimo na dve molekuli glukoze. V živih organizmih lahko encimi maltaze to izvršijo zelo hitro. V laboratoriju pa segrevanje z močnimi kislinami v nekaj minutah da enake rezultate.

Proizvodnja disaharidov iz kaljenih žit, kot je na primer ječmen, je pomemben del procesov varjenja. Ko se ječmen spremeni v slad, dobimo pogoje, pri katerih je koncentracija maltoze, ki jo proizvaja amilaza, maksimalna. Pri procesu drozganja se amilaze preoblikujejo iz žitnega škroba v maltozo. Metabolizem maltoze pri kvasu med procesom fermentacije pa vodi v produkcijo etanola in ogljikovega dioksida.[22]



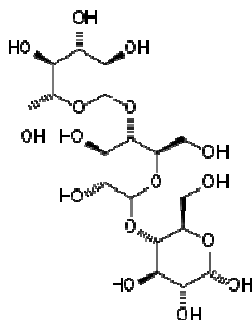
Slika 2-15: Kemijska struktura maltoze.

2.7.5 Dekstrini

Dekstrini so ogljikovi hidrati nizke molekulske mase, ki jih pridobivamo s hidrolizo škroba in njihovo strukturo kaže slika 2 – 16. Dekstrin je mešanica linearnih α – (1,4) vezi in α – (1,6) vezi polimerov *D* – glukoze. Zaradi razračenega amilopektina in glikogena vsebujejo α – (1,6) vezi, katere α – amilaza pri človeku ne more hidrolizirati. Imajo enako splošno formulo kot ogljikovi hidrati, toda krajše verige. Industrijska proizvodnja temelji na kislinski hidrolizi krompirjevega škroba. Dekstrini so v vodi topni. Je bela do svetlo rumena trdna snov, ki je optično aktivna. Dekstrini ob dodatku raztopine joda dajejo rdečo barvo.

Dekstrini so široko uporabni v industriji zaradi njihovega ne toksičnega delovanja in nizke cene. Uporabni so kot vodotopna lepila, kot sredstva za zgoščevanje v prehrabnih procesih in kot povezovalni reagent v farmacevtskih procesih. Uporabljajo se tudi kot pirotehnična sredstva.

Maltodekstrin ima lahko prijeten vonj ali pa ga sploh nima. Je polisaharid, ki se uporablja v prehrani kot aditiv. Proizvajamo ga iz škroba. Nahaja se v obliki kremasto belega higroskopskega prahu. Maltodekstrin je lahko prebavljiv in se hitro absorbira.[23]



Slika 2-16: Kemijska struktura dekstrina.

2.8 Encimska kataliza

Kemijski katalizatorji niso sposobni razločevati med posameznimi komponentami v vzorcu, medtem ko so procesi, ki temeljijo na encimski katalizi selektivni. Naslednja karakterizacija teh reakcij je, da potekajo pri milih pogojih, npr. blizu nevtralnega pH, pri sobni temperaturi. Encime uporabljamo tudi v diagnostiki, kot avto – analizatorje, pri imuno – analizah, kot biosenzorje in pri odvzemanju vzorcev.[20]

Encimi so proteini, ki delujejo kot biološki katalizatorji in povečujejo povprečno hitrost kemijske reakcije. Stabilizirajo prehodno stanje in zmanjšajo aktivacijsko energijo, in s tem povečajo hitrost reakcije. Kot katalizatorji encimi nimajo nobenega termodinamskega učinka na reakcijo. Glede na naravo kemijske reakcije, ki jo katalizirajo, ločimo šest glavnih skupin encimov. To so oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze in ligaze.[24]

Na encimsko katalizo vplivajo naslednji dejavniki: koncentracija encima, koncentracija substrata, pH, temperatura, ionska moč medija in prisotnost aktivatorjev ali inhibitorjev.

- *Vpliv koncentracije encima*

Na splošno je hitrost reakcije premo sorazmerna encimski koncentraciji. Odklon iz linearosti je možen zaradi naslednjih razlogov:

- a) prisotnost manjših količin visoko toksičnih nečistot v komponentah;
- b) prisotnost ločljivih aktivatorjev ali koencimov v encimskih preparatih;
- c) kadar ima encim precejšnjo afiniteto za drugo komponento v sistemu;

-
- d) kadar encimski preparat vsebuje reverzibilni inhibitor, ki se združi z encimom in daje neaktivni encim – inhibitor kompleks.

- *Vpliv koncentracije substrata*

Hitrost reakcije je sorazmerna s koncentracijo substrata (reakcija 1. reda) pri nizkih koncentracijah substrata. Hitrost reakcije ni odvisna od koncentracije substrata pri visokih koncentracijah substrata (reakcija 0. reda).

- *Vpliv pH*

Encimi so aktivni v omejenem območju pH in v nekaterih primerih samo pri določenih pH. Encim se lahko pri določenem pH denaturira. Zato je pH medija zelo pomemben parameter pri načrtovanju encimsko katalizirane reakcije.

Encimi so proteini, zgrajeni iz aminokislin, ki imajo bazične, nevtralne ali kislinske skupine. Iz tega sledi, da lahko imajo encimi pozitivno ali negativno nabite skupine pri vsakem pH. Ionizirajoče skupine so pogosto del aktivnega mesta in imajo določen naboj; tako je možna primerna kislinska ali bazična kataliza.

Katalitsko aktivni encim obstaja le v eni ionizacijski obliki in je lahko večji ali manjši del prisotnega encima, odvisno od pH. Spremembe v naboju s spremembo pH vplivajo na aktivnost, strukturno stabilnost in topnost encima.

Pri določeni vrednosti pH, karakteristični za vsak encim, je celotni naboj molekule enak nič. To je t.i. izoelektrična točka (IP), pri kateri ima encim minimalno topnost v vodnih raztopinah. Izoelektrična točka za α – amilazo je okrog 4,6.

Na pH vpliva tudi naboj encima, porazdelitev naboja substratov, produktov in koencimov.

- *Vpliv temperature*

Hitrost encimsko katalizirane reakcije narašča z dvigom temperature do dosega maksimuma. Tako se z nadaljnjim večanjem temperature, hitrost zmanjšuje.[20,24]

2.8.1 Mehanizem encimsko katalizirane reakcije

Mehanizem encimsko katalizirane reakcije temelji na predpostavkah, da encim [E] in substrat [S] tvorita kompleks [E – S], in pri tem se kompleks razkroji v encim [E] in produkt [P]. Naslednja enačba 2.2 predstavlja encimsko katalizirano reakcijo, kjer je hitrost reakcije konstantna:



Začetna hitrost reakcije, v_0 , je odvisna od koncentracije encima [E] in substrata [S] in je določena z Michaelis – Mentenovo enačbo 2.3:

$$v_0 = \frac{v_{\max} + c_S}{K_M + c_S}. \quad (2.3)$$

K_M je Michaelis – Mentenova konstanta, ki se izraža kot afiniteta med [E] in [S]. K_M (enačba 2.4) je odvisen od pH, temperature, imobilizacijskega procesa, aktivatorjev in inhibitorjev:

$$K_M = \frac{[E] \times [S]}{[E-S]} = \frac{k_{-1} \times k_2}{k_1}. \quad (2.4)$$

V stacionarnem stanju predpostavljamo, da se pri isti hitrosti tvori kompleks [E – S] in razkroj na [E + S] in [E + P].[25]

2.9 α – amilaza

α – amilaza je encim oziroma biokatalizator, prikazan na sliki 2 – 17, ki hidrolizira α – (1→4) glikozidne vezi v verigi s tremi ali več glukoznimi enotami. Vezi cepi na slučajnih endo koncih verige. Končni produkt linearne verige je samo glukoza in maltoza. Običajno uporabljamo termostabilno α – amilazo, ki jo proizvaja *Bacillus licheniformis*, in je komercialno dostopna pod imenom Termamyl. Njeno sistemsko ime je 1,4 – α – D – glukan glukanohidrolaza, EC 3.2.1.1.[7]

α – amilazo proizvajajo številne bakterije. Komercialna α – amilazo, ki se uporablja v prehrani, pa je izolirana iz različnih žit, in sicer ječmena, pšenice, riža, krompirja in koruze.[26]

Aktivnost encima α – amilaze ($IU/\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$): Ena katalitska enota encima je definirana kot količina encima, ki pri razgradnji škroba pri pH 6 in $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, sprosti $1\ \mu\text{mol}$ reducirnega sladkorja ali molekule maltoze v enoti časa (t/min).[5]



Slika 2-17: Encim α – amilaza.[26]

3 EKSPERIMENTALNI DEL

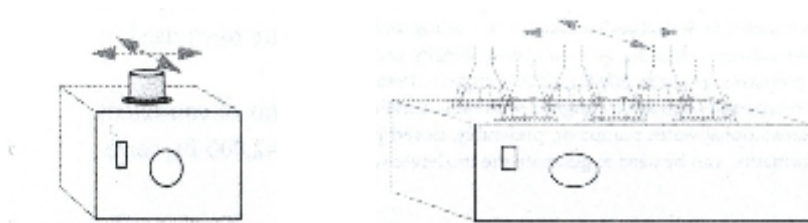
3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti

Vsi reagenti, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu so komercialno uporabni in imajo najvišjo stopnjo čistosti. Za encimsko katalizirano hidrolizo smo kot katalizator uporabili α – amilazo ter škrob, topen v vodi. Ta škrob proizvaja Riedel – De Haen ag Sielze - Hannover (Nemčija). Pri svojem eksperimentalnem delu smo uporabljali tudi maltozo proizvajalca Merck (Nemčija). Standardni protein BSA smo dobavili pri Sigma Aldrich (Nemčija) ter Bradfordov reagent za določanje proteinov (Roti – Quant) pri Carl Roth GmbH (Nemčija). Za pripravo reagentov smo potrebovali tudi kalijev jodid (Merck, Nemčija), jod (Kemika, Zagreb), natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (Merck, Nemčija), natrijev hidroksid (Scharlau Chemie) in natrijev klorid (Merck, Nemčija). Hidrolizo škroba smo izvajali s pomočjo encima Fungamyl T800 α – amilaza proizvajalca Novozymes, Nizozemska.

3.1.2 Laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali tehtnico (Kern 770 \pm 0,0001 natančnosti), grelec z magnetnim mešalom (Rotamix 560 MMH) ter namizni stresalnik (Vortex Assistant) (slika 3 – 1). Za merjenje absorbance ali optične gostote smo uporabili spektrofotometer Cary UV – VIS spektrofotometer 50 Probe.

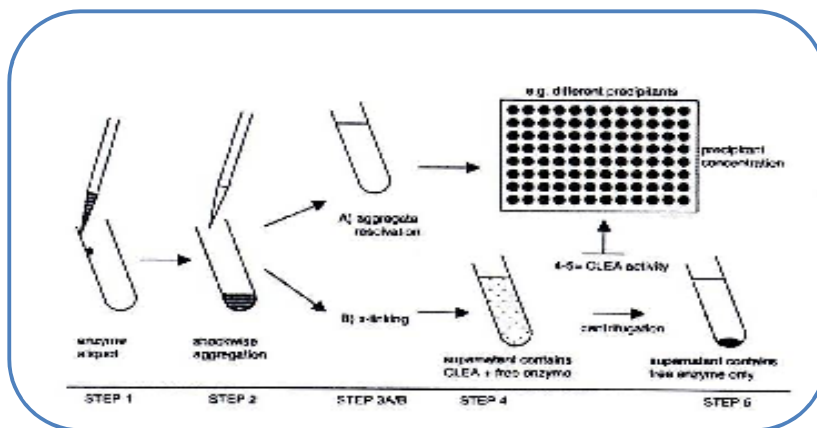


Slika 3-1: Vorteks in namizni stresalnik.

3.2 Opis priprave CLEAs

Priprava zamreženih encimskih agregatov je razdeljena na dva dela, kot je razvidno iz slike 3 – 2:

- izbiro obarjalnega agensa in
- optimizacijo koncentracije mrežnega povezovalca.



Slika 3-2: Celoten postopek priprave CLEAs.[4]

Začetno iskanje primerne obarjalnega agensa smo izvedli s $\varphi = 90\%$ (v/v) deležem obarjalnega agensa, saj je le – ta v literaturi naveden kot optimalen. Optimalni postopek obarjanja proteina (praktično prikazan tudi na sliki 3 – 3) je bil nato določen na podlagi testiranja naslednjih obarjalnih agensov: aceton, acetonitril, nasičena amonijeva sol ((NH₄)₂SO₄), etanol, dietileter, dimetil sulfoksid (DMSO), dimetil dioksan etanol (DME), dimetil formamid (DMF), kloroform, metanol, *t* – butilni alkohol, tetrahidrofuran, 1 – propanol, 2 – propanol, PEG različnih molskih mas. Aktivnost encima ($IU/\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$) in maso maltoze ($m/\mu\text{g}$) smo določevali z aktivnostnim testom za dani encim.

