

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Mojca NJEGAČ

**BIOTRANSFORMACIJA V MIKROKANALU S
KVASOVKAMI, IMOBILIZIRANIMI NA OSNOVI
MAGNETIZMA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Mojca NJEGAČ

**BIOTRANSFORMACIJA V MIKROKANALU S KVASOVKAMI,
IMOBILIZIRANIMI NA PODLAGI MAGNETIZMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BIOTRANSFORMATION IN A MICROCHANNEL WITH YEAST,
IMMOBILISED ON THE BASIS OF MAGNETISM**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, na Katedri za kemijsko procesno, okoljsko in biokemijsko inženirstvo.

Študijska komisija je za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Polono Žnidaršič Plazl.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.

Članica: prof. dr. Polona Žnidaršič Plazl
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Oddelek za kemijsko inženirstvo in tehniško varnost

Članica: prof. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

Datum zagovora: 22.9.2016

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mojca Njegač

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 602.1:602.3:582.282.23:602.44 (043.2)
 KG biotehnologija/mikroreaktor/kvasovke/biotransformacija/fumaraza/imobilizacija/nanodelci/*Saccharomyces cerevisiae*/magnetizem
 AV NJEGAČ, Mojca
 SA ŽNIDARŠIČ PLAZL, Polona (mentorica)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
 LI 2016
 IN BIOTRANSFORMACIJA V MIKROKANALU S KVASOVKAMI, IMOBILIZIRANIMI NA PODLAGI MAGNETIZMA
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP X, 48 str., 2 pregl., 16 sl., 2 pril., 68 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI L-jabolčna kislina je snov s širokim spektrom uporabe, saj je pomembna tako v živilski, kakor tudi farmacevtski industriji in medicini. Biotehnologija ponuja alternativo konvencionalnim, tipično okolju neprijaznim metodam sinteze te kisline, ki temelji na pretvorbi fumarne kisline s katalitskim delovanjem fumaraze. V pričujočem delu smo to reakcijo izvedli s celicami *Saccharomyces cerevisiae* v pretočnem sistemu mikrokkanalov, ki ponujajo številne prednosti za razvoj in izvedbo procesov, pri čemer smo preučili možnost imobilizacije celic na osnovi magnetizma in vpliv različnih procesnih parametrov na njeno uspešnost. V preliminarinih poskusih smo med različno sintetiziranimi Fe₃O₄ in CoFe₂O₄ nanodelci, shranjenimi v različnih topilih, izbrali najučinkovitejše glede zadržanja celic v magnetnem polju. Preučili smo vpliv različnih časov izpostavitve suspenzije celic izbranim nanodelcem in določili ustrezno razmerje med maso nanodelcev in suho maso celic za učinkovito zadržanje v mikrokkanalu. S primerjavo biotransformacije fumarne v L-jabolčno kislino s prostimi celicami *S. cerevisiae* in celicami, izpostavljenimi izbranim nanodelcem, smo dokazali, da slednji ne znižujejo njihove sposobnosti pretvorbe, kar je povezano z ugotovitvijo, da magnetni delci ostajajo na zunanji površini celic. V nadaljevanju smo s celicami, imobiliziranimi v mikroreaktorju na osnovi magnetizma, izvedli obravnavano biotransformacijo pri različnih koncentracijah substrata in pri različnih zadrževalnih časih in jo primerjali s šaržnim procesom. Ugotovili smo, da smo z uporabo Fe₃O₄ nanodelcev in magnetnega polja omogočili enostavno in učinkovito imobilizacijo kvasovk v mikroreaktorju, ki omogoča visoke produktivnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
 DC UDC 602.1:602.3:582.282.23:602.44 (043.2)
 CX biotechnology/microreactor/yeast/biotransformation/fumarase/immobilization/nanoparticles/*Saccharomyces cerevisiae*/magnetism
 AU NJEGAČ, Mojca
 AA ŽNIDARŠIČ PLAZL, Polona (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic study in biotechnology
 PY 2016
 TI BIOTRANSFORMATION IN A MICROCHANNEL USING YEAST, IMMOBILISED BY MAGNETISM.
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO X, 48 p., 2 tab., 16 fig., 2 ann., 68 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB L-malic acid is a substance with a wide range of applications; it is important both in food and pharmaceutical industry, as well as in medicine. Biotechnology offers an alternative method of its synthesis, based on the fumarase-catalyzed biotransformation of fumaric acid. In the present work, this reaction was carried out with *Saccharomyces cerevisiae* cells in a microflow system, offering several benefits for process development and performance, where cell immobilization based on the magnetism was investigated and parameters influencing its efficiency were studied. Preliminarily, the most efficient particles for cell retainment in the magnetic field were selected from various Fe₃O₄ in CoFe₂O₄ nanoparticles kept in different solvents. The impact of cell suspension to nanoparticles exposure time was evaluated and adequate nanoparticles mass to cell dry weight ratio for efficient cell retainment in a microchannel was established. The comparison of fumaric to L-malic acid biotransformation performed with untreated cells and cells exposed to the selected nanoparticles revealed that the latter did not affect transformation capability of cells, which was related to the finding that magnetic particles were retained on the cell outer surface. Furthermore, the biotransformation was carried out with cells immobilized in a microreactor based on the magnetism at different reactant concentrations and different residence times and compared with a batch process. Very efficient and simple immobilization of yeast cells using Fe₃O₄ nanoparticles and magnetic field was achieved in a microreactor enabling very high productivities.

KAZALO VSEBINE

KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKROREAKTORJI	3
2.1.1 Proizvodnja snovi v mikroreaktorjih	4
2.1.2 Druge možnosti uporabe mikroreaktorjev.....	4
2.2 ENCIMSKO KATALIZIRANE REAKCIJE	5
2.2.1 L-jabolčna kislina	6
2.3 BOKATALIZA V MIKROREAKTORJIH	10
2.3.1 Imobilizacija katalizatorja v mikroreaktorju	11
2.4 KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.4.1 Površinske lastnosti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MIKROORGANIZEM IN GOJIŠČE	18
3.2 IZBIRA IN KARAKTERIZACIJA NANODELCEV	18
3.2.1 Določanje porazdelitve velikosti nanodelcev	19
3.2.2 Določanje lokacije nanodelcev v oziroma na celicah <i>S. cerevisiae</i>	19
3.3 ŠTUDIJ DEJAVNIKOV IMOBILIZACIJE.....	20
3.3.1 Izbor nanodelcev	20
3.3.2 Imobilizacija celic v mikrokanalu	20
3.4 BIOTRANSFORMACIJA FUMARNE V L-JABOLČNO KISLINO.....	23
3.4.1 Biotransformacija v mešalnem reaktorju	23
3.4.2 Biotransformacija v mikrokanalu.....	24
3.5 ANALIZNE METODE.....	25
3.5.1 Določanje koncentracije celic	25

3.5.2	Določanje masne koncentracije nanodelcev	26
3.5.3	Porazdelitev velikosti nanodelcev	26
3.5.4	HPLC analiza	26
4	REZULTATI	27
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE KVASOVK V SUSPENZIJI	27
4.2	LASTNOSTI NANODELCEV	27
4.2.1	Določitev porazdelitve velikosti nanodelcev	29
4.2.2	Določanje položaja zadržanja nanodelcev na celice <i>S. cerevisiae</i>	31
4.3	ŠTUDIJ RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA USPEŠNOST IMOBILIZACIJE CELIC	32
4.3.1	Vpliv časa izpostavitve celic nanodelcem	32
4.3.2	Vpliv razmerja med nanodelci in celicami	34
4.3.3	Vpliv pH vrednosti vodne raztopine uporabljene pri imobilizaciji	34
4.4	BIOTRANSFORMACIJA FUMARNE V L-JABOLČNO KISLINO	35
4.4.1	Biotransformacija v šaržnem sistemu	35
4.4.2	Biotransformacija v kontinuirnem poskusu v mikroreaktorju	36
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	38
5.1	RAZPRAVA	38
5.1.1	Izbira magnetnih nanodelcev in pogojev imobilizacije	38
5.1.2	Šaržni in kontinuirni proces biotransformacije	39
5.2	SKLEPI	40
6	POVZETEK	42
7	VIRI	44
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemikalije, ki so bile uporabljene za izdelavo mobilne faze.	26
Preglednica 2: Pregled izračunanih povprečnih vrednosti določanja masnih koncentracij delcev in deleža imobiliziranih celic ob uporabi različnih vzorcev nanodelcev. Delci, ki smo jih nadalje uporabljali, so barvno označeni.	28

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema reakcije hidracije fumarne kisline v L-jabolčno kislino ob katalizi s fumarazo.	7
Slika 2: Shema Krebsovega ciklusa, v kateri je predstavljena pretvorba fumarata ²⁻ v malat ²⁻	8
Slika 3: 3-D struktura fumaraze. (RCSB PDB, 2016)	9
Slika 4: Zgradba celice kvasovke <i>S. cerevisiae</i> . BS - brstna brazgotina (ang. Bud Scar); ER - endoplazmatski retikulum; G - Golgijev aparat. L - lipidno telesce; M - mitohondrij; N- nukleus; SPB - delitveno vreteno (ang. Spindle Pool Body); V - vezikel; Vac – velika centralna vakuola; W – celična stena (ang. Wall) (Deacon, 2006).	16
Slika 5: Vzorci nanodelcev, uporabljenih v eksperimentu.	19
Slika 6: Shema aparature: 1 - injekcija za vnašanje vhodne raztopine, oziroma suspenzije celic; 2 -mikrokanal, katerega osrednji del je obdan z magnetki; 3 - mikrocentrifugirka za zbiranje izhodnega vzorca.	21
Slika 7: Umeritvena krivulja koncentracije suspenzije celic kvasovk v odvisnosti od izmerjene optične gostote.	27
Slika 8: Porazdelitve delcev po velikosti: a) Delci Fe ₃ O ₄ b)CoFe ₂ O ₄ c) agregati CoFe ₂ O ₄ (Stojkovič in sod., članek v pripravi).	30
Slika 9: SEM mikroskopija celic kvasovk z nanodelci in obarvanim železom.	31
Slika 10: Celice <i>S. cerevisiae</i> MZKI K86, inkubirane z Fe ₃ O ₄ nanodelci, obarvanimi s fluorescentnim barvilom iridijev(III) acetil-acetonato-bis(3-(benzotiazol-2-il)-7-(dietilamino)-kumarin, vizualizirane s fluorescenčno mikroskopijo (Stojkovič in sod., 2016).	32
Slika 11: Mikrokanal, obdan z magnetki in z imobiliziranimi celicami, obdanimi z magnetnimi nanodelci.	33
Slika 12: Delež celic imobiliziranih v mikrokanalu v odvisnosti od predhodnega časa inkubacije celic <i>S.cerevisiae</i> z nanodelci v testni posodi.	33
Slika 13: Delež imobiliziranih celic v mikrokanalu v odvisnosti od razmerja med maso nanodelcev in suho maso celic v inkubacijski posodi.	34
Slika 14: Grafični prikaz deleža imobiliziranih celic v odvisnosti od pH vrednosti vodne raztopine pufra, uporabljenega pri imobilizaciji.	35
Slika 15: Grafikon, ki prikazuje dosežene konverzije fumarne kisline v L-jabolčno kislino v odvisnosti od reakcijskega časa pri celicah, inkubiranih z nanodelci in celicah, ki niso bile inkubirane z nanodelci.	36
Slika 16: Grafikon, ki prikazuje dosežene konverzije fumarne kisline v odvisnosti od zadrževalnih časov v mikrokanalu pri različnih koncentracijah substrata (fumarna kislina).	37

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Umeritvena krivulja: Koncentracija fumarne kisline v 0,1 M citratno fosfatnem pufru pH vrednosti 7 v odvisnosti od površine vrha pri HPLC analizi.