Pri obarjanju smo vedno uporabili $\varphi = 90\%$ (v/v) delež topila in $\varphi = 10\%$ (v/v) delež raztopljenega encima (korak 1 in 2 na sliki 3 – 2) – pri tem je bila začetna koncentracija encima α – amilaze, $\gamma = 8\text{ mg/mL}$. Celoten volumen reakcijske zmesi je bil 1 mL; 900 μL je pripadalo topilu in 100 μL encimu. V epruveto za centrifugiranje smo dodali magnetno mešalo in pustili $t = 40\text{ min}$ pri sobni temperaturi, da poteče proces precipitacije (agregacije) (korak 3A na sliki 3 – 2). Nato smo vsebino epruvete centrifugirali ($v = 3000\text{ rpm}$, $t = 10\text{ min}$). Frakcijo supernatanta smo oddekantirali ($V = 1\text{ mL}$), oborino encima pa ponovno

suspendirali v ustreznem pufri ($V = 1 \text{ mL}$), in to suspenzijo smo mešali še nadaljnjih $t = 10$ minut. V ločenih frakcijah smo določili aktivnost encima in supernatanta ter vsebnost proteina po Bradfordu. Pri določanju aktivnosti je bilo potrebno sproti preveriti še aktivnost prostega, topnega encima (korak 4 in 5 na sliki 3 – 2).

Obarjalni agens, ki je dal najvišjo aktivnost encima, je bil izbran za naslednji korak pri pripravi zamreženih encimskih agregatov, to je bila reakcija zamreženja.

Nadaljevali smo z reakcijo zamreženja, kjer smo kot zamrežitveni agens uporabili GA pri sobni temperaturi. Pri tem je bil čas reakcije konstanten, in sicer, $t = 3 \text{ h}$. Zasedovali smo aktivnost nastalih encimskih skupkov pri različnih deležih GA. Zamreženje smo izvedli z naslednjimi deleži GA: $w = 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4$. Reakcijo zamreženja smo izvedli vedno v prisotnosti encima BSA s koncentracijo, $\gamma = 8 \text{ mg/mL}$.

Sledeče delo opisuje poskus sinteze aktivnih encimskih agregatov iz encima α – amilaze, pridobljene iz škroba in postopek zamreženja le – teh z GA za pripravo končne oblike stabilnih zamreženih encimskih agregatov (CLEAs).[4]



Slika 3-3: Priprava za obarjanje.

3.3 Opis izvedbe hidrolize

Encimska hidroliza škroba, topnega v vodi, z α – amilazo (Fungamyl T800 proizvajalec Novozymes, Nizozemska) je bila izvedena pri pH 6,00 in v temperaturnem območju, $T = 25 - 35$ °C, ter pri rotacijski hitrosti med, $v = 400 - 800$ rpm.

Priprava škrobovice poteka tako, da $m = 0,125$ g škroba, topnega v vodi, raztopimo v $V = 12,5$ mL destilirane vode (1 % (w/v)) in raztopino segrevamo na vodni kopeli pri temperaturi, $T = 70$ °C. Nato raztopino škroba razredčimo z $V = 12,5$ mL vodne raztopine (fosfatni pufer, PBS, pH 6,00), tako da dobimo končno raztopino škroba 0,5 % (w/v). Pripravljeno raztopino škroba damo v šaržni mešalni reaktor in vključimo gretje, da dosežemo želeno obratovalno temperaturo, ki je v našem primeru $T = 29$ °C. Nato reakcijski zmesi dodamo še $V = 120$ μ L encima α – amilaze. Tako se prične encimska hidroliza škroba. V določenih časovnih intervalih ($t = 0, 2, 5, 10, 15$ min) iz reaktorja jemljemo vzorce in jih analiziramo po standardnih metodah. Koncentracijo škroba določujemo kolorimetrično z dodatkom jodovice, medtem ko koncentracijo maltoze kolorimetrično ob prisotnosti dinitrosalicilne kisline ali DNS.

3.4 Analizne metode

Pri presnovi reakcije hidrolize škroba smo določevali stranske produkte in reducirni sladkor (maltozo in ostanek škroba) v odvisnosti od časa. Te meritve smo izvajali po naslednjih principih.

3.4.1 Določevanje koncentracije škroba

Začetno in končno koncentracijo škroba določamo z jodometrično metodo, ki je splošno uporabna za določanje ostalih polisaharidov, kot je maltodekstrin (molska masa je manjša v primerjavi s kompleksno strukturo škroba). Kot substrat smo uporabili škrob, topen v vodi. Končna koncentracija maltodekstrinov, ki nastanejo pri hidrolizi škroba, se lahko določi po identični metodi, medtem ko koncentracije saharoze ne moremo določiti s to kolorimetrično metodo.

Koncentracijo škroba določimo po naslednjem postopku. $V = 100$ μ L odvzetega vzorca razredčimo z enako količino HCl (klorovodikova kislina), $c = 1$ mol/L, da prekinemo reakcijo hidrolize. Vzorcju dodamo še $V = 5$ mL jodovice. Ta reagent pokaže prisotnost škroba. Za poenostavitev merjenja absorbance vzorcem dodamo še $V = 9,9$ mL destilirane vode. Za merjenje absorbance škroba, pri valovni dolžini, $\lambda = 550$ nm, si moramo pripraviti tudi slepi

vzorec, s katerim kalibriramo sondo za merjenje absorbance. Ta vsebuje 5 mL jodovice in 10 mL destilirane vode. Vzorce smo jemali pri $t = 0, 2, 5, 10$ in 15 min.[27]

3.4.2 Določevanje koncentracije maltoze

Titracija z jodom je široko uporabna, predvsem zaradi njene enostavnosti in hitrosti. Jodometrična metoda je direktno uporabna za določanje dejanske koncentracije škroba in maltodekstrinov v vzorcu. Za določanje saharoze pa ni primerna nobena od znanih kolorimetričnih metod. Raztopina jodovice s škrobom daje zelo temno modro barvo, vendar kadar je prisoten maltodekstrin dobimo tipično temno rdečo barvo. Koncentraciji obeh substanc lahko izmerimo spektrofotometrično pri valovni dolžini, $\lambda = 550$ nm. Raztopina joda I_2/I^- – polijodidni ioni reagirajo s škrobom in se združijo v poli jodidne komplekse v strukturi škroba. Na splošno povedano zaradi dobre oksidativne lastnosti joda, sestave in stabilnost trijodidne raztopine naredi jodovico izvrsten indikator za določanje škroba. To uporabno tehniko določanja škroba z jodovico sta odkrila Colin in Claubury leta 1814.

Za karakterizacijo škroba s kolorimetrično metodo se uporablja metoda, ki temelji na razliki barve joda med amilozo in amilopektinom. Barva joda se lahko uporablja tudi za kvantitativno določanje celotne količine škroba. Amiloza v vodni raztopini tvori z jodom modro obarvan spiralni kompleks z maksimalno absorpcijo pri valovni dolžini med, $\lambda_{\max} = 620$ in 650 nm. Ta interakcija je za amilopektin šibka in vodi do škrlatno vijoličnega obarvanja kompleksa z $\lambda_{\max} = 550$ nm.

Priprava jodovice

Jodovico pripravimo z raztapljanjem $m = 0,15$ g I_2 in $m = 0,5$ g KI v 100 mL destilirane vode. Jod je zelo slabo topen v vodi zaradi svoje nepolarosti, zato v raztopino dodajamo kalijev jodid (KI). Nastaja KI_3 (kalijev trijodid), ki je dobro topen v vodi. Tako pripravljeno raztopino mešamo nekaj minut, nato pa skladiščimo v hladilniku. Svež reagent pripravimo vsak dan. Jodovica je rdeče – rjava raztopina. Reakcija: $I_2 + KI \rightarrow KI_3$. [20]

3.4.3 Določevanje reduciranih sladkorjev

Pri hidrolizi škroba se formira veliko produktov z različnimi molskimi masami. Po končani hidrolizi škroba analiziramo prisotnost maltoze v vzorcih. Pri hidrolizi maltodekstrinov in saharoze, lahko z DNS metodo določamo le glukozo.

Iz reaktorja v določenih časovnih intervalih vzamemo $V = 1$ mL vzorca. Nato dodamo $V = 1$ mL reagenta DNS, da prekinemo reakcijo hidrolize. Nadalje pa vzorce razredčimo z $V = 18$ mL destilirane vode. Tako dobimo končen volumen vzorca $V = 20$ mL. Vzorce nato damo v vodno kopel za $t = 10$ min. V primeru merjenja absorbance maltoze imamo valovno dolžino, $\lambda = 570$ nm, in v primeru merjenja absorbance glukoze valovno dolžino, $\lambda = 546$ nm.[27]

3.4.4 DNS metoda

Zreagirane sladkorje določamo s pomočjo DNS metode.

Priprava dinitrosalicilne kisline (DNS)

Reagent pripravimo tako, da raztopimo $m = 2,5$ g DNS v 5 mL destilirane vode. V ultrazvočni kopeli počasi dodajamo 50 mL NaOH (natrijev hidroksid), $c = 2$ mol/L. Nato dodamo še 125 mL destilirane vode ter mešamo na ultrazvočni kopeli, dokler se trden DNS popolnoma ne raztopi. Dodamo še $m = 75$ g natrijev – kalijev tartrat tetrahidrat. Končna DNS raztopina je oranžne barve.[27]

3.4.5 Določanje koncentracije proteinov v vzorcu z Bradfordovo metodo

Bradfordova metoda spada med splošne metode za kvantitativno določanje koncentracije encima v neznanem vzorcu. Temelji na spektrofotometričnem določanju proteinov. Pomeni, da je izmerjena absorbanca v vzorcu linearno sorazmerna s koncentracijo encima v danem vzorcu. Koncentracijo encima v neznanem vzorcu določimo s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo predhodno pripravimo (Priloga D). Protein BSA uporabimo kot standardni protein za pripravo umeritvene krivulje v koncentracijskem območju od 0 do 1 mg/mL. Iz umeritvene premice se določi naklon, katerega se nato uporabi pri izračunavanju neznane koncentracije encima v vzorcu. Pred pričetkom merjenja absorbance se v proteinski vzorec doda Bradfordov reagent (petkrat razredčen), hranjen v hladilniku. Reakcijsko zmes za spektrofotometrijo pripravimo v epruveti za centrifugiranje, in sestoji iz: $V = 1$ mL Bradfordovega reagenta in $V = 20$ μ L proteinskega vzorca (neznani vzorec ali BSA standard). Nato se reakcijsko zmes temeljito zmeša z vorteksom in pusti od 20 do 30 min pri rahlem stresanju na stresalniku ($T = 30$ °C), da se razvije značilna temno modra barva. Izmerimo absorbanco pri valovni dolžini, $\lambda = 595$ nm.

Bradfordov reagent pripravimo tako, da raztopimo $m = 100$ mg Coomassie Brilliant Blue v $V = 100$ mL 85 % fosforne kisline in $V = 50$ mL 95 % etanola ter razredčimo z destilirano vodo do oznake 1 L.

3.4.6 Aktivnostni test z encimom α – amilazo za razgradnjo škroba

Pripravimo si škrobovico, in sicer tako da raztopimo $m = 0,5$ g vodotopnega škroba in $m = 0,0175$ g NaCl v 50 mL pufru pH 6,00, ter raztopino segrejemo do $T = 100$ °C. Pripravimo si še reagent DNS (3,5 dinitrosalicilna kislina), tako da damo $m = 1$ g DNS v 20 mL NaOH ($c = 2$ mol/L), in 50 mL destilirane vode, hkrati raztopimo $m = 30$ g kalij – natrijevega tartrata in dopolnimo do $V = 100$ mL z destilirano vodo. Nato v epruveti za centrifugiranje pripravimo 0,05 mL škrobovice in 0,05 mL α – amilaze (pripravimo 10 – krat razredčen encim). Zmes inkubiramo 5 min pri sobni temperaturi ($T = 25$ °C). Potem dodamo 0,01 mL prej pripravljenega reagenta DNS. Raztopino mešamo $t = 10$ min pri temperaturi, $T = 100$ °C. Nato dodamo še 1 mL destilirane vode in izmerimo absorbanco pri valovni dolžini, $\lambda = 546$ nm. Pripravimo si tudi slepi vzorec, kjer dodamo vse reagente, le namesto encima dodamo pufer.[13]

Aktivnost α – amilaze smo določili po enačbi 3.1:

$$\text{Aktivnost } \left(IU / \frac{\mu\text{mol}}{(\text{mg}_{\text{encima}} \cdot \text{min})} \right) = \frac{\text{množina maltoze}}{\text{masa } \alpha\text{-amilaze} \times \text{čas}}, \quad (3.1)$$

pri čemer množino maltoze, ki nastane med reakcijo hidrolize škroba določimo iz umeritvene krivulje (priloga C). Masa α – amilaze je 40 μg , čas reakcije pa 5 min.

Presnovo reakcije pa izračunamo po enačbi 3.2:

$$\text{Presnova reakcije } (X/\%) = \frac{\text{masa maltoze (g)}}{\text{masa škroba (g)}} \times 100 \%. \quad (3.2)$$

Masa škroba je 0,05 g. Maso maltoze, ki nastane med reakcijo hidrolize škroba, določimo s pomočjo umeritvene krivulje za maltozo (priloga C). Enačbo premice izračunamo iz enačbe 3.3:

$$y = 0,0014 * x \rightarrow y = Abs \text{ in } x = c_{\text{maltoze}}. \quad (3.3)$$

4 REZULTATI

I. del - OBARJANJE

4.1 Kvalitativna ocena

V preglednici 4.1 so predstavljeni kvalitativni rezultati obarjanja encima α - amilaze, ki smo jih dobili tako, da smo 100 μ L začetne raztopine encima ($\gamma = 8$ mg/mL) oborili z $\varphi = 90$ % (v/v) obarjalnim agensom. Po centrifugiranju smo oborjeni encim ponovno raztopili v 1 mL vodne raztopine (PBS, 100 mM, pH 6,00). 50 μ L vzorca smo uporabili za aktivnostni test in enako smo naredili še s supernatantom. Na osnovi kvalitativne ocene smo določili, v katerem topilu se encim α – amilaza najbolje obori.

Primarno smo določili aktivnost oborjene α – amilaze, in s tem preverili ali je ta reakcija encim poškodovala ali deaktivirala, še pred začetkom reakcije zamreženja. V tej stopnji še ni vidnih skupkov oziroma agregatov, vendar v nekaterih primerih lahko zasledimo motnost reakcijske zmesi. Obarjanje smo ocenili na uspešno, delno uspešno ali neuspešno. Uspešno obarjanje pomeni, da smo dobili motno suspenzijo, kar smo zasledili pri metanolu, etanolu, nasičeni amonijevi soli, tetrahidrofuranu in PEG 20000. Delno uspešno obarjanje pomeni, da nastane dvo – fazni sistem, ki je sestavljen iz dveh tekočih faz; raztopljenega encima in topila. Takšen način obarjanja smo opazili pri 1 – propanolu in 2 – propanolu. Encim se ni izoboril pri acetonu, acetonitrilu, *t* – butanolu, DMSO, DMF, dietiletru, kloroformu, PEG 1500 in PEG 6000, kar smo ocenili kot neuspešno obarjanje. Za agregacijo encima je najbolj primerno polarno topilo, saj se polarne spojine topijo v polarnih topilih. Pri obarjanju je pomembno tudi dejstvo, da uporabljeni pogoji ne povzročijo ireverzibilne izgube encimske aktivnosti. Najboljši obarjalni agens oziroma precipitant ima najvišjo zmožnost vrnitve ali ohromitve aktivnosti encima.

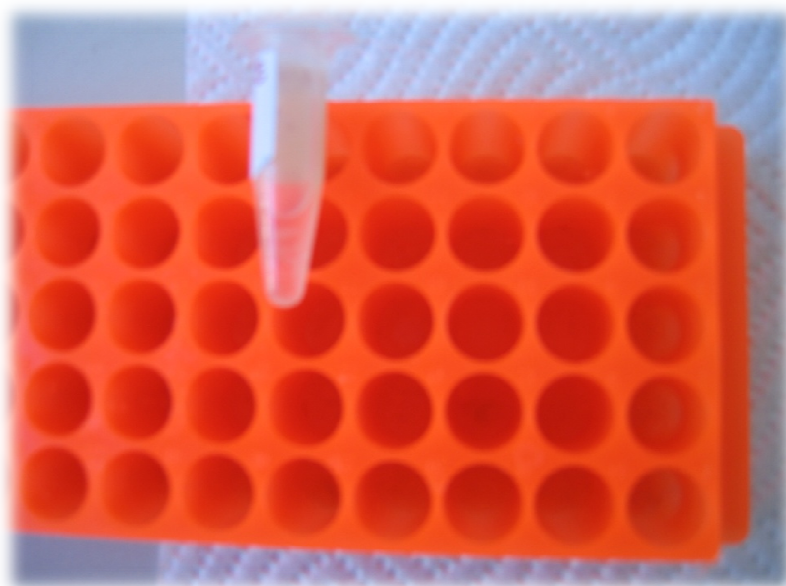
Preglednica 4.1: Kvalitativno preverjanje reakcije obarjanja.

Topilo	Opazanja
aceton	neuspešno
acetonitril	neuspešno
etanol	uspešno
metanol	uspešno
<i>t</i> – butanol	neuspešno
1 – propanol	delno uspešno
2 – propanol	delno uspešno
amonijeva sol	uspešno
DMSO	neuspešno
DMF	neuspešno
dietileter	neuspešno
kloroform	neuspešno
tetrahidrofuran	uspešno
PEG 1500	neuspešno
PEG 6000	neuspešno
PEG 20000	uspešno

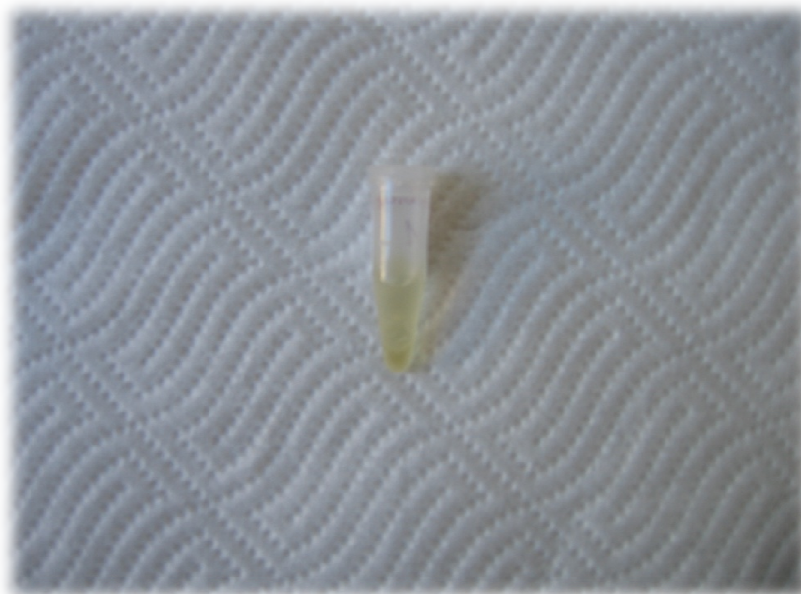
Legenda:

- uspešno = motna suspenzija
- neuspešno = encim se ne izobori
- delno uspešno = dvo – fazni sistem sestavljen iz dveh tekočih faz; raztopljenega encima in topila

Naslednje slike prikazujejo različne stopnje obarjanja ob dodatku različnih obarjalnih agensov. Iz njih je razvidna intenzivnost obarjanja proteinov ob dodatku različnih topil. Sliki 4 – 1 in 4 – 2 kažeta primer organskega topila, ki ne povzroča obarjanja encima. Nastane dvofazni sistem. To topilo je aceton, kjer po centrifugiranju ostane samo supernatant. Več fizikalnih in kemijskih parametrov povzroči spremembo v geometrijski in kemijski strukturi nativnih proteinov (polarnost, toksičnost itd.).

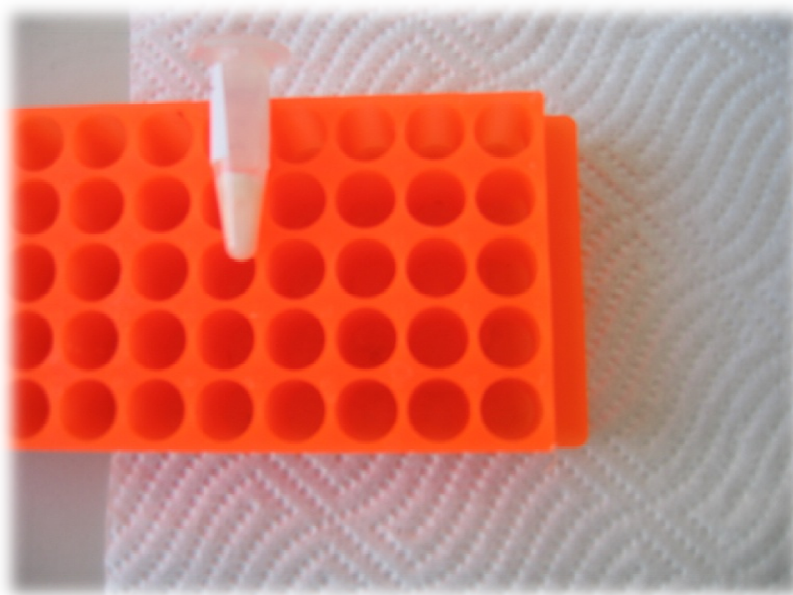


Slika 4-1: Obarjanje z acetonom. Pri reakciji obarjanja se encim ne izobori.



Slika 4-2: Obarjanje z acetonom. Po centrifugiranju ostane supernatant.

Na sliki 4 – 3 lahko vidimo primer obarjanja encima z metanolom. Pri tem nastane motna suspenzija. Po centrifugiranju nastane oborina (ang. pellet) agregiranega encima ter supernatant. Centrifugiranje vodi do povečane tvorbe oborine. Interakcija med delci je lahko reverzibilna (organska topila) ali ireverzibilna, kadar so aktivni zamreženi skupki encima α – amilaze na površini kovalentno vezani na individualne delce. Med obarjanjem topnost encima v mediju pada. Kadar je ta proces počasen, se lahko encim denaturira zaradi strukturnih sprememb. Povečanje hitrosti obarjanja pri encimih z nizko aktivnostjo, daje aktivnejše skupke. Sprememba proteinske strukture in funkcije ima mnoge pomembne praktične posledice, na primer izolacija encima s precipitacijo spremeni strukturo encima.



Slika 4-3: Obarjanje z metanolom. Nastanek oborine iz encima α – amilaze po centrifugiranju.

4.2 Obarjanje proteinov brez prisotnosti stabilizacijskega proteina albumina iz govejega seruma (BSA)

Intenzivnost obarjanja proteinov brez prisotnosti stabilizacijskega proteina BSA je kvantitativno prikazana v preglednici 4.2. Do rezultatov smo prišli tako, da smo v 900 μL topila oborili 100 μL začetne suspenzije encima ($\gamma = 8 \text{ mg/mL}$). Po centrifugiranju smo oborjeni encim ponovno raztopili v $V = 1 \text{ ml}$ vodne raztopine (PBS, 100 mM, pH = 6,00). 50 μL vzorca smo uporabili za aktivnostni test. Isto smo naredili še s supernatantom. Raztopine PEG – a so bile $w = 40 \%$. Masa encimskega preparata je bila pri našem delu konstantna, in je znašala, $m_{\alpha\text{-amilaze}} = 40 \mu\text{g}$.

Iz preglednice 4.2 je tudi razvidno, da smo največjo relativno aktivnost resuspendiranih skupkov dobili pri metanolu, etanolu, tetrahidrofuranu in PEG 20000.

Preglednica 4.2: Reakcija obarjanja z izbranimi topili brez ogrodnega proteina (BSA – albumin iz govejega seruma).

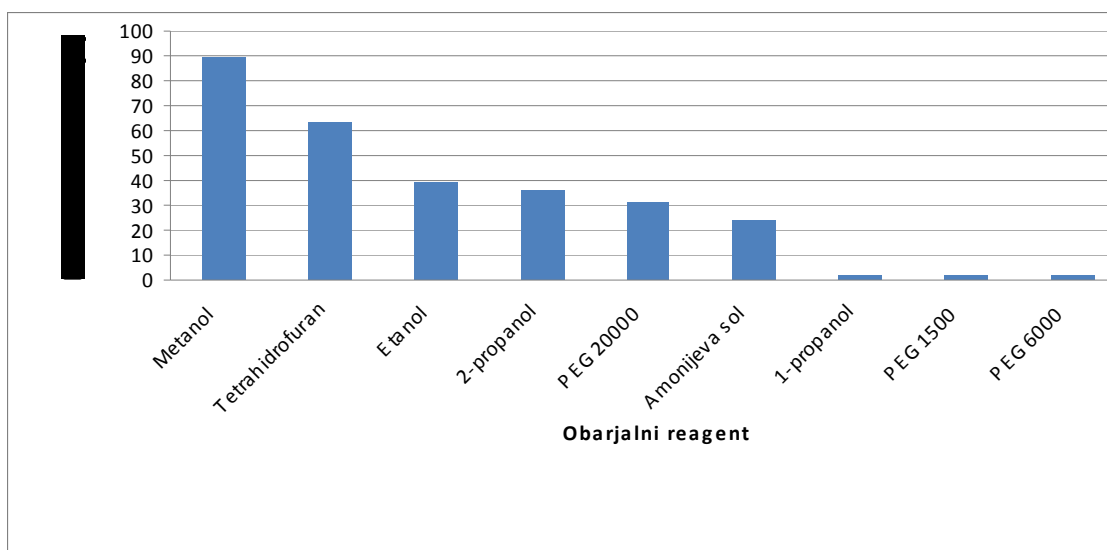
Obarjalni reagent	Relativna aktivnost resuspendiranih skupkov [IU/mg _{encim} , %]	Relativna aktivnost supernatanta [IU/mg _{encim} , %]	γ_{protein} po resuspenziji [mg/mL]	γ_{protein} supernatant [mg/mL]
aceton	0	75,4	0	6,84
metanol	89,6	10,1	6,01	1,42
etanol	39,3	5,7	5,39	2,49
1-propanol	0	89	0	5,085
2-propanol	36,1	3,7	4,87	0,644
tetrahidrofurn	63,1	12,7	5,59	0,2716
amonijeva sol	24,12	0	6,4	0
PEG 1500	0	11,30	0	4,03
PEG 6000	0	68,20	0	4,45
PEG 20000	31,3	21,3	4,6	3,92

Opomba: a) $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$; b) IU/mg_{encim} – specifična aktivnost encima α – amilaze, izražena v enotah $\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$

Aktivnost v supernatantu preverjamo zato, da vidimo ali se je encim sprostil v supernatant. Ta vsebuje le prosti encim. Iz preglednice 4.2 je razvidno, da smo zaznali visoko relativno aktivnost tudi v nekaterih supernatantih, predvsem pri topilu aceton, 1 – propanol in PEG 6000. V našem primeru je bilo pomembno ugotoviti, če je encim po obarjanju še aktiven. Pri nasičeni amonijevi soli nismo zasledili aktivnosti ter koncentracije proteina v supernatantu. Encim ni prehajal v supernatant.