PRILOGA B: Umeritvena krivulja: Koncentracija jabolčne kisline v 0,1 M citratno fosfatnem pufru pH vrednosti 7 v odvisnosti od površine vrha pri HPLC analizi.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADH	alkohol-dehidrogenaza
ATPES	3-aminopropiltriethoksilan
DNA	deoksiribonukleinska kislina
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
M	molarna koncentracija (mol L^{-1})
MNP	magnetni nanodelci
MRI	slikanje z magnetno resonanco
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrid
NP	nanodelci
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PDMS	polidimetilsiloksan
PFA	perfluoroalkoksi
PVP	polivinilpirolidon
SEM	vrstična elektronska mikroskopija

1 UVOD

Ostra konkurenca na področju kemijske in biokemijske industrije narekuje nenehno iskanje novih tehnoloških rešitev, ki bodo omogočale višje donose, manjše stroške in prijaznost okolju. Ena izmed obetavnih alternativ konvencionalnim procesom je zagotovo miniaturizacija reaktorjev, ki se počasi, toda vztrajno, vpeljuje v vse veje kemijskega in biokemijskega inženirstva. V vedno večji meri je mikrofluidika prisotna v biotehnologiji in medicinski diagnostiki (Song in sod., 2012; Wirth; 2013; Wohlgemuth in sod., 2015).

V primerjavi s kemijsko sintezo nam biotransformacije ponujajo nekatere pomembne prednosti, predvsem specifičnost, stereoselektivnost, izvajanje reakcij v blagih pogojih in večja ekološka sprejemljivost takih procesov. Kot katalizatorje se uporablja izolirane encime, ali celotne celice. Uporaba celotnih celic je smiselna, ker bistveno zmanjša stroške izolacije in čiščenja katalizatorja, poleg tega pa celice tudi same reciklirajo kofaktorje, ki lahko v encimsko kataliziranih reakcijah predstavljajo velik strošek. Ob tem je potrebno biti pozoren na nižjo specifično aktivnost in omejen prenos snovi v celico, ter iz nje. Biotransformacije na mikroprocesnem nivoju odlikujeta učinkovit dostop substrata do aktivnega mesta, boljši časovni in prostorski nadzor procesa, lažje čiščenje končnega produkta in krajši zadrževalni časi za doseg enake stopnje pretvorbe, kar je spet povezano tako s stroškovnimi, kot tudi ekološkimi vidiki procesa (Pohar in Plazl, 2009; Wohlgemuth in sod., 2015).

Tako kot v konvencionalnih sistemih, so tudi v mikroreaktorjih biološki katalizatorji lahko prosti ali imobilizirani. Pri tem lahko uporabimo različne tehnike, med katerimi se bomo osredotočili na imobilizacijo celic s pomočjo magnetnih nanodelcev. Velika prednost slednje metode je neinvazivnost, saj le-ta naj ne bi imela vpliva na živost celic in celični metabolizem (Pandya in sod., 2005; Sheldon in sod. 2007; Mateo in sod., 2007).

Reverzibilna imobilizacija katalizatorja v mikrokanalu predstavlja izziv pri izvedbi učinkovite biotransformacije. Omogoča visok nivo avtomatizacije in učinkovit nadzor procesnih parametrov za sorazmerno nizko porabo energije in kemikalij (Bolivar in sod., 2011).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil razvoj in optimizacija mikrobioreaktorja za izvedbo pretvorbe fumarne v L-jabolčno kislino, v katerem so celice *S. cerevisiae*, obdane z magnetnimi nanodelci, imobilizirane na podlagi magnetizma. Pri tem smo želeli prikazati način imobilizacije, ki je preprost, hiter in ne zahteva spreminjanja notranjih sten mikrokanala, ter ga primerjati z drugimi znanimi metodami imobilizacije celic.

Nadalje smo želeli preveriti sposobnost pretvorbe fumarne kisline s celicami, ki so obdane z magnetnimi nanodelci in so ob prisotnosti magnetnega polja zadržane v notranjosti mikroreaktorja. Za natančnejše razumevanje vezave magnetnih nanodelcev na celice smo želeli preveriti lokacijo vezave in njihovo morebitno penetracijo skozi plazmalemo v notranjost. V ta namen smo za vizualizacijo z magnetnimi nanodelci obdelanih celic uporabili fluorescenčni in elektronski vrstični mikroskop.

Izbrano reakcijo smo izvedli pri različnih procesnih pogojih v mikroreaktorju in rezultate primerjali s šaržnim procesom. Izvajanje encimsko kataliziranih reakcij na mikroprocesnem nivoju predstavlja dokaj nov izziv na področju razvoja bioprocsov; največ raziskav je bilo zaenkrat narejenih z uporabo prečiščenih encimov, manj s celimi celicami. Velik potencial kažejo podatki, da encimska kataliza v kontinuirno delujočem mikroreaktorju omogoča znatno višje produktivnosti, kot v običajnih šaržnih procesih, zato je to perspektivna tema, ki smo jo želeli podrobneje raziskati.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROREAKTORJI

Po definiciji v sklop mikroprocesnega inženirstva spadajo procesi v napravah, pri katerih vsaj ena dimenzija ne presega velikosti enega milimetra, volumni pa so običajno v mikrolitrskem območju. Na ta način dosežemo manjšo porabo reagentov, večje izkoristke, ter lažjo kontrolo in optimizacijo procesnih parametrov, kot posledico laminarnega toka tekočin (Pohar, 2012). Miniaturizacija naprav zaradi visokega razmerja med površino in prostornino reaktorja omogoča hiter prenos toplote in snovi, kar je v kombinaciji z majhnimi količinami reagentov posebej dobrodošlo pri ravnanju z vnetljivimi, toksičnimi in eksplozivnimi materiali. Zaprtost sistemov nam ob tem omogoča tudi lažjo sanacijo v morebitnem primeru, ko reakcija uide izpod nadzora. Večanje kapacitete namesto s klasičnim prenosom v večje merilo (ang. scale-up), dosežemo z večanjem števila mikroreaktorskih enot (ang. numbering-up) (Asanomi in sod., 2011; Wirth, 2013).

Mikroreaktorska tehnologija združuje naravoslovne znanosti in inženirstvo. Zato gre za področje, ki privlači raziskovalce iz različnih področij znanosti, kar je vodilo do nastanka zelo različnih mikroreaktorjev (Miyazaki in Maeda, 2006; Asanomi in sod., 2011). Običajno so mikroreaktorji v obliki mikrokkanalov ali miniaturiziranih cevk. Pogosti so tudi mikroreaktorji v obliki miniaturiziranih vdolbinic, po zasnovi podobni mikrotitrskim ploščam in omogočajo volumne od nekaj nL do nekaj μ L. Še manjši volumni so mogoči pri uporabi mikro in nano kapljic, ki prav tako predstavljajo mikroreaktorje (Agresti in sod., 2010; Asanomi in sod., 2011). Izdelani so lahko iz različnih materialov, med katerimi za laboratorijsko rabo prednjačita silicij in steklo. Za industrijsko uporabo je najpogostejše izbran material za izdelavo mikroreaktorjev nerjavno jeklo. Za izvajanje bioloških raziskav je najprimernejši material polidimetilsiloksan (PDMS), ki je prepusten za pline. Veliko obetajo mikrokkanali, izdelani iz perfluoroalkoksija (PFA), saj so odporni na mnoge različne reagente, primerni za večkratno uporabo in obenem poceni. Funkcionalizacija PFA mikrokkanalov s 3-aminopropilttriethoksilanom (ATPES) in glutaraldehidom omogoča hitro pripravo mikrobioreaktorja z imobiliziranimi celicami na stenah mikrokkanala (Wirth, 2013; Stojkovič in sod., 2014).

Ob omenjenih se kot materiali za izdelavo mikroreaktorjev vpeljujejo različni polimeri, ki omogočajo cenovno ugodno izdelavo mikroreaktorjev za enkratno uporabo (Bolivar in sod., 2011; Asanomi in sod., 2011).

Mikroreaktorji so zelo primerni za proizvodnjo snovi z visoko dodano vrednostjo, ki jih proizvajamo v relativno majhnih količinah. Omogočajo postavitev manjših obratov, ki imajo posledično tudi manjši negativni vpliv na okolje. Pomanjkljivost takšnih obratov je, da je njihova postavitev pogosto dražja od konvencionalnih obratov, kar lahko kljub naštetim

prednostim dvigne ceno končnega produkta. Zato je smiselnost vpeljevanja mikroprocesne tehnologije odvisna od posamezne reakcije in vrednosti produkta (Bolivar in sod., 2011).

Dolgoročni cilj mnogih raziskovalnih centrov in podjetij je, da proizvodnjo snovi v mikroreaktorjih prenesejo na industrijsko raven. Med glavna podjetja in institucije, ki razvijajo mikroreaktorske sisteme, sodijo Corning (ZDA), Forschungszentrum Karlsruhe (Nemčija), Alfa Laval (Švedska), Fraunhofer ICT-IMM (Nemčija), Ehrfeld Mikrotechnik (Nemčija), Syrris (Združeno kraljestvo), Micronit (Nizozemska), Dolomite (Združeno kraljestvo) in drugi (Roberberge in sod., 2009).