V preglednici 4.2 je prikazana tudi aktivnost resuspendiranih skupkov pri uporabi $\varphi = 90\%$ (v/v) obarjalnega agensa. Največjo aktivnost α – amilaze smo zasledili pri naslednjih topilih: metanol, tetrahidrofur, etanol in 2 – propanol. Znano je, da zamreženi skupki encima amilaze brez BSA obdržijo približno 0,4 % aktivnosti. Resuspendirane skupke smo izpirali z vodno raztopino (PBS, 100 mM, pH = 6,00) in s tem ločili topne delce od netopnih, kar povzroča nižjo koncentracijo encima. Na aktivnost resuspendiranih skupkov pa vpliva tudi število encimskih molekul v skupkih.

Naslednji graf (slika 4 – 4) prikazuje rezultate aktivnosti resuspendiranega encima brez dodatka BSA. Vidimo lahko, da imajo v metanolu resuspendirani skupki α – amilaze najvišjo relativno aktivnost.



Slika 4-4: Relativna aktivnost resuspendiranega encima α – amilaze po obarjanju z različnimi obarjalnimi reagenti.

4.3 Obarjanje proteinov ob prisotnosti stabilizacijskega proteina albumina iz govejega seruma (BSA)

Proučevali smo vpliv različnih topil na intenzivnost obarjanja proteinov v prisotnosti BSA. Le – ta ima funkcijo stabilizacije encimov v reakcijski zmesi ter preprečuje povezavo encimov z ostalimi molekulami. Pri tej raziskavi je metoda dela popolnoma identična prejšnji, le da smo v reakcijsko zmes dodali še ogrodni protein BSA, enake koncentracije kot encim ($\gamma = 8$ mg/mL). Iz rezultatov (preglednica 4.3) lahko vidimo, da je relativna aktivnost pri vseh topilih zelo velika, največja pa pri metanolu in etanolu. Preučevali smo vpliv topil glede na obarjanje resuspendiranega encima.

BSA je ogrodni protein, ki pospeši tvorbo CLEA. Uporablja se, kadar je koncentracija proteina v encimskem pripravku nizka in stabilizira encim. CLEA z BSA ohranja 100 % aktivnost, saj je takšna oblika manj amorfná.[29]

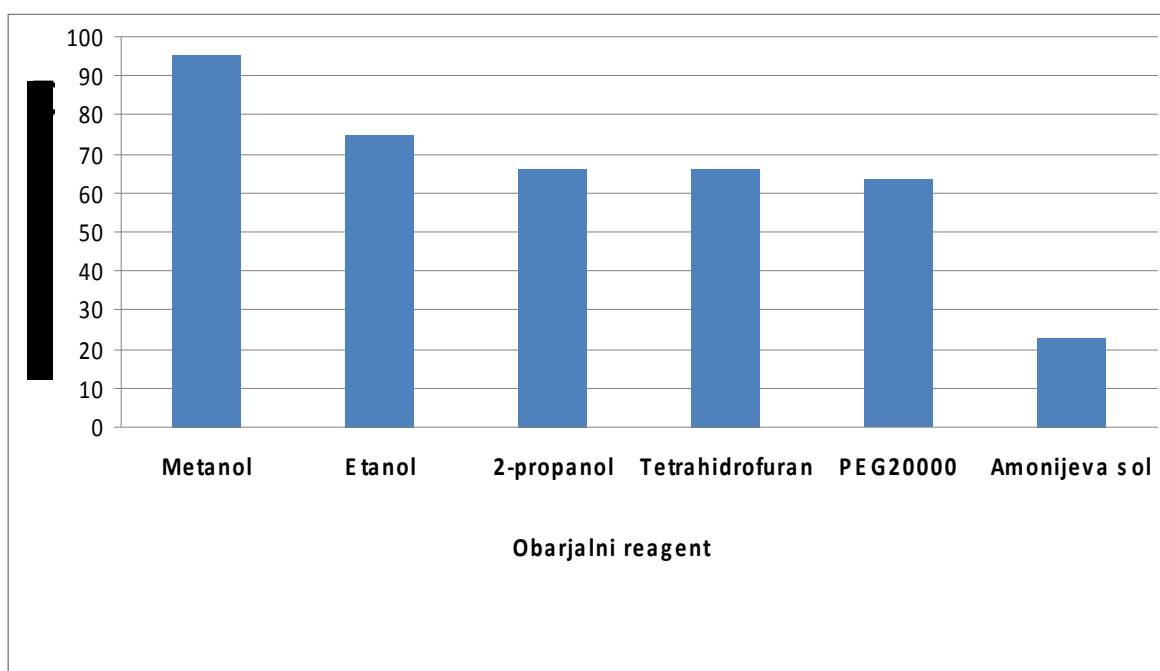
Preglednica 4.3: Reakcija obarjanja z izbranimi topili v prisotnosti ogrodnega proteina (BSA – albumin iz govejega seruma).

Obarjalni reagent	Relativna aktivnost resuspendiranih skupkov [IU/mg _{encim} , %]	Relativna aktivnost supernatanta [IU/mg _{encim} , %]	γ _{proteinov} po resuspenziji [mg/mL]	γ _{proteinov} supernatant [mg/mL]
metanol	95,1	1,4	9,10	2,9
etanol	75,03	32,9	8,7	3,0
2-propanol	66,4	30,3	8,7	3,7
tetrahidrofuran	65,9	11,7	8,6	1,9
amonijeva sol	28,9	0	7,5	0,035
PEG 20000	69,7	28,4	7,6	0,29

Opomba: a) $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8$ mg/mL, $\gamma_{\text{BSA}} = 8$ mg/mL; b) IU/mg_{encim} – specifična aktivnost encima α – amilaze, izražena v enotah $\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$

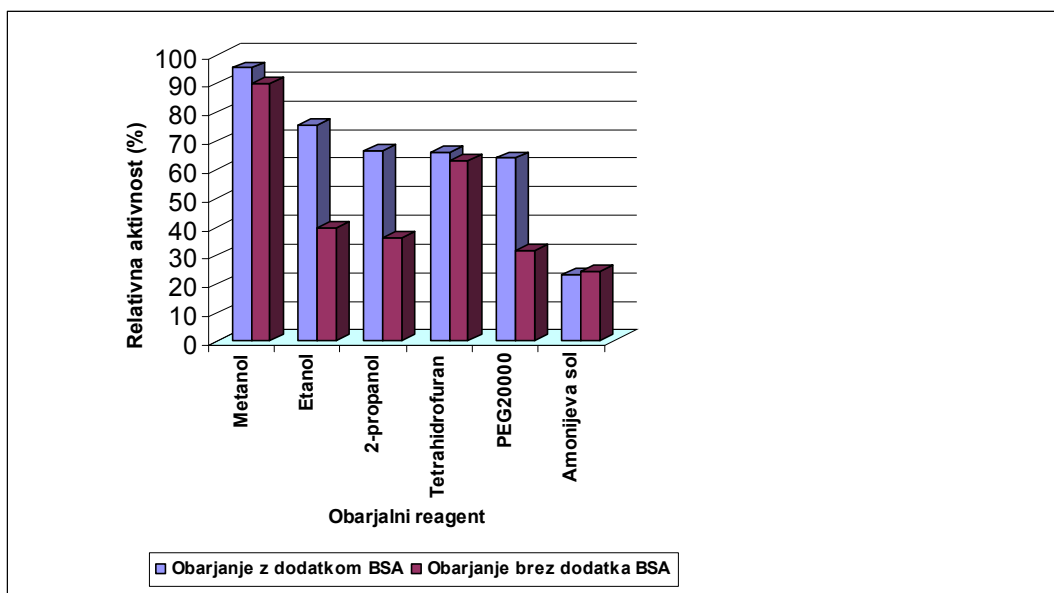
V preglednici 4.3 je prikazana tudi aktivnost resuspendiranih skupkov pri uporabi $\varphi = 90\%$ (v/v) obarjalnega agensa z dodatkom BSA. Največjo aktivnost α – amilaze smo zasledili pri naslednjih topilih: metanolu in etanolu. To dejstvo lahko obrazložimo s tem, da etanol in metanol sodita med polarna topila s pripadajočima indeksoma polarnosti 5,2 za etanol ter 5,1 za metanol (preglednica 2.2).

Slika 4 – 5 prikazuje rezultate aktivnosti resuspendiranega encima po obarjanju in dodatku BSA. Iz grafa je razvidno, da smo najvišjo relativno aktivnost α – amilaze dosegli v metanolu.



Slika 4-5: Relativna aktivnost resuspendiranega encima α – amilaze po obarjanju z različnimi obarjalnimi reagenti in dodatku ogrodnega proteina BSA.

Slika 4 – 6 prikazuje primerjavo relativne aktivnosti pri reakciji obarjanja z dodatkom BSA in brez BSA. Dodatek ogrodnega proteina BSA povzroči višje relativne aktivnosti resuspendiranega encima α – amilaze. Albumin namreč stabilizira strukturo encima.



Slika 4-6: Relativna aktivnost resuspendiranega encima α – amilaze z in brez dodatka ogrodnega proteina BSA.

II. del - ZAMREŽENJE

4.4 Vpliv koncentracije glutaraldehida na aktivnost zamreženih skupkov encima α - amilaze

Reakcija zamreženja je potekala $t = 3$ h pri sobni temperaturi. GA je univerzalni bifunkcionalni mrežni povezovalac, vendar lahko povzroča deaktivacijo encima. Zato je optimizacija GA nujno potrebna, z namenom, da se uporabi minimalna količina mrežnega povezovalca. Obratno, če je koncentracija GA prenizka, je zamreženje nepopolno. Pomeni,

da encim uhaja iz zamrežene strukture. Zato je nujno preverjanje aktivnosti tudi v supernatantu.[4]

Preglednica 4.4 in 4.5 prikazujeta zamreženje skupkov iz α – amilaze pri stalni koncentraciji GA (1 % (v/v)) in različnih obarjalnih reagentih. Preglednica 4.4 prikazuje relativne aktivnosti CLEA in supernatanta, ter frakcije po spiranju s puferno raztopino. Reakcijo zamreženja smo vedno naredili tudi v prisotnosti BSA. Relativno aktivnost smo določili z aktivnostnim testom, koncentracijo proteinov pa z Bradfordovo metodo.

GA spreminja določene esencialne amino skupine, ki povzročajo pri CLEA značilno izgubljanje biološke aktivnosti. Zato uporabljamo ogrodne proteine. Prisotnost BSA vodi do širokega zamreženja z visoko aktivnostjo ter stabilnostjo. Določiti smo morali optimalno koncentracijo BSA ($\gamma_{BSA} = 8 \text{ mg/mL}$), saj kadar ta nima dovolj prostih amino skupin, prepreči zadostno zamreženje. Lahko pa tudi proste amino skupine na albuminu konkurirajo s prostimi amino skupinami na encimu.[29]

Najvišjo relativno aktivnost CLEA smo dobili pri metanolu in etanolu. Reakcijo smo izvedli pri naslednjih pogojih: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{BSA} = 8 \text{ mg/mL}$. Pri dodatku GA smo v reakcijski zmesi opazili spremembo barve.

Preglednica 4.4: Zamreženje skupkov iz α – amilaze pri stalni koncentraciji GA (1 % (v/v)) in različnih obarjalnih reagentih.