2.1.1 Proizvodnja snovi v mikroreaktorjih

Visoko razmerje med površino in volumnom, laminarni tok tekočin in povečanje zmogljivosti s povečanjem števila osnovnih enot, predstavljajo bistveno razliko v primerjavi s konvencionalnim načinom proizvodnje snovi. Pogoji v reaktorju so homogeni in dobro definirani, zato lahko dogajanje v sistemu tudi dobro matematično opišemo in napovemo (Zhang in sod., 2007; Žnidaršič-Plazl in Plazl, 2007, 2009).

Reakcije je tudi v mikroreaktorjih, tako kot pri reaktorjih običajnih dimenzij, mogoče voditi šaržno ali pretočno. Slednji proces odlikujejo večja produktivnost, hitrost reakcij in višji donosi. Ob tem je potrebno upoštevati manjšo fleksibilnost pretočnih sistemov, saj je reaktorski sistem kompleksnejši in zato težje prilagodljiv novemu proizvodu. Mikroreaktorska tehnologija je zato posebej primerna za procese, kjer je potrebna stalna prilagodljivost novemu proizvodu, saj omogoča enostavno spreminjanje konfiguracije sistema in s tem prilagoditev za pretočno sintezo različnih snovi zaporedno (Wirth, 2013; Roberge in sod., 2005).

2.1.2 Druge možnosti uporabe mikroreaktorjev

Hiter napredek na področjih systemske biologije in sorodnih znanosti, postavlja analitske tehnologije pred vedno nove izzive in zahteva stalne izboljšave (Krenkova in Foret, 2004). Velike količine vzporednih reakcij in nadzor različnih parametrov za pridobivanje sprotnih podatkov, žene biološke znanosti v stalni razvoj in nova odkritja. Miniaturizacija naprav se je izkazala kot učinkovit pristop k doseganju višje resolucije in občutljivosti analiz, zmanjšanju porabe dragih reagentov in posledično večji učinkovitosti za nižjo ceno (Agresti in sod., 2009; Stojkovč, 2013). Agresti in sod. poročajo o raziskavi evolucijske mutageneze, v kateri so z uporabo mikrofluidne tehnologije nadzor mutiranih encimov izvedli 1000-krat hitreje, kot je to mogoče s konvencionalnimi metodami, ob enem pa podali 1 000 000-krat nižjo oceno stroškov procesa.

Nekateri mikrofluidni sistemi so zaradi sposobnosti hitrih in stroškovno ugodnih analiz že implementirani v komercialno uporabo, na trgu so tako uspešno uveljavljeni osebni merilci glukoze in naprava za klinično analizo ionov (Abbott point of care, 2016; Krenkova in Foret, 2004). Kljub temu, da je komercialna uporaba biosenzorjev z aplicirano mikrofluidno tehnologijo najbolj razvita na področju medicine, so vzpodbudne tudi raziskave s področja analitike živil, kjer se prav tako išče nove rešitve v konstrukciji učinkovitih, mikrofluidnih naprav, z visoko zmožnostjo analitike (Atalay in sod., 2011).

Mikrofluidne naprave se uporablja tudi za gojenje celic. Primer takšnega sistema sta mikropetrijevka in miniaturiziran bioreaktor, ki omogoča gojenje več različnih mikroorganizmov. Kompleksnejše mikrofluidne naprave omogočajo natančen nadzor parametrov, pomembnih za rast celic in istočasno spremljanje dogajanja v mikroreaktorju s številnimi integriranimi senzorji (Žnidaršič Plazl in Plazl, 2011; Wirth, 2013).

Chen in sod. (2008) so za gojenje rekombinantnih celic ovarijev kitajskega hrčka (CHO) uporabili mikrotitrsko ploščo. Tekom rasti celic so ob podpori mikrofluidne tehnologije na ne-invaziven način on-line spremljali procesne parametre, kot so pH, raztopljeni kisik (DO) in temperatura posamezne luknjice. Majhne dimenzije omogočajo preučevanje posameznih celic in celičnih kultur, ki jih lahko izpostavimo zelo dobro definiranim razmeram. Tako lahko razvijamo nove pristope k študiju fiziologije mikroorganizmov.

Mikrofluidika se je izkazala za dobro orodje pri raziskavi kemotakse sesalskih celic, saj lahko vzpostavimo dobro definiran kemijski gradient in ob tem z naprednim optičnim sistemom spremljamo odziv celic (Kim in sod., 2012).

Mikrofluidna tehnologija je pomembna tudi v biokemijskih in molekularno-bioloških raziskavah, med katere sodijo verižna reakcija s polimerazo (PCR), kloniranje, *in vitro* sinteza proteinov in nukleinskih kislin, ter različni presejalni testi (Žnidaršič Plazl in Plazl, 2011).

2.2 ENCIMSKO KATALIZIRANE REAKCIJE

Encimi so naravni katalizatorji, ki katalizirajo reakcije v vseh živih organizmih (Min in Yoo, 2014). V primerjavi s kemijsko sintezo, nam biokatalizirane reakcije ponujajo nekatere pomembne prednosti, predvsem specifičnost, stereoselektivnost, izvajanje reakcij v blagih pogojih in večjo ekološko sprejemljivost takih procesov. Kljub temu je v komercialni uporabi le malo encimsko kataliziranih reakcij, saj težavo predstavljata predvsem stabilnost in visoki stroški encimov (Asanomi in sod., 2011; Min in Yoo, 2014).

Biokataliza ponuja impresivne spremembe hitrosti kemijskih reakcij, saj se z uporabo encimov kot biokatalizatorjev le-ta poveča za faktor 10^8 ali celo do 10^{20} v primerjavi s spontano reakcijo. Za izvedbo biokatalitske reakcije se mora substrat pravilno vezati na encim, s čimer pride do znižanja aktivacijske energije. Strukturno so encimi polimeri amino

kislin z edinstveno primarno, sekundarno, terciarno in v primerih oligomernih proteinov tudi kvartarno strukturo, ob tem pa mnogi za pravilno delovanje potrebujejo tudi ne-proteinske molekule, ki sodelujejo pri katalitski reakciji. Slednje delimo na dve kategoriji, in sicer na prostetične skupine, ki so trdno vezane na proteinski del encima in kofaktorje, ki so šibkeje vezani na proteinski del encima (Madigan in sod., 2000).

Kot biokatalizatorje lahko uporabljamo izolirane encime, celične lizate ali celotne celice. Uporaba celotnih celic je smiselna, ker bistveno zmanjša stroške izolacije in čiščenja katalizatorja, poleg tega pa celice tudi same reciklirajo kofaktorje, ki lahko v encimsko kataliziranih reakcijah predstavljajo velik strošek. Ob tem je potrebno biti pozoren na nižjo specifično aktivnost in omejen prenos snovi v celico in iz nje. Problem lahko rešimo z gensko modifikacijo organizma, s katero lahko želene encime heterologno izrazimo kot zunajcelične produkte. Prenos snovi v celico in iz nje lahko povečamo tudi s permeabilizacijo, kjer lahko z različnimi metodami, kot so sušenje, zamrzovanje, mehanske ali električne sile, ali uporaba površinsko aktivnih snovi in organskih topil, ki deloma razgradijo celično membrano, ustvarimo pore na membrani in povečamo njeno permeabilnost. Slabost takšnega postopka je seveda negativen vpliv na celice, ki v večji meri izgubijo sposobnost regeneracije kofaktorjev ali sinteze encimov. Kljub temu je lahko stabilnost v takšnih sistemih večja kakor pri izoliranih encimih, saj encimi ostanejo delno zaščiteni pred zunanjimi vplivi (Kaur in sod. 2009; Vrsalović Presečki in sod., 2009).

Tako v konvencionalnih sistemih, kakor tudi v mikroreaktorjih, je smiselna imobilizacija katalizatorja. Imobilizirane katalizatorje lahko vnovično uporabljamo, so preprostejši za rokovanje in omogočajo postavitev enostavnejših zaključnih procesov. Posledično so tudi stroški proizvodnje nižji, saj, posebej v farmacevtski industriji, zaključni procesi predstavljajo velik del stroškov proizvodnje. Kadar so v procesu uporabljeni encimi in ne celotne celice, je razlog za smotrnost imobilizacije tudi želja po izboljšani stabilnosti in ugodno spremenjeni selektivnosti encima. Posebej pri reakcijah z organskimi topili pride stabilnost encima najbolj do izraza, poleg tega pa so imobilizirani encimi tudi bolj dostopni substratu, kakor če jih v reakcijo dodajamo v obliki liofilizata. Prav tako je z imobilizacijo encimov olajšana izvedba večstopenjskih reakcij (Min in Yoo, 2014).

2.2.1 L-jabolčna kislina

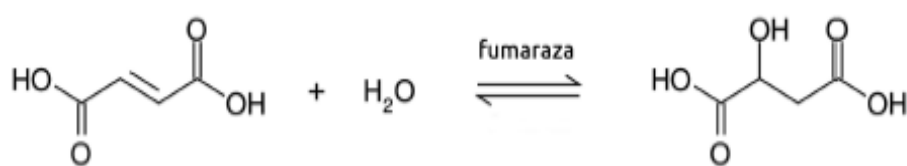
Jabolčna kislina je dikarboksilna organska kislina, z molekulsko formulo $C_4H_6O_5$. V naravi se pojavlja v obliki L-jabolčne kisline, medtem ko se D-jabolčna kislina pridobiva le sintetično. L-jabolčna kislina ima širok spekter uporabe in velja za drugo najbolj uporabljeno snov za uravnavanje kislosti v živilski industriji. Poleg tega je pomembna tudi v farmacevtski industriji in medicini, kjer se uporablja za zdravljenje jeter in vzdrževanje koncentracije amoniaka v krvi (Vrsalović Presečki, 2009). V primeru, da bi se cena L-jabolčne kisline znižala, bi se lahko njena uporaba razširila na uporabo kot izhodno

kemikalijo za proizvodnjo več različnih kompleksnejših snovi, kar bi po podatkih Sauer-ja in sod. (2008) potrebo po tej snovi dvignilo iz sedanjih 100 000 ton na več kot 200 000 ton. Trenutno jo v industriji pridobivajo iz maleinske in fumarne kisline, katere pridobivajo v več korakih iz nafte. Sinteza poteka z adicijo vode na dvojno vez fumarne kisline. Za doseganje potrebnih izkoristkov je potrebna uporaba katalizatorja, pri čemer je pogosto uporabljena žveplova kislina, za učinkovite so se pokazali tudi različni kovinski katalizatorji, kot so hidroksidi aluminija in kroma. Za sintezo jabolčne kisline potrebujemo visok tlak in temperaturo. Produkt takšne kemijske reakcije je racemna mešanica (Vrsalović Presečki, 2009; Ramsey in Schultz, 1991).