Obarjalni reagent	Relativna aktivnost CLEA [IU/mg _{encim}]	Relativna aktivnost Supernatant [IU/mg _{encim}]	Relativna aktivnost Spiranje I [IU/mg _{encim}]	Relativna aktivnost Spiranje II [IU/mg _{encim}]	Relativna aktivnost Spiranje III [IU/mg _{encim}]
metanol	46	23	3,8	3,8	3,8
etanol	40,9	16,4	6,9	6,9	6,3
2-propanol	0	60	4	3,9	3,1
tetrahidrofuran	11,11	85	10,7	5,6	2,3

Opomba: a) reakcijski pogoji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$; $\gamma_{BSA} = 8 \text{ mg/mL}$; $c_{GA} = 487 \text{ } \mu\text{mol/L}$ b) IU/mg_{encim} – specifična aktivnost encima α – amilaze, izražena v enotah $\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$

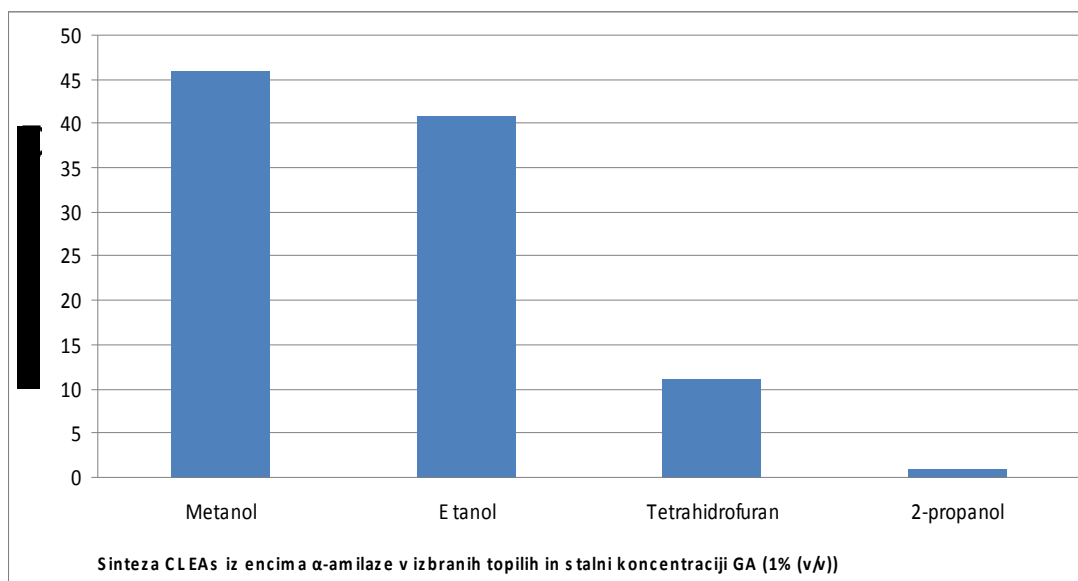
Preglednica 4.5 prikazuje koncentracije proteinov v supernatantu ter koncentracije proteinov pri frakcijah spiranja s puferno raztopino. Te vrednosti smo dobili pri zamreženju skupkov iz α – amilaze pri stalni koncentraciji GA (1 % (v/v)) in različnih obarjalnih reagentih. Kadar smo uporabili metanol kot obarjalni reagent, encim ni uhajal v supernatant, saj je koncentracija proteinov, $\gamma_{\text{proteinov}} = 0 \text{ mg/mL}$.

Preglednica 4.5: Zamreženje skupkov iz α – amilaze pri stalni koncentraciji GA (1 % (v/v)) in različnih obarjalnih reagentih.

Obarjalni reagent	γ_{protein} Supernatant [mg/mL]	γ_{protein} Spiranje I [mg/mL]	γ_{protein} Spiranje II [mg/mL]	γ_{protein} Spiranje III [mg/mL]
metanol	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
etanol	0,0065	0,0062	0,0025	0,0013
2-propanol	0,01719	0,0643	0,0461	0,0348
tetrahidrofur	0,0244	0,0159	0,0138	0,0000

Opomba: a) reakcijski pogoji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$; $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$; $c_{\text{GA}} = 487 \text{ } \mu\text{mol/L}$ b) $IU/\text{mg}_{\text{encim}}$ – specifična aktivnost encima α – amilaze, izražena v enotah $\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$

Na sliki 4 – 7 je prikazana relativna aktivnost zamreženih encimskih skupkov iz encima α – amilaze pri topilih – metanolu, etanolu, tetrahidrofuranu in 2 – propanolu. Reakcijo zamreženja smo izvedli pri naslednjih pogojih: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\varphi_{\text{glutaraldehid}} = 1 \text{ \% (v/v)}$. Najvišje aktivnosti zamreženih skupkov smo dobili pri metanolu in etanolu, ki smo ju izbrali za nadaljnjo optimizacijo koncentracije GA.



Slika 4-7: Relativna aktivnost zamreženih encimskih skupkov iz encima α – amilaze pri uporabi različnih obarjalnih agensov.

Obarjalna agensa, metanol in etanol, v katerih je encim obdržal najvišjo aktivnost, sta bila izbrana za naslednji korak – optimizacijo koncentracije GA.

Preglednici 4.6 in 4.7 prikazujeta vpliv koncentracije GA na aktivnost CLEAs. Kot obarjalni reagent smo uporabili metanol. CLEAs ima najvišjo relativno aktivnost pri koncentraciji GA 1 % (v/v).

Preglednica 4.6: Vpliv koncentracije GA na aktivnost CLEAs pri uporabi metanola kot obarjalnega reagenta.

GA [%,(v/v)]	c_{GA} / $\mu\text{mol/L}$	Relativna aktivnost CLEA [IU/mg _{encim}]	Relativna aktivnost Supernatant [IU/mg _{encim}]	Relativna aktivnost Spiranje I [IU/mg _{encim}]	Relativna aktivnost Spiranje II [IU/mg _{encim}]	Relativna aktivnost Spiranje III [IU/mg _{encim}]
0,2	85	34	24	12	4	0
0,4	190	35	43	1,9	0	0
0,6	286	37	25	16	8	6
0,8	381	38	35	6	0	0
1,0	487	46	23	3,8	3,8	3,8
1,2	582	44	20	16	4	0
1,4	688	38	12	3,8	3,8	3,8

Opomba: a) reakcijski pogoji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$; $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$; obarjalni reagent: metanol; b) IU/mg_{encim} – specifična aktivnost encima α – amilaze, izražena v enotah $\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$

Iz preglednice 4.7 je razvidno, da pri koncentraciji GA 1 % (v/v) nismo zasledili proteinov ($\gamma_{\text{proteinov}} = 0 \text{ mg/mL}$) v supernatantu in v frakcijah spiranja s puferno raztopino.

Preglednica 4.7: Vpliv koncentracije GA na koncentracijo proteina pri uporabi metanola kot obarjalnega reagenta.

GA [% (v/v)]	c_{GA} $\mu\text{mol/L}$	γ_{protein} mg/mL Supernatant	γ_{protein} mg/mL Spiranje I	γ_{protein} mg/mL Spiranje II	γ_{protein} mg/mL Spiranje III
0,2	85	0,08494	0,0536	0,0562	0,0148
0,4	190	0,0574	0,0353	0,0284	0,0238
0,6	286	0,0206	0,0138	0,0020	0,0016
0,8	381	0,0025	0,0022	0,0008	0,0005
1,0	487	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1,2	582	0,0247	0,0180	0,0147	0,0132
1,4	688	0,0183	0,0026	0,0021	0,0015

Opomba: a) reakcijski pogoji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$; $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$; obarjalni reagent: metanol; b) IUI mg_{encim} – specifična aktivnost encima α – amilaze, izražena v enotah $\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$

Vpliv koncentracije GA na relativno aktivnost CLEAs je prikazan tudi v preglednici 4.8 in 4.9, le da smo tokrat kot obarjalni reagent uporabili etanol. Reakcijski pogoji so bili naslednji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$. Relativna aktivnost CLEA narašča do 1 % (v/v) koncentracije GA, kjer smo dobili najvišjo aktivnost CLEAs, in sicer $IU = 40,9 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$.

Preglednica 4.8: Vpliv koncentracije GA na relativno aktivnost CLEAs pri uporabi etanola kot obarjalnega reagenta.

GA [%,(v/v)]	$c_{\text{GA}}/$ $\mu\text{mol/L}$	Relativna aktivnost CLEA [$IU/\text{mg}_{\text{encim}}$]	Relativna aktivnost Supernatant [$IU/\text{mg}_{\text{encim}}$]	Relativna aktivnost Spiranje I [$IU/\text{mg}_{\text{encim}}$]	Relativna aktivnost Spiranje II [$IU/\text{mg}_{\text{encim}}$]	Relativna aktivnost Spiranje III [$IU/\text{mg}_{\text{encim}}$]
0,2	85	30,8	24,8	9,5	9,1	8,8
0,4	190	31,2	21,9	9,9	8,8	3,4
0,6	286	36,2	21,9	9,9	8,9	6,7
0,8	381	39,6	16,5	10,1	8,1	7,4
1,0	487	40,9	16,4	6,9	6,9	6,3
1,2	582	40,4	16,7	6,4	4,4	2,5
1,4	688	28,7	15,6	13,7	13,7	2,4

Opomba: a) reakcijski pogoji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$; $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$; obarjalni reagent: etanol; b) $IU/\text{mg}_{\text{encim}}$ – specifična aktivnost encima α – amilaze, izražena v enotah $\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$

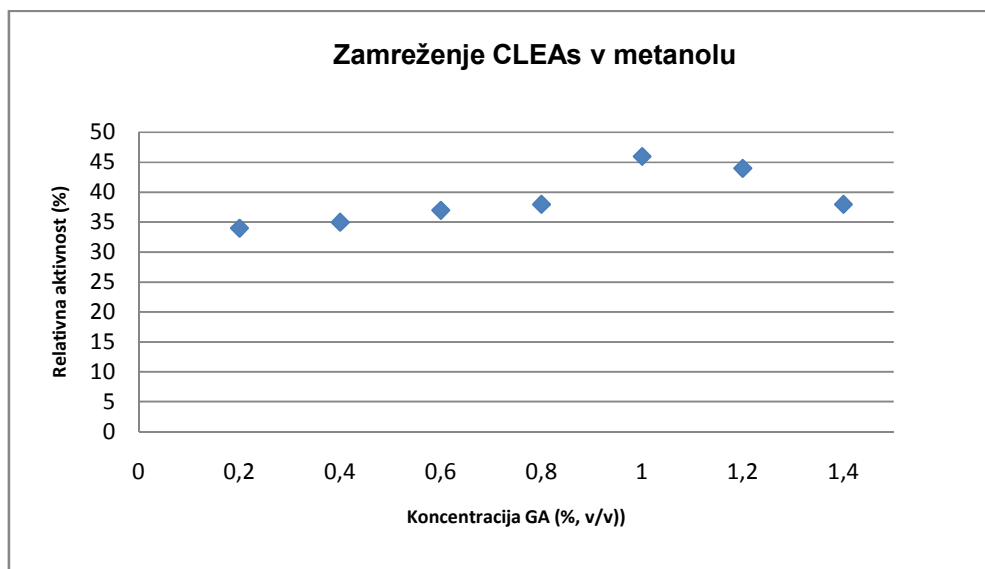
V preglednici 4.9 so prikazane koncentracije proteinov v supernatantu in v frakcijah spiranja glede na koncentracije GA. Najnižje vrednosti koncentracije proteinov v supernatantu dobimo pri 0,2 in 1,0 % (v/v) koncentraciji GA.

Preglednica 4.9: Vpliv koncentracije GA na koncentracijo proteina pri uporabi etanola kot obarjalnega reagenta.

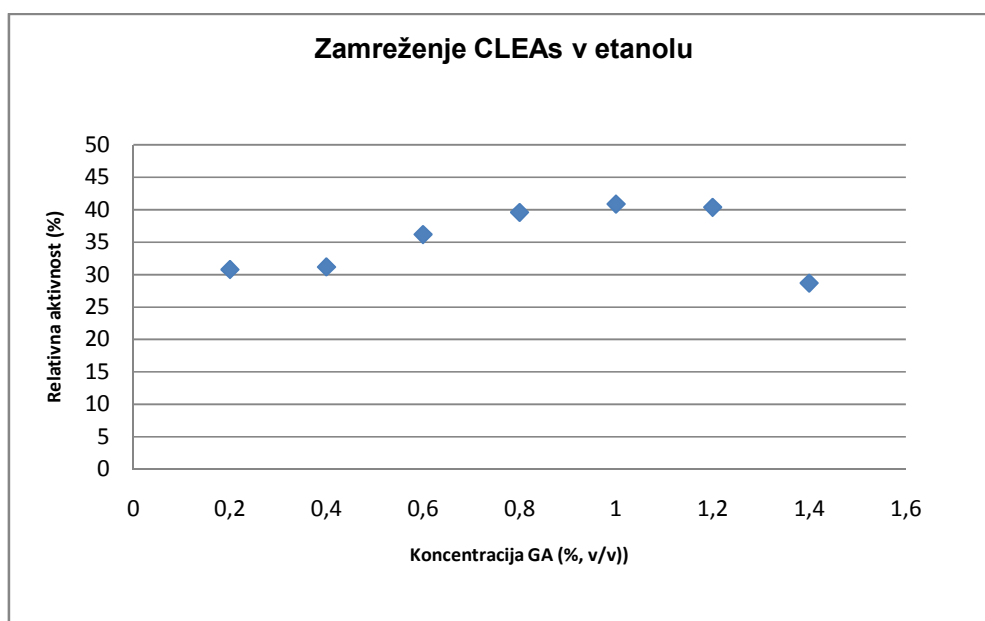
GA [% (v/v)]	c_{GA} / $\mu\text{mol/L}$	$\gamma_{\text{protein}}/$ mg/mL Supernatant	$\gamma_{\text{protein}}/$ mg/mL Spiranje I	$\gamma_{\text{protein}}/$ g/mL Spiranje II	$\gamma_{\text{protein}}/$ mg/mL Spiranje III
0,2	85	0,0065	0,0025	0,0024	0,0023
0,4	190	0,0435	0,0358	0,0349	0,0340
0,6	286	0,0436	0,0358	0,0349	0,0340
0,8	381	0,0249	0,0192	0,0144	0,0095
1,0	487	0,0065	0,0062	0,0025	0,0013
1,2	582	0,0241	0,0145	0,0118	0,0054
1,4	688	0,0465	0,0468	0,0446	0,0401

Opomba: a) reakcijski pogoji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$; $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$; obarjalni reagent: etanol; b) $IU/ \text{mg}_{\text{encim}}$ – specifična aktivnost encima α – amilaze, izražena v enotah $\mu\text{mol}/(\text{min mg}_{\text{encim}})$

Na slikah 4 – 8 in 4 – 9 je prikazana aktivnost CLEAs v metanolu (slika 4 – 8) oziroma etanolu (4 – 9) kot obarjalnemu agensu v odvisnosti od različnih koncentracij GA. Reakcijski pogoji so bili naslednji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$. Pri obarjalnem reagentu metanolu, lahko iz slike 4 – 8 vidimo, da je aktivnost α – amilaze največja pri koncentraciji, $\varphi = 1,0 \%$ (v/v) GA kot mrežnega povezovalca. Rezultate za obarjalni reagent etanol kaže slika 4 – 9, kjer je razvidno, da največjo aktivnost dosežemo pri $\varphi = 1,0$ (v/v) koncentraciji GA.