2.2.1.1 Biokatalitska sinteza L-jabolčne kisline

Biotehnologija nudi alternativo industrijsko najpogosteje uporabljeni metodi sinteze L-jabolčne kisline, ki omogoča cenejšo in okoljsko sprejemljivejšo sintezo. Enantiomerno čista L-jabolčna kislina je v tem primeru produkt reakcije, ki jo katalizirajo vse vrste organizmov, med katerimi so industrijsko najprimernejše vrste mikroorganizmov *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum* in *Saccharomyces cerevisiae* (Liese in sod., 2000). Ekonomsko zanimiva bi lahko bila tudi proizvodnja L-jabolčne kisline s fermentacijo z glivami iz rodu *Aspergillus* (Goldberg in sod., 2006). Biosinteza L-jabolčne kisline sicer poteka v vseh živih bitjih.

V vseh organizmih proces sinteze L-jabolčne kisline poteka s pretvorbo fumarne kisline, katalizirane s pomočjo fumaraze, ki sodi med liaze (Vrsalović Presečki, 2009) (Slika 1).

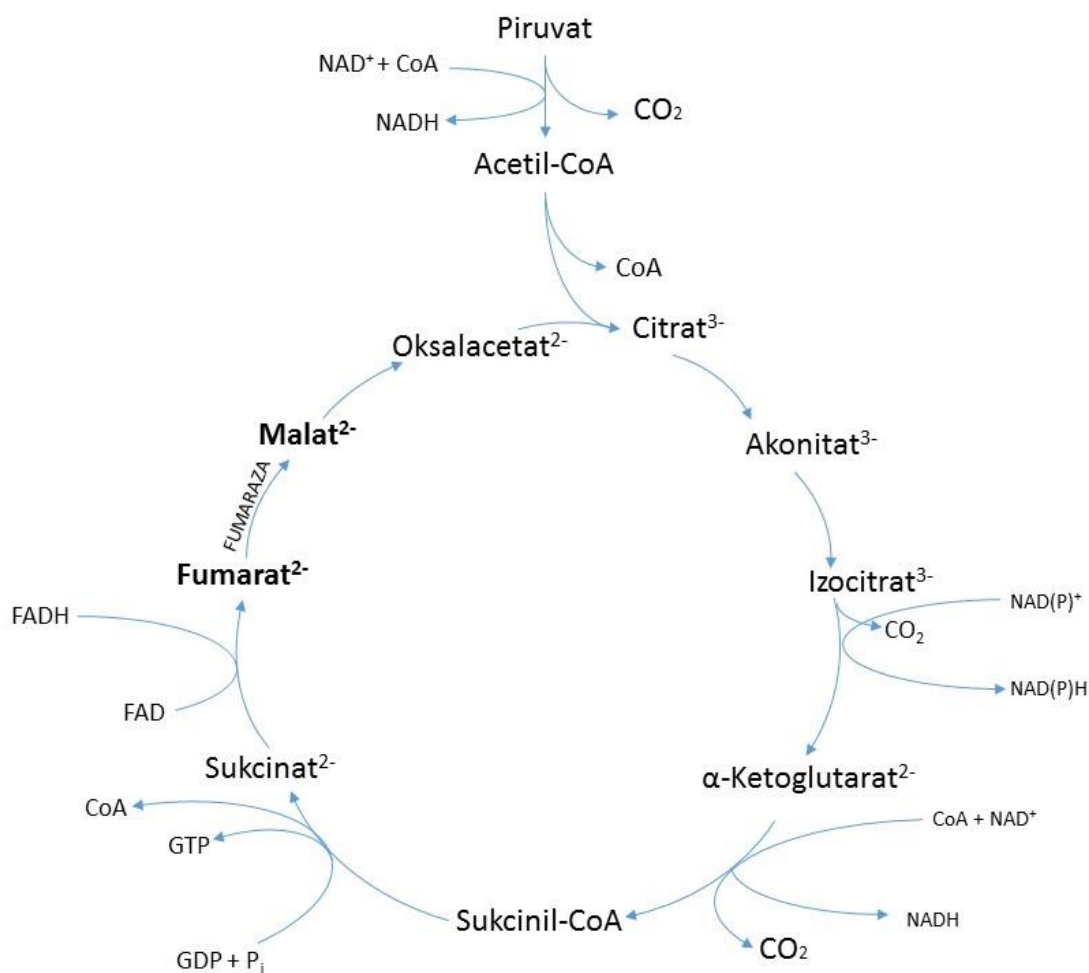


Slika 1: Shema reakcije hidracije fumarne kisline v L-jabolčno kislino ob katalizi s fumarazo.

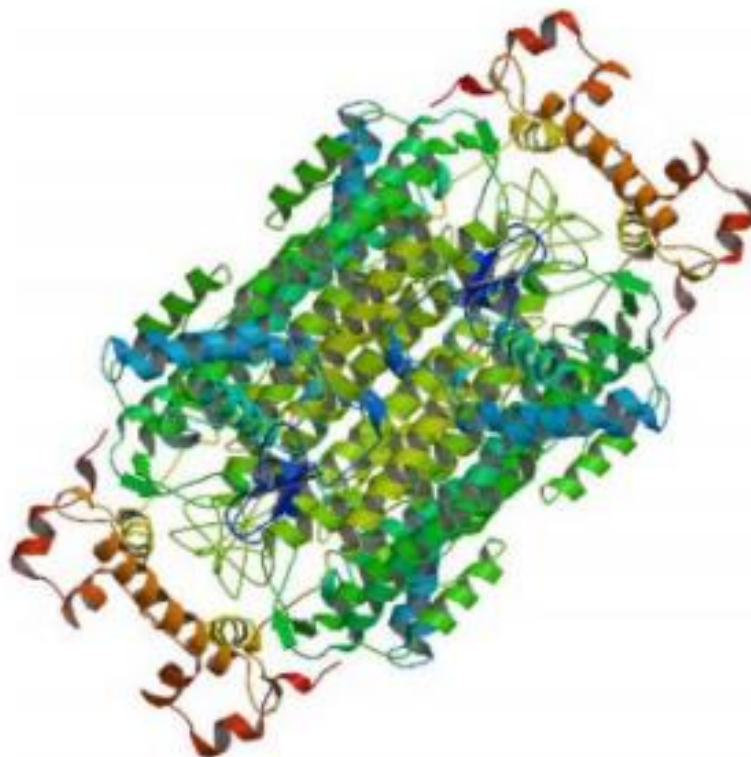
2.2.1.2 Fumaraza

Encim fumaraza sta odkrila Batteli in Stern, leta 1911. Nahaja se v različnih tkivih in celicah v vseh živih organizmih in ima vlogo katalizatorja v biokemičnem procesu Krebsovega ciklusa (Slika 2). V prokariotskih organizmih so fumaraze locirane v citoplazmi, pri evkariontih jih v največji količini najdemo v mitohondriju, čeprav so prisotne tudi v

citoplazmi celic. Prva 3-D struktura fumaraze je bila odkrita leta 1952, ko je Massay kristaliziral fumarazo iz srčne mišice prašiča (Kithara in sod., 1960; Sacchetini in sod., 1986) (Slika 3).



Slika 2: Shema Krebsovega ciklusa, v kateri je predstavljena pretvorba fumarata²⁻ v malat²⁻



Slika 3: 3-D struktura fumaraze. (RCSB PDB, 2016)

Fumaraza je 194 kDa velik homotetrameren encim, ki spada v skupino liaz. Katalizira reverzibilno, stereospecifično hidratacijo fumarne kisline, pri kateri nastane enantiomerno čisti produkt (L-jabolčna kislina). Encim optimalno deluje v 0,1 M fosfatnem pufru pri nevtralnem pH in temperaturi 30 °C. V teh pogojih lahko doseže 82 % pretvorbo fumarne v L-jabolčno kislino, saj hkrati poteka tudi povratna reakcija, ki je energetsko manj ugodna (Cernia in sod., 1995).

Mehanizem katalitske reakcije pretvorbe fumarne v L-jabolčno kislino je predstavljen na primeru fumaraze C iz bakterije *Escherichia coli*. Ta katalizira adicijo vode na dvojno vez fumarne kisline, pri čemer imata ključno vlogo dve bazični skupini na encimu, ki omogočata deprotonacijo substrata. V prvi stopnji katalitske pretvorbe se od encima z dvema protoniranimi bazama odcepi proton, kar sproži vezavo s fumarno kislino. Deprotonirana baza postane akceptor protonov, zato se v naslednjem koraku nanjo veže proton iz vode, ostanek (OH⁻) pa napade C2 mesto na fumarni kislini. Dvojna vez se pretvori v enojno in nastane karboanionski intermediat (ACI). Ker le-ta ni stabilen, prva baza donira svoj proton, pri čemer nastane L-jabolčna kislina. V zadnjem koraku se na deprotonirano mesto druge baze veže proton in produkt (L-jabolčna kislina) se odcepi od encima (Weaver in Banaszak, 1996).

Kvasovka vsebuje tako mitohondrijsko, kakor tudi citosolno fumarazo. Obe sta produkt istega FUM1 jedrnega gena, ki je bil prvič odkrit in sekvenciran leta 1987 (Wu in Tzagoloff, 1987). Nahaja se na kromosomu XVI (47336 – 48802) in nosi navodila za 488 aminokislin dolg protein z izoelektrično točko pri 8,40. Kompartimentalizacija encima je določena z N-terminalnim koncem sekvence, konformacijo proteina in s stanjem glioksilatnega toka. Metaboliti glioksilatnega ciklusa namreč delujejo kot nanosenzorji za subcelično fumarazno distribucijo. Regev-Rudzki in sod. (2009) so ugotovili, da delecije genov glioksilatnega ciklusa vplivajo na dvojno porazdelitev fumaraze. Normalna porazdelitev fumaraze znotraj celice se spremeni z delecijo genov, vključenih v glioksilatni cikel. Kadar je v gojišče *S. cerevisiae* dodan sukcinat (produkt glioksilatnega ciklusa), se celice odzovejo z nižjo koncentracijo fumaraze v citosolu, kar direktno nakazuje na vpliv toka glioksilatnega ciklusa na porazdelitev le-te (*Saccharomyces* genome database, 2016). Na podlagi tega je smiselno postaviti hipotezo, da metabolni stres v citosolu evkariontske celice posredno, preko spremenjene akumulacije specifičnih metabolitov, vpliva na porazdelitev mitohondrijskih proteinov med mitohondrijem in citosolom in njihovo sekundarno funkcijo na sekundarni lokaciji (Regav-Rudzki in sod., 2009).

Okrog 80-90 % vse celične fumaraze v kvasovki se nahaja v citosolu (Stein in sod., 1994). Za akumulacijo velikih količin L-jabolčne kisline v kvasovki je odgovorna predvsem citosolna fumaraza (Pines in sod., 1996).

2.3 BIOKATALIZA V MIKROREAKTORJIH

Biokatalitske reakcije omogočajo delo pri nižjih temperaturah, reakcije so počasnejše in posledično transport snovi ni omejujoč dejavnik, zato se mikroreaktorska tehnologija zaradi manjših potreb vpeljuje počasneje. Kljub temu raziskave kažejo, da je z uporabo mikroreaktorjev mogoče doseči znatno večje izkoristke kakor pri konvencionalnih metodah. Predvsem na akademskem nivoju se je začelo vpeljevanje mikroreaktorskih sistemov tudi v biotehnoloških laboratorijih, iz katerih prihaja vedno več objav, ki potrjujejo smotrnost razširitve novih pristopov, predvsem k biokatalizi, na industrijsko raven (Stojkovič in sod., 2014; Wohlgemuth in sod., 2015).

Pohar in sod. (2009) so z uporabo dvo-faznega kontinuirnega mikroreaktorskega sistema pri sintezi izoamil acetata, katalizirani z lipazo, uspeli doseči 3-krat večjo produktivnost v primerjavi s šaržnim procesom. Primer biokatalize s celotnimi celicami v mikroreaktorju navajajo Stojkovič in sod. (2012), ki so kot katalizator v mikrokanalu uporabili kvasovke *S. cerevisiae*. Le-te so imobilizirali na notranjo steno mikrokanala z uporabo silanizacije in kovalentnega pripetja preko glutaraldehida, ter izvedli biotransformacijo fumarne v L-jabolčno kislino. Rezultate produktivnosti so primerjali z rezultati podobnega šaržnega procesa (Vrsalović-Presečki in sod., 2009). Izračunane produktivnosti so bile skoraj 4-krat večje kot v podobnem šaržnem procesu, kljub dejstvu, da so bile koncentracije substrata,

uporabljene v kontinuirno delujočem mikroreaktorju, 10-krat nižje. Čeprav je v določeni meri na tako velike razlike lahko vplivala tudi izbira seva kvasovk, so to izjemno spodbudni rezultati, ki kažejo na smiselnost uporabe mikrofluidike tudi v biološko kataliziranih procesih (Vrsalović-Presečki in sod., 2009)

Mikroreaktorji so zlahka prilagodljivi izvajanemu bioprocesu. Z izbiro najprimernejših materialov se izognemo reakciji površine notranje površine reaktorja z uporabljenimi kemikalijami. Sistem lahko predstavljajo tako preproste kapilare in cevke, kakor tudi posebej izdelani mikrokanali, monoliti ali mikroreaktorji z dodanim različnim nanomaterialom. Glede na potrebe lahko sestavimo različne sisteme kanalov, med katerimi so najpogostejši Y-, ψ -, T- in X-oblike (Wohlgemuth in sod., 2015).

2.3.1 Imobilizacija katalizatorja v mikroreaktorju

Kakor v konvencionalnih sistemih, je imobilizacija smiselna tudi na področju mikrofluidike (Krenkova in Foret, 2004). Med drugim je ena najpomembnejših prednosti imobilizacije katalizatorja dobra ločitev katalizatorja in produkta. Zato je pomembno vlagati v razvoj in izboljšave tehnik imobilizacije, med katerimi so najpogosteje uporabljeni biotin-avidin sistem, 3-aminopropilsilan-glutaraldehyd in metoda ujetja v hidrogel (Stojkovič in sod., 2010).

2.3.1.1 Imobilizacija encimov

Encimi so v splošnem najučinkovitejši v blagih pogojih in so visoko selektivni, vendar njihova stabilnost med shrambo in v raztopini naglo pada. Poleg predhodno omenjenih razlogov je imobilizacija encimov smiselna tudi zaradi želje po izboljšani stabilnosti in ugodno spremenjeni selektivnosti encima (Krenkova in Foret, 2004). Posebej je dobrodošla v organskih topilih, kjer je večja stabilnost encima zelo pomembna, ob tem pa so imobilizirani encimi substratu dostopnejši. Poleg tega imobilizacija encima, oziroma celic, doprinese tudi k poenostavitvi procesa in možnosti večkratne uporabe encima. Imobilizacija encima posledično olajša izvedbo in vodenje večstopenjskih reakcij (Min in Yoo, 2014).

Imobilizirani ali enkapsulirani encimi so pogosto uporabljeni v medicinski diagnostiki in terapijah, biosenzorjih, organski sintezi in mnogih drugih aplikacijah, kot so na primer odstranitev odpadnih metabolitov, detoksifikacija krvi, zdravljenje prirojenih metabolnih deficitov, itd. (Krenkova in Foret, 2004).

Obstaja mnogo različnih tehnik imobilizacije, večino od njih lahko apliciramo tudi na mikro nivo. Lastnosti idealne matrice za imobilizacijo encimov naj bi bile visoko razmerje površine in volumna, bile naj bi permeabilne, hidrofilne, netopne, kemijsko, mehnično in termalno

stabilne, sposobne vezave ligandov, visoko rigidne in odporne na prisotnost mikrobov in encimov (Krenkova in Foret, 2004). V grobem lahko postopke imobilizacije razdelimo v tri skupine: (i) imobilizacija na nosilce, (ii) imobilizacija na notranje stene mikrokanala in (iii) imobilizacija v porozni membrani znotraj mikrokanala (Miyazaki in Maeda, 2006).

Najpogosteje so encimi v mikroreaktorjih imobilizirani z vezavo na trdne nosilce. Prednost slednje metode je velika specifična površina in posledično možnost vnosa velike količine katalizatorja v mikroreaktor, ob enem pa je zaradi mehanske ločitve omogočeno večkratno recikliranje encimov in enostavno čiščenje produkta (Min in Yoo, 2014). Materiali teh nosilcev so lahko različni in zato je tudi postopek imobilizacije različen. Nosilci so lahko steklene kroglice, prah aluminijevega oksida in drugi materiali, najpogosteje uporabljeni pa so sintetični organski polimeri (na primer Eupergit). Nosilci so lahko med drugim tudi magnetni, kar omogoča še lažje rokovanje z njimi. Uporaba nosilcev je mogoča tudi v mikroreaktorjih, kateri so sicer zgrajeni iz materialov, ki iz različnih razlogov niso najprimernejši za neposredno imobilizacijo na notranjo površino. Ker lahko predhodno obdelavo in pritrditev encimov izvajamo tudi izven mikroreaktorja, ni potrebno paziti na kompatibilnost postopka z mikroreaktorjem. S preprostim dodajanjem nosilcev, ki imajo različne pritrjene encime, lahko enostavno sestavljamo večstopenjske reakcije (Asanomi in sod., 2011). Imobilizacijo na magnetne mikrodlece, pridobljene iz silikagela, so v mikrokanalu izvedli Nomura in sod. (2004). Metoda se je izkazala za uspešno in perspektivno. Prav tako o uspešni imobilizaciji z uporabo magnetnih delcev poročajo Li in sod. (2006). Konstruirali so mikročip, namenjen razgradnji encimov, ki zaradi obnovljivosti in možnosti hitre zamenjave različnih proteaz veliko obljublja za razvoj novih tehnik na področju proteomike.

Slabosti takega sistema so velik padec tlaka zaradi velike količine delcev v mikroreaktorju in otežena napoved, ter nadzor tokovnega režima, kar lahko privede do nastanka gradientov in posledično neidealnih razmer za potek reakcije. Slednje pride posebej do izraza pri uporabi večfaznih tokov (Bolivar in sod., 2011).

Vezava encima v mikroreaktorju je mogoča tudi s pomočjo monolitov, vendar s tem ostane problem padca tlaka. Prav tako se uporabljajo hidrogeli, v katere se ujamejo encimi, kateri so zaradi velike ovire za transport snovi primerni predvsem za analitske aplikacije (Asanomi in sod., 2011).

Omenjenim težavam se izognemo z vezavo encimov neposredno na površino notranje stene kanala mikroreaktorja. Porast tlaka namreč v takih sistemih ni težava, tokovni režim je precej bolje definiran. Potrebno je biti pozoren na kompatibilnost materialov.

V obeh primerih lahko encime na površino vežemo kovalentno ali nekovalentno (Asanomi in sod., 2011).

– Kovalentna vezava encimov

Največkrat raziskana in uporabljena imobilizacijska tehnika temelji na kovalentni vezavi encima na nosilec ali notranjo steno kanala. Proteini običajno vsebujejo mnogo potencialnih vezavnih mest, med najpogostejše funkcionalne skupine za kovalentno vezavo sodijo (i) α -amino skupine na verigi in ϵ -amino skupne lizina in arginina, (ii) karboksilne skupine, (iii) fenolni obroč tirozina, (iv) tiolna skupina cisteina, (v) hidroksilna skupina serina in treonina, (vi) imidazolna skupina histidina in (vii) indolna skupina triptofana. Da preprečimo zmanjšanje aktivnosti imobiliziranega encima, moramo poskrbeti, da se funkcionalna skupina, ki je vključena v kovalentno vezavo, ne nahaja na aktivnem mestu encima. Ker se funkcionalne skupine za vezavo na nosilec velikokrat nahajajo tudi na aktivnem mestu, lahko težavo rešimo z imobilizacijo v prisotnosti substrata, ali kompetitivnega inhibitorja uporabljenega encima (Krenkova in Foret, 2004; Asanomi in sod., 2011).

Pogosto uporabljeni tehniki sta funkcionalizacija površin s silanizacijo in polimerne "krtačke". V primeru slednjih encim na površino pritrdimo preko vzporedno orientiranih linearnih polimerov, ki so pritrdjeni pravokotno na površino (Asanomi in sod., 2011).

– Nekovalentna vezava encimov

Nekovalentna imobilizacija običajno temelji na ionskih interakcijah, vodikovih vezeh, van der Waalsovih vezeh, hidrofobnih interakcijah, itd. Ker ne vključuje reaktivnih skupin, konformacija proteina v tem primeru ostane nespremenjena, zato je tudi vpliv na aktivnost encima manjši. Vendar je manjši tudi pozitiven učinek na podaljšano stabilnost encima (Krenkova in Foret, 2004).

Najpogosteje uporabljen sistem za nekovalentno vezavo je obdelava encima z biotinom, kateri se potem nekovalentno veže na površino s pritrjenim avidinom, oziroma streptavidinom. Pri tem je potrebno vedeti, da gre za vezavo, ki ni dovolj stabilna za dolgo uporabo (Miyazaki in Maeda, 2006; Asanomi in sod., 2011).