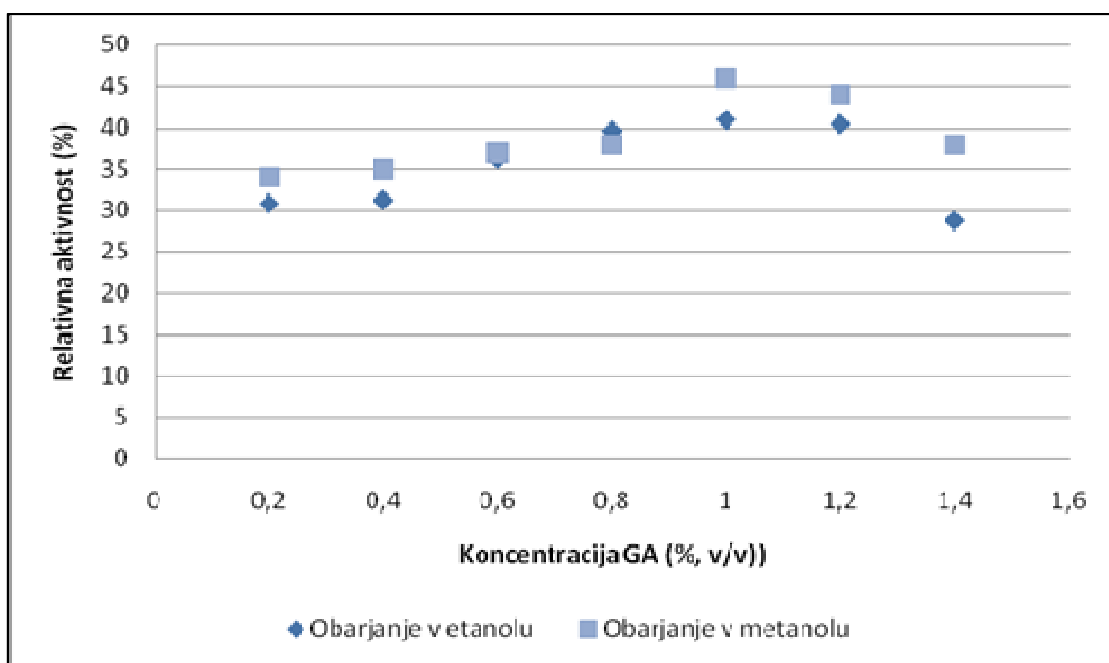


Slika 4-8: Vpliv koncentracije GA (% (v/v)) na aktivnost zamreženih encimskih skupkov α – amilaze. Obarjanje je potekalo v metanolu.



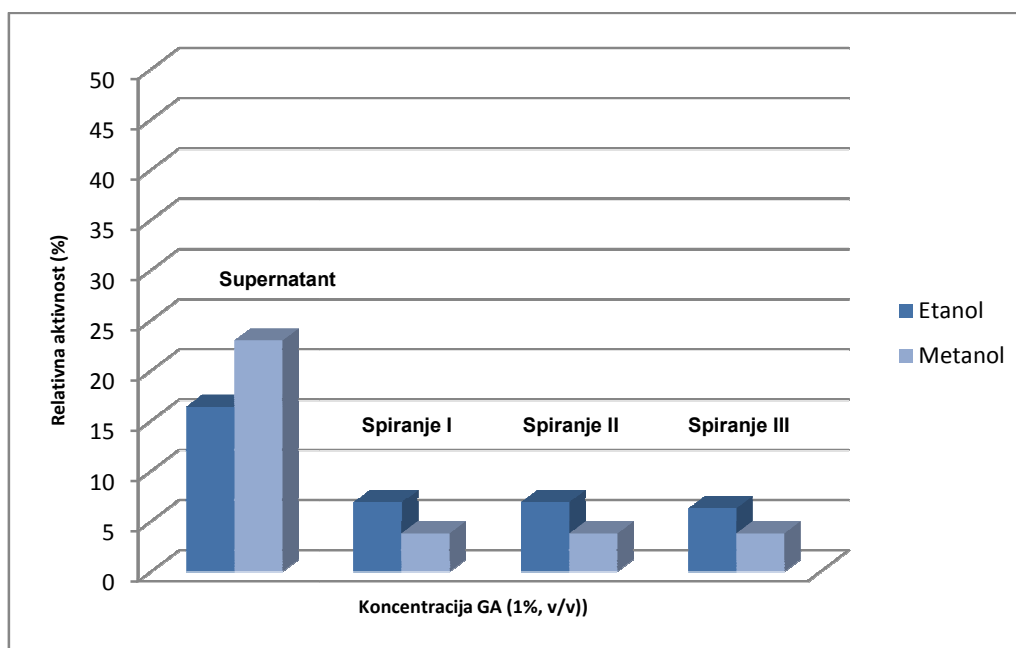
Slika 4-9: Vpliv koncentracije GA (% (v/v)) na aktivnost zamreženih encimskih skupkov α – amilaze. Obarjanje je potekalo v etanolu.

Na sliki 4 – 10 je prikazana primerjava vpliva koncentracije GA na aktivnost zamreženih encimskih skupkov α – amilaze pri obarjanju z metanolom in etanolom. CLEAs obdrži višjo aktivnost v metanolu. Najvišjo relativno aktivnost zamreženih encimskih skupkov α – amilaze smo dosegli pri $\varphi = 1,0$ % (v/v) GA.



Slika 4-10: Primerjava vpliva koncentracije GA (% (v/v)) na aktivnost zamreženih encimskih skupkov α – amilaze pri obarjanju z metanolom in etanolom.

Slika 4 – 11 kaže primerjavo relativne aktivnosti v supernatantu in v frakcijah spiranja pri sintezi CLEAs iz encima α – amilaze pri obarjanju z metanolom in etanolom ter konstantni koncentraciji GA ($\varphi = 1,0 \%$ (v/v)). Najvišjo relativno aktivnost v supernatantu smo zasledili pri uporabi metanola kot obarjalnega agensa. Po spiranju je relativna aktivnost encima ostala konstantna. Aktivnost α – amilaze v supernatantu, kaže na to, da encim uhaja iz zamreženih skupkov.



Slika 4-11: Primerjava relativnih aktivnosti v frakcijah supernatant, spiranje I, II in III pri sintezi CLEAs iz encima α – amilaze pri obarjanju z etanolom in metanolom ter stalni koncentraciji GA (1%, v/v)).

Pri optimiranju koncentracije GA smo ugotovili, da je metanol najbolj učinkovit obarjalni reagent. Aktivnost CLEAs je v metanolu najvišja, in sicer pri koncentraciji 1 % (v/v) GA.

III. del: REAKCIJA HIDROLIZE ŠKROBA

4.5 Reakcija hidrolize z imobilizirano α – amilazo na osnovi zamreženih encimskih skupkov (CLEAs)

4.5.1 Optimalni pogoji za sintezo CLEAs

Preglednica 4.8 prikazuje končne rezultate, ki smo jih dobili z optimiranjem pogojev za sintezo CLEA iz α – amilaze. Optimalni reakcijski pogoji so naslednji: $\varphi = 1 \%$ (v/v) raztopina encima α – amilaze; $T_{\text{reakcija}} = 29 \text{ }^\circ\text{C}$, pH PBS puфра 6,00. Uporabili smo vodno raztopino (PBS, 100 mM, pH = 6,00) ter BSA, ki je ogrodni protein za stabilizacijo notranje strukture encima α – amilaze. Pri našem poskusu smo ugotovili, da dosežemo najboljšo aktivnost CLEAs kadar, kot obarjalni reagent uporabimo metanol. Metanol je polarno in netoksično topilo. Reakcijo hidrolize škroba smo izvedli pri $\varphi = 1,0 \%$ (v/v) koncentraciji GA.

Preglednica 4.10: Pogoji za sintezo CLEAs iz α – amilaze.

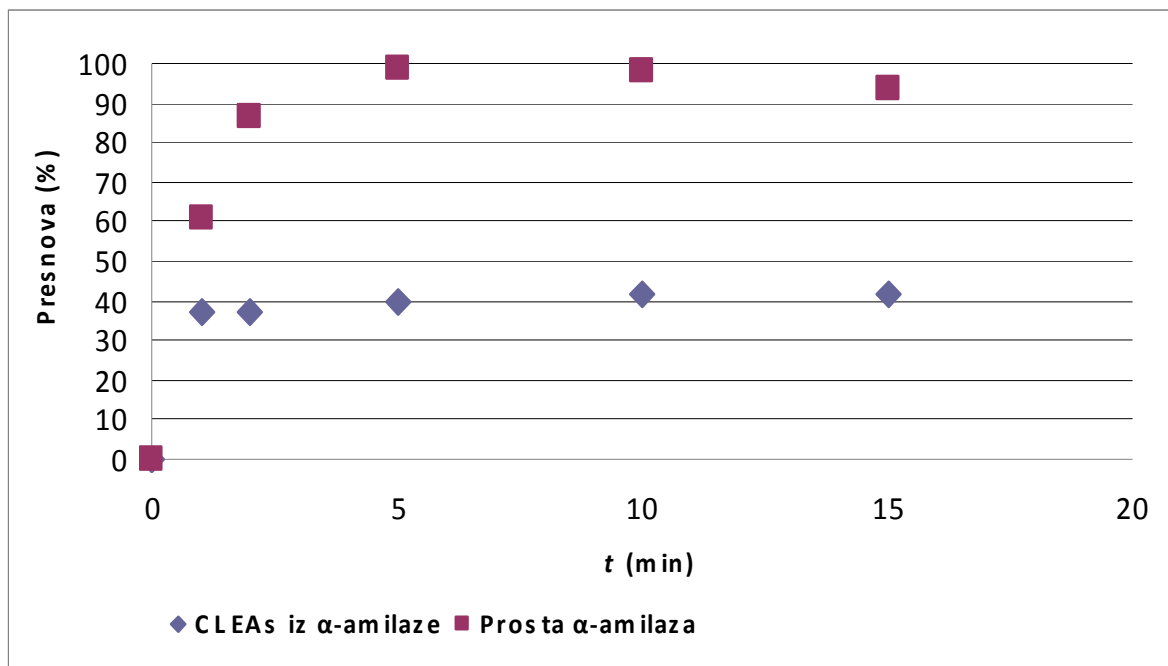
raztopina encima	$\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$ in $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$ 100 mmol/L PBS puфра pH 6,00
koncentracija obarjalnega agensa	$\varphi = 90 \%$ (v/v) metanol
koncentracija mrežnega povezovalca	$\varphi = 1,0 \%$ (v/v) GA
reakcija zamreženja	$t_{\text{zamreženje}} = 3 \text{ h}$ pri sobni temperaturi
spiranje in ločevanje CLEA iz reakcijske zmesi	centrifugiranje ($t = 10 \text{ min}$, $\nu = 3000 \text{ rpm}$)
redukcija velikosti delcev encima	mešanje z magnetnim mešalom

Reakcijska zmes za pripravo CLEAs vsebuje: $\gamma_{\alpha\text{-amilaze}} = 8 \text{ mg/mL}$ ter $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$ v 1 mL vodne raztopine (PBS, 100 mM, pH 6,00). Največjo aktivnost α – amilaza zadrži v topilo metanol. V reakcijsko zmes je potrebno dodati obarjalni agens s koncentracijo $\varphi = 90 \%$ (v/v) ter $\varphi = 10 \%$ (v/v) encima. Zmes medtem mešamo z magnetnim mešalom ter po reakciji obarjanja ($t = 40 \text{ min}$) sledi reakcija zamreženja, ki traja $t = 3 \text{ h}$. Nato sledi centrifugiranje ($t = 10 \text{ min}$, $v = 3000 \text{ rpm}$) ter spiranje CLEAs. Reakcijo hidrolize škroba smo izvedli pri $\varphi = 1,0 \%$ (v/v) koncentraciji GA. Pri tem smo dobili naslednje rezultate, ki so prikazani na slikah 4 – 12, 4 – 13, 4 – 14 ter 4 – 15.