Obstajajo tudi načini fizikalne pritrditve encimov na površino. Uporabimo lahko metodo stisnjenega CO₂, ki z rahljanjem površine polimera omogoči prehod encima vanjo. Po odstranitvi CO₂ se površina vrne v normalno in tako zadrži encim (Ellis in sod., 2008).

2.3.1.2 Imobilizacija encimov z magnetnimi nanodelci

Nanodelci (ang. nanoparticles) so definirani kot delci, katerih vsaj ena geometrijska razdalja ne presega 100 nm in imajo zaradi svoje majhnosti posebne lastnosti in obnašanje. Nanodelci so lahko tudi naravnega izvora. V tem primeru se imenujejo naravni ali geogeni NP, znani so tudi pod imenom koloidi. Zaradi magnetnih lastnosti je posebna pozornost usmerjena na delce železovega oksida, ki so že vpeljani v uporabo v različnih bioloških procesih za lažje

ločevanje, pri DNA detekciji, slikanje z magnetno resonanco, ciljani dostavi zdravil v organizmu... Nanotehnologija je zaradi razsežnosti možnih aplikacij in predvidenega nadaljnega razvoja že danes večkrat imenovana kot ključna tehnologija enaindvajsetega stoletja (Schwegmann in sod., 2010).

V preteklih letih je naraslo zanimanje za uporabo magnetnih nanodelcev (ang. magnetic nanoparticles ali MNP's), saj jih odlikujejo široka uporabnost, biokompatibilnost, majhnost in nizka toksičnost. Opišemo jih lahko kot superparamagnetne delce, saj združujejo nekatere lastnosti, kot so omejene dimenzije, eno-komponentnost in disperzija v ne-magnetnem mediju. Izjemno dobrodošla lastnost imobilizacije na podlagi magnetizma je lahko ločevanje od ostalih komponent z uporabo magneta, kar zniža stroške in zmanjša zahtevnost procesa. Šalić in sod. (2013) so postavili biokatalitski mikroreaktor za oksidacijo nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrida (NADH), v katerem so encim alkohol-dehidrogenaza (ADH) znotraj mikroreaktorja imobilizirali z magnetnim poljem z uporabo MNP-jev (železov oksid). V mikroreaktorju z nihajočim magnetnim poljem jim je pri zadrževalnem času 2 min uspelo doseči 100 % konverzije.

2.3.1.3 Imobilizacija celotnih celic

Prednosti imobilizacije celic so enostavno ločevanje od katalizatorja, stabilizacija in zaščita pred strižnimi silami, lahko pa vpliva tudi na morfologijo, katera je včasih bistvena za učinkovitost procesa. Ločimo več metod imobilizacije celotnih celic (Andrade in sod., 2014):

- pritrditev na površino (adsorpcija, kovalentna vezava),
- zamreženje v matriks,
- inkapsuliranje,
- prečno povezovanje,
- zadrževanje za oviro,
- agregacija,
- uporaba optične pincete,
- magnetizem.

Eden izmed redkih primerov uporabe celic kot katalizatorja za sintezo snovi, so opisali Akay in sod. (2005), kjer so bakterijske celice *Pseudomonas syringae* pritrdili v monolitni mikroreaktor. Pri tem so opazili intenzifikacijo procesa v primerjavi s konvencionalnimi sistemi. Imobilizacijo celotnih celic so v mikrosistemu izvedli tudi Andrade in sod. (2014), ki so celice *E. coli* s prekomerno izraženo (R)-selektivno ω -transaminazo imobilizirali na metakrilatne kroglice, primerne za uporabo v kontinuirnih sistemih. Postavljeni proces, ki je

omogočal visoke izkoristke in sintezo produktov brez potrebe po dodatnem čiščenju, je lahko deloval kontinuirno do deset dni.

2.3.1.4 Imobilizacija celotnih celic na podlagi magnetizma

V naravi že obstajajo tako imenovane magnetotaktične bakterije, ki se gibljejo pod vplivom geomagnetnega polja. Ta sposobnost izhaja iz specializiranih znotrajceličnih magnetnih organelov, imenovanih magnetosomi, ki imajo membransko vezane kristalne mineralne delce (Fe_3O_4 ali Fe_3S_4), velikostnega razreda nekaj nanometrov. Nastanek magnetosoma je povezan s postopkom procesa mineralizacije pri biološki kontroli akumulacije železa in depozicije mineralnih delcev specifične velikosti in orientacije znotraj membranskega vezikla na določeni lokaciji znotraj celice. Z izjemo magnetotaktičnih bakterij, ki vsebujejo magnetosome (znotrajcelične magnetne organele), je potrebno celice, da postanejo odzivne na magnetno polje, predhodno obdati z magnetnim materialom. Ta je lahko v obliki delcev ali nanodelcev maghemita, magnetita ali ferita, ki se na celice vežejo posredno z uporabo protiteles (specifična vezava) ali kovalentno. Drugi možni pristopi priprave celic, ki se odzivajo na magnetno polje, so zamreženje v biokompatibilne polimere v prisotnosti magnetnih delcev, ali vezava paramagnetnih kationov na površini prisotne kislinске skupine (Schüller in Frankel, 1999; Yi in sod., 2006; Matsunaga in sod., 2007).

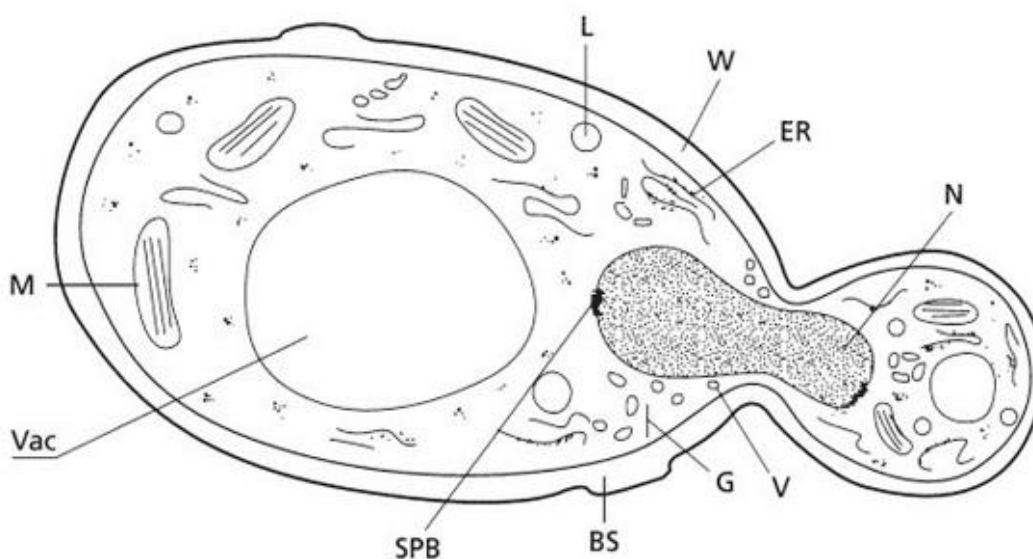
Metoda imobilizacije celic z magnetizmom je najpogosteje uporabljena za sortiranje in koncentriranje posameznih tipov celic, prisotna je tudi v razvoju biosenzorjev, bioabsorbentov, v tkivnem inženiringu in kot imobilizacijska metoda za biotransformacije. Po poročanju Yi in sod. (2006) je uporaba magnetnih nanodelcev neinvazivna za celice in ne vpliva na celični metabolizem.

2.4 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasovke so enocelični mikroorganizmi, ki jih uvrščamo med glive. Celice so ovalne oblike in velike nekaj mikrometrov (okrog $5\ \mu\text{m}$). V 1g kvasa je ekvivalentno približno 20 bilijonov celic. Človek je kvas uporabljal še preden je znal pisati, saj hieroglifi pričajo, da so jih za pripravo kruha izkoriščali že stari Egipčani pred 5 000 leti. Leta 1857 so kvasovke prvič identificirali pod mikroskopom (Deacon, 2006; National center for biotechnology information, 2016). Zaradi svoje nepatogenosti se pogosto uporabljajo v živilski industriji, saj so splošno znane kot tako imenovani GRAS organizem (splošno priznane kot varne; ang. Generally Recognised As Safe) (Ostergaard in sod., 2000).

Kot enocelični evkariont je kvasovka idealen organizem za laboratorijsko delo, saj ga enostavno gojimo na agarju. Zaradi kratkega časa podvojevanja (90 min) lahko v tekočem gojišču vzgojimo velike količine celic (Griffiths in sod., 2005). Kvasovke so enocelične

askomicetne ali bazidiomicetne glive, ki se nespolno razmnožujejo z brstenjem ali delitvijo, pri spolnem razmnoževanju pa ne tvorijo večceličnih tvorb. Taksonomsko je kvasovka *S. cerevisiae* umeščena med askomicete, družino Saccharomycetaceae, poddružino Saccharomycetoideae, rod *Saccharomyces* (Griffiths in sod., 2005). Z razgradnjo hranil pridobivajo energijo in osnovne gradnike za rast in razmnoževanje. Kot produkt presnove v okolje izločajo etanol in CO₂ (alkoholna fermentacija). Celica kvasovk ima tipične lastnosti evkariontske celice z enim jedrom in značilnimi organeli, vključno z eno veliko vakulo in nekaj lipidnimi telesci (Slika 4) (Deacon, 2006).



Slika 4: Zgradba celice kvasovke *S. cerevisiae*. BS - brstna brazgotina (ang. Bud Scar); ER - endoplazmatski retikulum; G - Golgijev aparat. L - lipidno telesce; M - mitohondrij; N- nukleus; SPB - delitveno vreteno (ang. Spindle Pool Body); V - vezikel; Vac – velika centralna vakuola; W – celična stena (ang. Wall) (Deacon, 2006).

Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* so med najbolj intenzivno proučevanimi enoceličnimi evkariontskimi organizmi na področju molekularne in celične biologije. Glavni razlog za to je v tem, da je njihova celična struktura in funkcijska organizacija zelo podobna celicam višjih organizacijskih nivojev (Deacon, 2006). Genom *S. cerevisiae* je obsega približno 12 000 000 bp in je organiziran v 16 kromosomov (National center for biotechnology information, 2016).

2.4.1 Površinske lastnosti *Saccharomyces cerevisiae*

Celice *S. cerevisiae* se uporabljajo v mnogih biotehnoloških procesih, med katerimi so najpomembnejši pekovska industrija, pivovarska industrija, vinarska industrija... Za

učinkovito uporabo le-teh je pomembno poznati njihove površinske lastnosti, na podlagi katerih lahko napovemo interakcije z drugimi molekulami. Večina celic mikroorganizmov je negativno nabita, kar se obrne v kislem okolju, kjer pride do protonacije amino skupin. Obenem je znano, da v nekaterih primerih celični naboj ostane nespremenjen tudi v gojiščih z različnimi pH vrednostmi. Na podlagi elektrokinetičnih študij, omočenosti celične površine in porazdelitve celic kvasovk med vodno in organsko fazo, je mogoče razbrati, da kljub splošni hidrofilnosti površine, lahko porazdelitev celic kvasovk med fazama variira gleda na lastnosti organske faze in hidrofobno-hidrofilnega razmerja obeh faz. Nabitost celične površine je rezultat kombinacije hidrofobnih in hidrofilnih domen, katere lahko spremenijo svojo velikost in obliko pod vplivom okolja. Splošno so hidrofilne domene prisotne predvsem na predelu kontakta z vodno in hidrofobne predvsem na predelu kontakta z organsko fazo (Tazhibaeva in sod., 2003).

Celična stena kvasovk je zgrajena iz štirih razredov makromolekul: visoko glikoziliranih glikoproteinov (»manoproteini«), dveh tipov β -glukanov in hitina. Kompozicija se spreminja z rastjo celic in z danimi pogoji, saj je biosinteza posameznih komponent odvisna tako od časa, kakor tudi okolja. Celično membrano celic kvasovk, podobno kot ostale biološke membrane, sestavljajo lipidna dvoplast in proteini. Najpogosteje zastopani lipidi so fosfolipidi in steroli. Tudi membrana se, podobno kot celična stena, strukturno in funkcionalno spreminja s spreminjanjem pogojev rasti (Feldmann, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

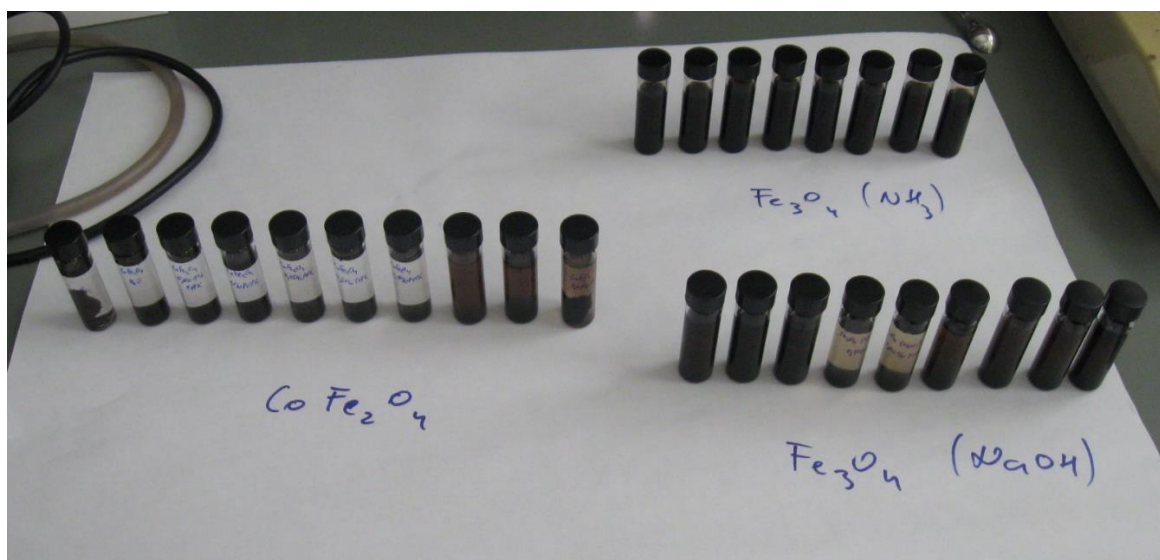
3.1 MIKROORGANIZEM IN GOJIŠČE

V študiji smo uporabljali kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* MZKI K86 (pekovska kvasovka iz Pivovarne Union, Ljubljana). Celice smo preko noči gojili v tekočem gojišču na stresalniku pri 150 obr. min⁻¹ in pri temperaturi 30 °C. Uporabili smo 500 mL erlenmajerice s 100 mL gojišča. Gojišče smo pripravili iz sestavin: kvasni ekstrakt (10 g L⁻¹, Biolife, Italija), pepton (20 g L⁻¹, Biolife, Italija) in saharoza (20 g L⁻¹, Merck, Nemčija).

Po preteku približno 18 h smo celice očistili gojišča s centrifugiranjem pri 3000 obr. min⁻¹ (3 min). Pelet smo dvakrat sprali z vodo in ponovili postopek centrifugiranja. Potem smo celice resuspendirali v manjši količini demineralizirane vode, tako da smo dobili končno koncentracijo 10⁹ celic mL⁻¹. S tako pripravljeno suspenzijo celic smo še isti dan izvedli imobilizacijo.

3.2 IZBIRA IN KARAKTERIZACIJA NANODELCEV

V sodelovanju s prof. dr. Marjanom Marinškom s Katedre za anorgansko kemijsko tehnologijo in materiale Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo smo pridobili 21 vzorcev magnetnih nanodelcev (Slika 5). Glede na kemijsko sestavo smo testirali dve skupini nanodelcev, in sicer Fe₃O₄ in CoFe₂O₄, pri čemer so bili magnetitni (Fe₃O₄) nanodelci obarjani v 1 M vodni raztopini NH₃ ali v 1,3 M vodni raztopini NaOH. Delci so bili redispergirani v vodnih raztopinah z različno koncentracijo polivinilpirolidona (PVP), en vzorec nanodelcev CoFe₂O₄ pa v *n*-dekanu.



Slika 5: Vzorci nanodelcev, uporabljenih v eksperimentu.

3.2.1 Določanje porazdelitve velikosti nanodelcev

Velikost nanodelcev smo določili v sodelovanju s prof. dr. Marjanom Marinškom iz Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo (Katedra za anorgansko kemijsko tehnologijo in materiale) na Zeiss UltraPlus FE-SEM mikroskopu, opremljenim s STEM detektorjem. Vzorce smo pripravili z odlaganjem suspenzij na z ogljikom obdana bakrena omrežja. Kvantitativno analizo slike smo opravili s programom za analizo slik ZeissKS300 3.0. Za zadoščanje statističnemu zaupanju smo analizirali 5-10 regij za vsak posamezni vzorec.

3.2.2 Določanje lokacije nanodelcev v oziroma na celicah *S. cerevisiae*

Predvideno lokacijo vezave nanodelcev na površino celice smo potrdili s SEM mikroskopijo (slika 8) (Stojkovič in sod., članek v pripravi) in fluorescenčno mikroskopijo (slika 9) (Stojkovič in sod., 2012). Na Zeiss UltraPlus FE-SEM mikroskopu, opremljenim s STEM detektorjem, smo, v sodelovanju s prof. dr. Marjanom Marinškom (Katedra za anorgansko tehnologijo in materiale), kvasovke, ki smo jih kontaktirali z nanodelci, posneli na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, v sodelovanju s prof. dr. Marjanom Marinškom (Katedra za anorgansko tehnologijo in materiale), ter izr. prof. dr. Damjano Drobne in dr. Saro Novak z Biotehniške fakultete. Za fluorescenčno mikroskopijo celic *S. cerevisiae* z nanodelci smo uporabili nanodelce obdelane s fluorescenčnim barvilom iridijev(III) acetil-acetonato-bis(3-(benzotiazol-2-il)-7-(dietilamino)-kumarin ($\text{Ir}(\text{C}_5)_2(\text{acac})$), pridobljenim z Inštitutom za analizo kemijo in kemijo živil Tehniške univerze v Gradcu (Mistlberger in sod., 2010).

3.3 ŠTUDIJ DEJAVNIKOV IMOBILIZACIJE

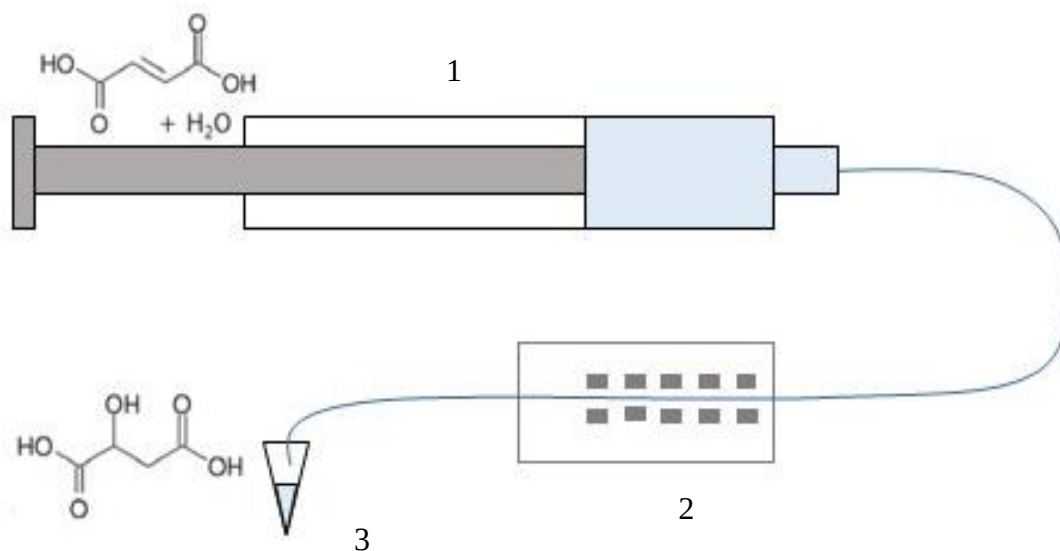
3.3.1 Izbor nanodelcev

Izmed 21 vzorcev magnetnih nanodelcev smo na osnovi sposobnosti zadržanja celic izbrali nanodelce, ki smo jih uporabili v nadaljevanju študije. Poskus smo izvedli v mikrocentrifugirki, tako da smo 50 μL celic *S. cerevisiae* (koncentracija 10^8 celic mL^{-1}) zmešali s 30 μL nanodelcev (koncentracija od 20 do 62 mg mL^{-1}) in z vodno raztopino 10 mM očetne kisline dopolnili do končnega volumna 150 μL in intenzivno pomešali na vrtičniku. Koncentracijo uporabljenih celic smo določili na osnovi merjenja optične gostote.

Suspenzijo celic z nanodelci smo izpostavili magnetnemu polju, tako da smo ji približali neodimski magnet velikosti 5 x 5 x 5 mm. Z nanodelci obdane celice so se zbrale na steni mikrocentrifugirke, kjer je bil magnet. Ko smo odstranili vso tekočino iz mikrocentrifugirke, so na steni, kjer je bil magnet, ostale samo imobilizirane celice. Odlitemu vzorcu smo s štetjem pod mikroskopom določili koncentracijo celic. Glede na znano začetno koncentracijo celic smo izračunali deleže imobiliziranih celic za vsako vrsto nanodelcev. Poskus smo opravili v treh ponovitvah.