4.5.2 Reakcija hidrolize škroba s prosto in imobilizirano α – amilazo

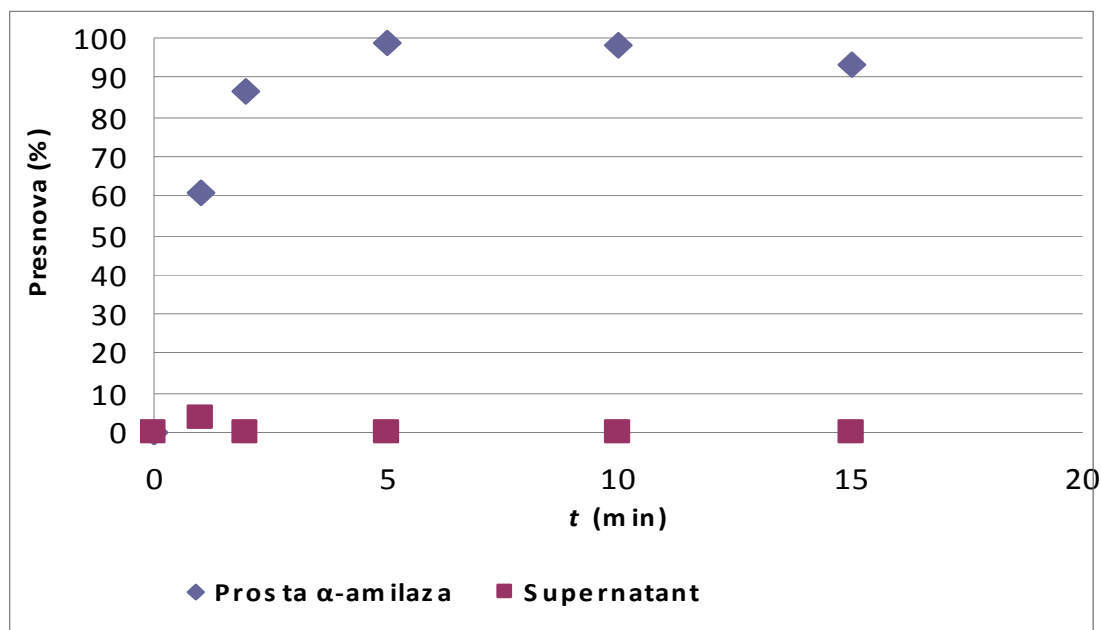
Pri reakciji hidrolize vodotopnega škroba, ki je potekala pri reakcijskih pogojih: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\varphi = 1 \%$ (v/v) raztopina encima α – amilaze, $T_{\text{reakcija}} = 29 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6,00 (PBS pufer 100 mM), smo dobili rezultate, ki so prikazani na slikah 4 – 12 in 4 – 13.

Slika 4 – 12 prikazuje hidrolizo škroba, katalizirano s prosto in imobilizirano α – amilazo (CLEAs iz α – amilaze). Pri tem so bili reakcijski pogoji naslednji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$, obarjalni reagent je metanol, koncentracija GA je 1 % (v/v). Najvišjo presnovno smo dobili pri prosti α – amilazi, medtem ko smo pri imobilizirani α – amilazi dobili za polovico nižjo presnovno pri $\varphi = 1,0 \%$ (v/v) koncentraciji GA. Slika 4 – 13 prikazuje reakcijo hidrolize vodotopnega škroba s prosto α – amilazo ter v preostanku v supernatantu, kjer pa hidroliza ne poteče.



Slika 4-12: Reakcija hidrolize vodotopnega škroba, katalizirana s prosto in imobilizirano α – amilazo.

Slika 4 – 13 prikazuje primerjavo reakcije hidrolize škroba, katalizirano s prosto α – amilazo in frakcijo supernatanta po sintezi CLEAs iz α – amilaze. Iz slike je razvidno, da reakcija v supernatantu ni potekla. Reakcijski pogoji so bili naslednji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$, obarjalni reagent je metanol, koncentracija GA je 1 % (v/v).



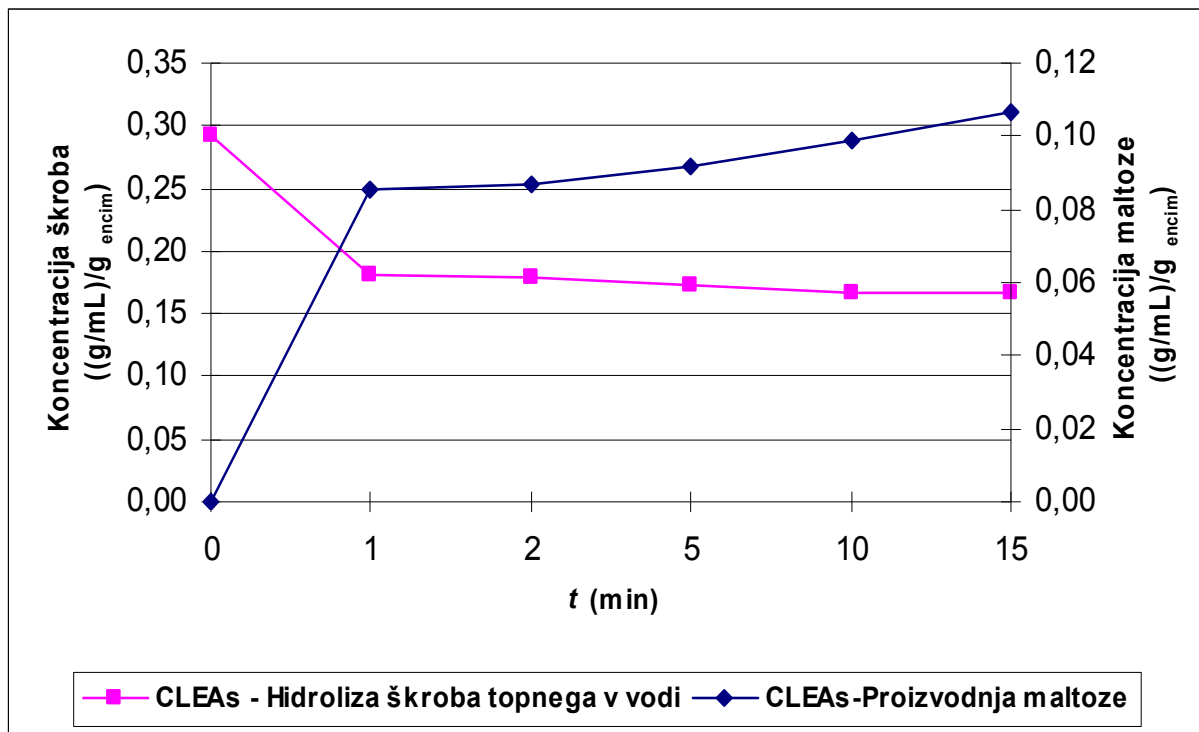
Slika 4-13: Primerjava reakcije hidrolize vodotopnega škroba, katalizirano s prosto α – amilazo in s frakcijo supernatanta po sintezi CLEAs iz α – amilaze.

Pri imobiliziranem encimu so izkoristki manjši v primerjavi s prosto α – amilazo, kar bi lahko razložili s tem, da GA – kot mrežni povezovalac – prekriva aktivnostna mesta v encimu.

Pri reakciji hidrolize vodotopnega škroba smo zasledovali upadanje koncentracije škroba ter proizvodnjo maltoze v odvisnosti od časa. To reakcijo smo izvedli z imobilizirano α – amilazo, ter s preostankom po obarjanju v supernatantu. Rezultate naših analiz predstavljata sliki 4 – 14 in 4 – 15.

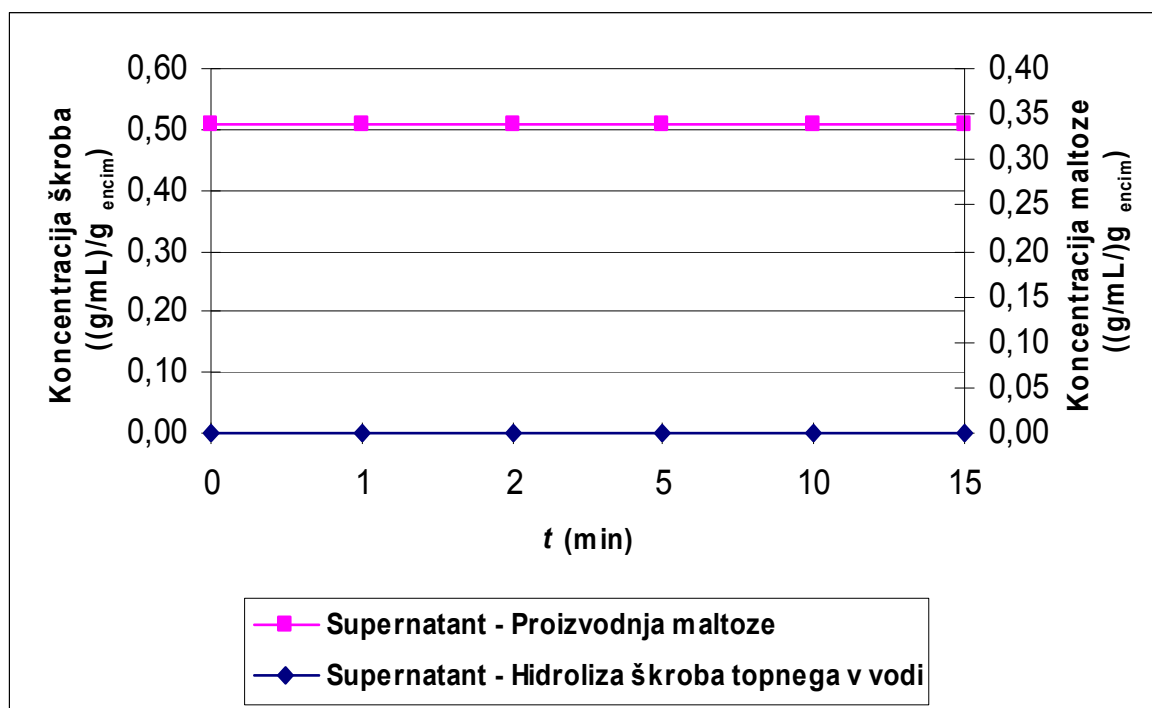
Iz slike 4 – 14 je razvidno, da smo najvišjo koncentracijo maltoze dobili po 15 minutah reakcije. Koncentracija škroba s časom upada, medtem pa koncentracija maltoze narašča. Za to reakcijo veljajo naslednji reakcijski pogoji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$, obarjalni reagent je metanol, koncentracija GA je 1 % (v/v), $T_{\text{reakcija}} = 29 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 6,00 (PBS

puffer 100 mmol/L). Reakcijo hidrolize vodotopnega škroba smo izvajali v različnih časovnih intervalih, in sicer smo vzorce jemali v času $t = 0, 1, 2, 5, 10$ in 15 minut.



Slika 4-14: Reakcija hidrolize vodotopnega škroba z imobilizirano α – amilazo.

Slika 4 – 15 opisuje reakcijo hidrolize vodotopnega škroba s preostankom supernatanta po sintezi zamreženih encimskih skupkov α – amilaze. Za to reakcijo veljajo naslednji reakcijski pogoji: $\gamma_{\alpha\text{-amilaza}} = 8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/mL}$, obarjalni reagent je metanol, koncentracija GA je 1 % (v/v), $T_{\text{reakcija}} = 29 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 6,00 (PBS puffer 100 mmol/L). Reakcija hidrolize v supernatantu ni potekla.



Slika 4-15: Reakcija hidrolize vodotopnega škroba katalizirana s preostankom supernatanta po sintezi zamreženih encimskih skupkov α – amilaze.

5 ZAKLJUČEK

Načrtovanje primerne oblike imobiliziranega encima je dolgotrajno in dosledno delo, tako da ne obstaja nobeno splošno univerzalno pravilo za določeno imobilizacijo encima. V splošnem izbrana metoda za imobilizacijo mora združevati oboje, zahteve encimskega preparata kot so produktivnost, časovna produktivnost, stabilnost in selektivnost ter praktičnost samega preparata kot so ločevanje, nadzor in procesi za koncentriranje imobiliziranega encima iz reakcijske zmesi. Imobiliziran encim velja za robustno strukturo, v kateri združuje katalitično in nekatalitično funkcijo za potrebe določene aplikacije.

Metode za imobilizacijo postajajo vse bolj odmevnejše na področju raziskav v encimski tehnologiji, kajti imobilizirani encimi predstavljajo potencialno in neškodljivo obliko biokatalizatorja. Poleg tega pomeni implementacija imobilizirane oblike biokatalizatorja v sam proces tudi boljše poznavanje samega procesa in seveda zmanjšanje stroškov od postavitve procesa do same proizvodnje.[10]

V zadnjih letih, so zamreženi encimski skupki vzbudili posebno pozornost zaradi enostavne priprave, široke uporabe, visoke stabilnosti volumetrične produktivnosti na volumen reaktorja. Zamreženi encimski skupki se pripravijo s kemijskim medmolekularnim zamreženjem, ki se sintetizirajo z uporabo obarjalnih agensov, obenem pa ne ireverzibilno poškodujejo ali denaturirajo encim. Primer priprave zamreženih encimskih agregatov in njihova uporaba je bila prikazana na encimu α – amilaza, prav tako je bil določen vpliv posameznih parametrov na pripravo zamreženih encimskih agregatov (CLEAs).[9]

CLEAs je zelo atraktivna oblika imobiliziranega biokatalizatorja, ki je učinkovit in poceni ter stabilen pri povišani temperaturi in v organskih topilih. Uporablja se pri sintezi zdravil, arom, kemikalij, dišav, pri proizvodnji kozmetike, itd.

Imobilizirani encimi brez nosilca nudijo v biokatalizi številne prednosti glede na industrijsko uporabo: enostavna priprava, ki pripelje do nižjih stroškov in delovanje pri blagih pogojih, fleksibilnost in širok doseg. CLEAs je v principu uporabna za različne encime, vključno z neobdelanimi preparati. Encim ni v kristalni obliki in tehnika je lahko uporabna za pripravo »combi CLEAs«, ki vsebuje dva ali več encimov. Sinteza CLEAs v prisotnosti dodatkov, kot je na primer eter, poveča možnost pretvorbe imobiliziranega encima v bolj ugodno strukturo, kar pomeni povečanje aktivnosti in/ali (enantio) selektivnosti.[11]

V naši raziskavi smo določili dejavnike, ki vplivajo na proces sinteze zamreženih encimskih skupkov α – amilaze; vrsto obarjalnega reagenta in koncentracijo mrežnega povezovalca. Obarjanje ali precipitacijo encima smo izvedli brez ogradnega proteina BSA ter z BSA. Ugotovili smo, da je bila relativna aktivnost resuspendiranih skupkov v prisotnosti BSA pri vseh topilih zelo velika. BSA je ogradni protein, ki pospeši tvorbo CLEAs. Najvišjo aktivnost oborjenih skupkov α – amilaze smo zasledili pri obarjalnih reagentih – metanolu in etanolu, ki veljata za polarni in netoksično topili. Njuna koncentracija pri sintezi CLEAs je bila $\varphi = 90$ % (v/v). Ti dve topili sta bili izbrani za naslednji korak: zamreženje encimskih skupkov. Optimalna koncentracija mrežnega povezovalca – GA je $\varphi = 1$ % (v/v), saj v tem primeru dobimo CLEAs z najvišjo aktivnostjo. GA je strupen reagent in pri višji koncentraciji – pri nas $\varphi = 1,4$ % – povzroča prekrivanje aktivnostnih mest ter deaktivacijo encima, saj lahko prihaja do reakcije med zamrežitvenim agensom in amino – kislinskimi ostanki v encimu, le – ti so odločilni za njegovo aktivnost. Če primerjamo aktivnost proste α – amilaze ter aktivnost zamreženih skupkov α – amilaze, lahko opazimo precejšno odstopanje. Razlog je v tem, da je zamreženje premalo intenzivno in omogoča encimu uhajanje iz teh zamreženih skupkov.

Aktivnost imobilizirane α – amilaze smo testirali samo na reakciji hidrolize vodotopnega škroba, tako da v prihodnje delo temelji na raziskavi različnih substratov, na primer koruzni, pšenični škrob. V nadaljevanju bomo določili še vpliv koncentracije substrata ter začetne hitrosti reakcije škroba z imobilizirano obliko encima na osnovi CLEAs tehnologije.

Da zmanjšamo izgubo aktivnosti med skladiščenjem, se moramo izogibati tudi skladiščenju pri sobni temperaturi. Večina encimov je stabilnih v ohlajenem prostoru (0 – 4 °C).

Hlajenje pod 0 °C v prisotnosti aditivov (glicerol), ki preprečujejo zamrzovanje, poveča stabilnost med skladiščenjem.

Izogibamo se zamrzovanju raztopin encimov, saj pogosto povzroča denaturacijo, ki je posledica striga in variiranja pH zaradi formiranja ledenih kristalov.

6 LITERATURA

1. <http://www-fg.ijs.si/~krizan/sola/sempod/0708/godec.pdf>digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_%20plankar_matej.pdf <30/04/2009>
2. Kim J., Grate J. W., Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization, *Chemical Engineering Science*, 2006; 61, 1017 – 1026.
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Cross-linked_enzyme_aggregate <30/04/2009>
4. Schoevaart R., Wolbers M. W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom A. P.G., van Rantwijk F., van der Wielen L. A. M, Sheldon R. A. Preparation, Optimization, and Structures of Cross – Linked Enzyme Aggregates (CLEAs), *Biotechnology and bioengineering*, 2004; 87/6, 754 – 762.
5. Worsfold P.J. Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes, Technical Report, *Pure and Applied Chemistry*, 1995; 67/4, 597 – 600.
6. <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/imemethod.html> <05/09/2008>
7. Bailey J. E., Ollis D.F. *Biochemical engineering fundamentals*. 2nd ed, New York: Mc Graw – Hill, 1986.
8. Mateo C., Palomo J. M., Fernandez – Lorente G., Guisan J. M., Fernandez – Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, 2007; 40, 1451 – 1463.
9. Cao L., van Langen L., Sheldon R. A. Immobilised enzymes: carrier – bound or carrier – free?, *Current Opinion in Biotechnology*, 2003; 14, 387 – 394.
10. Cao L. Immobilised enzymes: science or art?, *Current opinion in Chemical Biology*, 2005; 9, 217 – 226.
11. Sheldon R. A. Cross – linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable Biocatalysts, *Biochemical Society Transactions*, 2007; 35, 1583 – 1587.
12. Cao L., van Langen L. M., van Rantwijk F., Sheldon R. A. Cross – linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β – lactam antibiotics, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001; 11, 665 – 670.
13. Bisswanger H. *Practical Enzymology*. Wiley – VCH Verlag, Weinheim, Germany, 2004.
14. http://www.minet.si/gradivo/egradiva/kemija/HTML/KE_5_3_kovalentna_vez <30/04/2009>
15. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_%20plankar_matej.pdf <30/04/2009>
16. <http://www.chemical-ecology.net/java/solvents.html> <30/04/2009>
17. Walt D. R., Agayn V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, *Trends in Analytical Chemistry*, 1994; 13/10, 425 – 430.
18. Gallego – Lopez F., Betancor L., Mateo C., Higaldo A., Alonso – Morales N., Dellamora – Ortiz G., Guisan J. M., Fernandez – Lafuente R. Enzyme stabilization

-
- by glutaraldehyde crosslinking of absorbed proteins on aminated supports, Journal of Biotechnology, 2005; 119, 70 – 75.
19. <http://.en.wikipedia.org/wiki/Starch> <30/04/2009>
 20. Nilsson S. G. Characterisation of Starch, Development of Analytical Methods. Lund Sweden: Sweden University, Department of analytical chemistry, 1999.
 21. <http://.en.wikipedia.org/wiki/Glucose> <30/04/2009>
 22. <http://.en.wikipedia.org/wiki/Maltose> <30/04/2009>
 23. <http://.en.wikipedia.org/wiki/Dextrin> <30/04/2009>
 24. <http://.en.wikipedia.org/wiki/Enzyme> <30/04/2009>
 25. <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/imkinetics.html> <05/09/2008>
 26. <http://.en.wikipedia.org/wiki/Amylase> <30/04/2009>
 27. Apar et al. α – Amylase inactivation during rice starch hydrolysis, Process Biochemistry, Vo.40,2005,1367-1379
 28. Miller G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical chemistry, 1959; 31/3, 426 – 428.
 29. Shah S., Sharma A., Gupta M. N. Preparation of cross – linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, Analytical Biochemistry, 2006; 351, 207 – 213.

7 PRILOGE

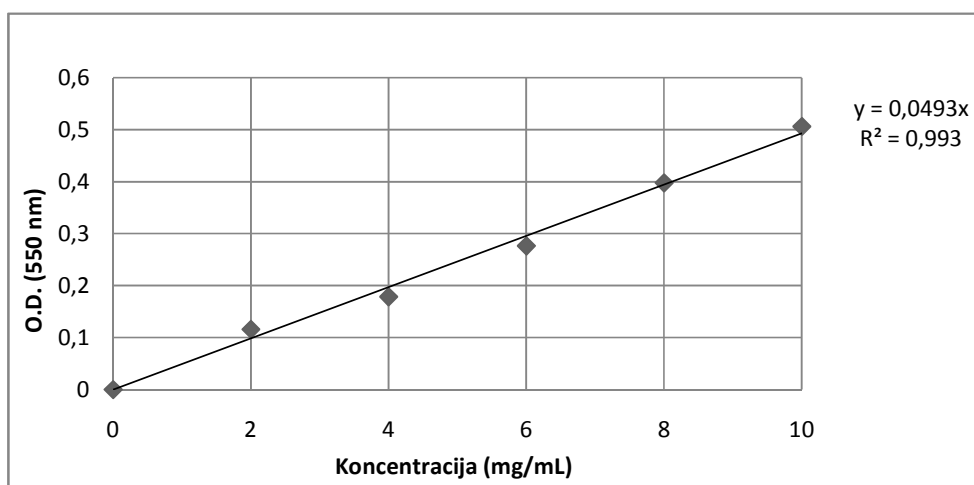
- ❖ PRILOGA A: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije vodotopnega škroba.
- ❖ PRILOGA B: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije maltoze.
- ❖ PRILOGA C: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije maltoze z aktivnostnim testom.
- ❖ PRILOGA D: Umeritvena krivulja za Bradfordovo metodo.
- ❖ PRILOGA E: Življenjepis.

PRILOGA A: UMERITVENA KRIVULJA ZA DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE VODOTOPNEGA ŠKROBA

Preglednica A.1 prikazuje eksperimentalne podatke za konstrukcijo umeritvene krivulje za določevanje koncentracije vodotopnega škroba. Pri tem so v preglednici podane koncentracije vodotopnega škroba v mg/mL, masa škroba v g ter absorbance pri valovni dolžini, $\lambda = 550$ nm.

Preglednica A.1: Absorbance pri valovni dolžini $\lambda = 550$ nm za konstrukcijo umeritvene krivulje za določevanje koncentracije vodotopnega škroba.

γ vodotopnega škroba/ (mg/mL)	$m_{\text{škroba}}/g$	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Povprečje
2	0,01	0,1060	0,1010	0,1404	0,1158
4	0,02	0,1411	0,1883	0,2055	0,1783
6	0,03	0,1311	0,2993	0,3982	0,2762
8	0,04	0,1597	0,5126	0,5199	0,3974
10	0,05	0,1789	0,7058	0,6334	0,5060



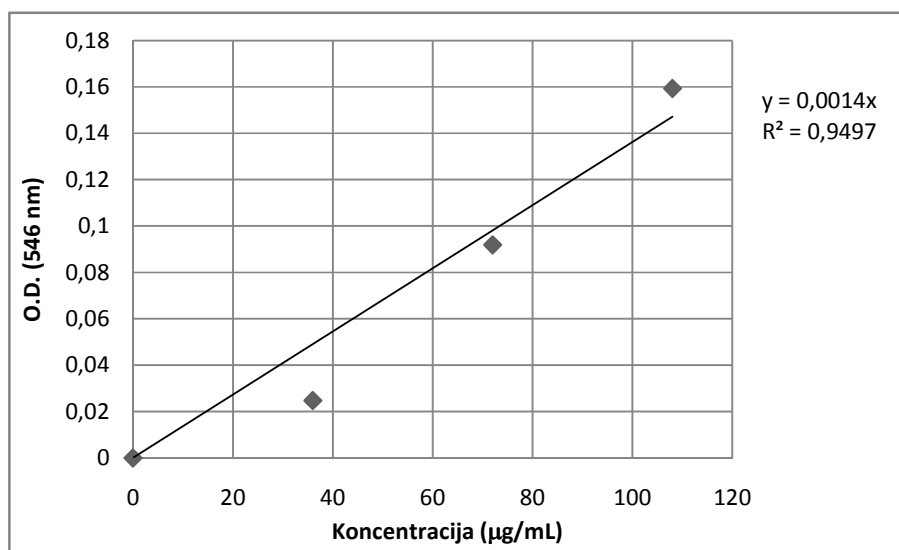
Slika A – 1: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije vodotopnega škroba pri valovni dolžini $\lambda = 550$ nm.

PRILOGA C: UMERITVENA KRIVULJA ZA DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE MALTOZE Z AKTIVNOSTNIM TESTOM

Preglednica C.1 prikazuje eksperimentalne podatke za konstrukcijo umeritvene krivulje za določevanje koncentracije maltoze z aktivnostnim testom. Preglednica vsebuje koncentracijo maltoze v $\mu\text{g/mL}$ ter absorbanco pri valovni dolžini, $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Preglednica C.1: Eksperimentalni podatki za umeritveno krivuljo za določevanje koncentracije maltoze z aktivnostnim testom, ki jo uporabljamo samo za določevanje aktivnosti α – amilaze, IU/mL.

$\gamma_{\text{maltoza}}/(\mu\text{g/mL})$	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Povprečje
36	0,0317	0,0249	0,0179	0,0248
72	0,0979	0,1060	0,0719	0,0919
108	0,1737	0,1746	0,1296	0,1593



Slika C – 1: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije maltoze pri valovni dolžini, $\lambda = 546 \text{ nm}$ z aktivnostnim testom.

PRILOGA E: ŽIVLJENJEPIS