3.3.2 Imobilizacija celic v mikrokanalu

Kot mikroreaktor smo uporabili PFA cevke premera 0,5 mm. Celice in reagente smo v mikroreaktor vnašali z injekcijo (Slika 6). Vedno smo uporabljali le sveže vzgojene celice.



Slika 6: Shema aparature: 1 - injekcija za vnašanje vhodne raztopine, oziroma suspenzije celic; 2 - mikrokanal, katerega osrednji del je obdan z magnetki; 3 - mikrocentrifugirka za zbiranje izhodnega vzorca.

Delovni volumen mikroreaktorja je znašal $9,81 \mu\text{L}$, kar obsega 5 cm kanala, obdanega z dvajsetimi neodimskimi magnetki velikosti $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}$ (deset zgoraj in deset spodaj), ki so služili za imobilizacijo z magnetnimi nanodelci obdanih celic (slika 6). Magnete smo kupili v lokalni trgovini. Raztopine smo v mikrokanal injicirali z injekcijskimi črpalkami PHD 4400 Syringe Pump Series (Harvard Apparatus, ZDA).

Za proučevanje imobilizacije v mikrokanalu smo v mikrocentrifugirki pripravili vzorec, ki je vseboval $50 \mu\text{L}$ suspenzije celic kvasovk s koncentracijo $10^9 \text{ celic mL}^{-1}$, $10 \mu\text{L}$ vzorca izbranih nanodelcev in $90 \mu\text{L}$ $0,1 \text{ M}$ citratno fosfatnega pufra pH vrednosti 7. Tako pripravljen vzorec smo 15 min inkubirali, za tem smo v mikrokanal injicirali vzorec tako, da smo napolnili 11 cm kanala, kar je enako volumnu $22,64 \mu\text{L}$. Potem smo mikrokanal izpostavili magnetnemu polju s približanjem neodimskih magnetkov in pričeli s spiranjem z deionizirano vodo in zbiranjem vzorca na iztoku. Po 5 min smo spiranje ustavili, zbranemu izstopnemu vzorcu pa določili koncentracijo spranih celic. Iz pridobljenih podatkov smo izračunali začetno količino celic v mikrokanalu in število spranih celic, s česar smo določili delež imobiliziranih celic pri specifičnih pogojih. Pri spreminjanju pogojev smo vedno spirali z deionizirano vodo do vzpostavitve stacionarnega stanja. Poskus smo opravili v treh ponovitvah.

3.3.2.1 Vpliv časa izpostavitve nanodelcem na učinkovitost imobilizacije

Za študij vpliva časa izpostavitve celic nanodelcem smo izvedli imobilizacijo z nanodelci Fe_3O_4 , koprecipitiranimi z raztopino NH_3 in nato shranjenimi v 0,05 % raztopini PV, koncentracija suspenzije nanodelcev: 26 mg mL^{-1} . V mikrocentrifugirki smo pripravili vzorec, ki je vseboval $50 \mu\text{L}$ suspenzije kvasovk, $90 \mu\text{L}$ 0,1 M citratno fosfatnega pufru (pH vrednosti 7) in $10 \mu\text{L}$ suspenzije nanodelcev. Vzorec smo inkubirali 6, 15 ali 30 min. Za tem smo $22,64 \mu\text{L}$ vzorca injicirali v mikro kanal in vzpostavili magnetno polje s približanjem neodimskih magnetkov. Pričeli smo s spiranjem z deionizirano vodo, ki je trajalo 5 min (pretok $300 \mu\text{L min}^{-1}$), ob tem pa zbirali izhodni vzorec. Po koncu spiranja smo zbranemu izhodnemu vzorcu s štetjem določili število spranih celic, iz česar smo izračunali delež imobiliziranih celic pri različnih časih inkubacije celic in nanodelcev. Poskus smo opravili v eni ponovitvi.

3.3.2.2 Vpliv razmerja med nanodelci in celicami na učinkovitost imobilizacije

Pripravili smo vzorce različnih razmerij med celicami in nanodelci. Uporabljeni nanodelci so bili Fe_3O_4 in koprecipitirani v vodni raztopini NH_3 . Do končnega volumna $150 \mu\text{L}$ smo dopolnili z 0,1 M citratno fosfatnim pufrom z vrednostjo pH 7. Suspenziji kvasovk ($50 \mu\text{L}$) smo dodali od 2 do $50 \mu\text{L}$ suspenzije nanodelcev. Tako pripravljen vzorec smo 15 min inkubirali. Potem smo $22,64 \mu\text{L}$ vzorca (volumen 11 cm mikrokanala) injicirali v mikrokanal. Nato smo mikrokanal izpostavili magnetnemu polju s približanjem neodimskih magnetkov in pričeli s spiranjem z deionizirano vodo in zbiranjem vzorca na iztoku. Celice, ki se kljub vzpostavitvi magnetnega polja niso zadržale v mikrokanalu celice in nanodelce, ki se niso zadržali na celicah, smo spirali s deionizirano vodo pri pretoku $300 \mu\text{L min}^{-1}$ in jih zbrali na iztoku. Vzorcju na iztoku smo določili koncentracijo celic in glede na začetno količino celic v mikrokanalu izračunali odstotek imobiliziranih celic pri uporabi vzorcev z različnimi razmerji med nanodelci in celicami. Poskus smo opravili v treh ponovitvah.

3.3.2.3 Vpliv vrednosti pH pufru na učinkovitost imobilizacije

Vzorec $50 \mu\text{L}$ suspenzije kvasovk s koncentracijo 10^9 celic mL^{-1} smo zmešali z $10 \mu\text{L}$ suspenzije nanodelcev Fe_3O_4 , oborjenih v vodni raztopini NH_3 . Kot topilo smo v vsakega od vzorcev dodali po $90 \mu\text{L}$ 0,1 M fosfatno citratnega oz. fosfatnega pufru z različnimi pH vrednostmi v območju od 4 do 7. Citratno fosfatni pufer smo uporabili v območju pH vrednosti 4 do 7, fosfatni pufer pa pri pH vrednostih 7,5 in 8. Sledila je 15 min inkubacija vzorca in injiciranje $22,64 \mu\text{L}$ vzorca v mikrokanal, za čimer smo pričeli s 5 min trajajočim

spiranjem z deionizirano vodo pri pretoku $300 \mu\text{L min}^{-1}$. Pri tem smo zbirali izhodni vzorec, ki smo mu po končanem eksperimentu določili koncentracijo celic in iz meritev izračunali delež imobiliziranih celic pri uporabi različnih pufrov pri pripravi vzorcev celic kvasovk, obdanih z nanodelci. Poskus smo opravili v dveh ponovitvah.

3.4 BIOTRANSFORMACIJA FUMARNE V L-JABOLČNO KISLINO

Proces biotransformacije fumarne v L-jabolčno kislino smo izvedli s kvasovkami *S. cerevisiae* kot katalizatorjem. Izvedli smo ga na dva načina, in sicer šaržno v mešalnem reaktorju in kontinuirno v mikroreaktorju (aparatura opisana v poglavju 3.3.2).

3.4.1 Biotransformacija v mešalnem reaktorju

Šaržni eksperiment smo izvedli v centrifugirki volumna 15 ml, ki smo jo postavili na vrtničnik za doseganje homogenih pogojev. V 2,5 mL suspenzije celic s koncentracijo 10^9 celic mL^{-1} smo dodali 0,25 mL suspenzije nanodelcev, oziroma v eksperimentu brez nanodelcev 0,25 mL citratno fosfatnega pufru s pH vrednostjo 7. Sledilo je 6 min permeabilizacije z 0,02 % heksadeciltrimetilamonijevim bromidom (CTAB) in centrifugiranje 2 min pri $6000 \text{ obr. min}^{-1}$ (Stojkovič in Žnidaršič-Plazl, 2012). Supernatant smo odlili, pelet pa smo dvakrat sprali z deionizirano vodo in resuspendirali v 2,5 ml citratno fosfatnega, 0,1 M pufru, s pH vrednostjo 7. Na ta način smo odstranili dodan detergent. Potem smo 2 mL vzorca prenesli v epruveto volumna 10 mL in dodali 2 mL 10 mM raztopine fumarne kisline v 0,1 M, citratno fosfatnem pufru, s pH 7. Po preteku 1 min, 3 min in 6 min smo iz reaktorja odvzeli vzorec in mu s filtracijo skozi filter s porami velikosti $0,45 \mu\text{m}$ odstranili celice. Za tem smo z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) analizirali koncentracijo fumarne in jabolčne kisline in izračunali konverzijo po enačbi 1.

$$X = \frac{n_0 - n}{n_0} \quad \dots (1)$$

n_0 ... množina substrata na začetku reakcije [mol]

n ... množina substrata na ob času vzorčenja [mol]

Poskus smo opravili v treh ponovitvah.

3.4.2 Biotransformacija v mikrokanalu

Kontinuirno biotransformacijo smo izvedli v mikrokanalu z imobiliziranimi celicami. Pripravili smo suspenzijo kvasovk s koncentracijo 10^9 celic mL^{-1} . Vzorec za injiciranje v mikrokanal je vseboval celice z magnetnimi nanodelci v volumskem razmerju 1:10. Po 15 min inkubaciji smo v mikrokanal injicirali 22,64 μL suspenzije celic z nanodelci. Ob kanal smo postavili vseh 20 neodimskih magnetkov. Sledilo je 5 min spiranja z deionizirano vodo pri pretoku 20 $\mu\text{L min}^{-1}$, s čimer smo sprali neimobilizirane celice. Za tem smo izvedli permeabilizacijo, tako da smo v reaktor vnašali detergent CTAB pri pretoku 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ v skupnem času 6 min. Nato smo kanal ponovno spirali z deionizirano vodo 5 min, da smo odstranili sledi CTAB.

Za izvedbo biotransformacije smo pri različnih pretokih (2, 10, 15 in 20 $\mu\text{L min}^{-1}$) v kanal dovajali substrat koncentracij 1, 2, in 5 mM in zbirali izhodne vzorce za HPLC analizo. Iz pridobljenih podatkov o koncentracijah produkta in substrata na izstopu iz mikrokanala smo ob zagotovljenem konstantnem pretoku skozi kanal izračunali konverzije na osnovi enačbe (2).

$$X = \frac{c_v - c_{iz}}{c_v} \quad \dots (2)$$

c_v ... koncentracija substrata na vstopu v reaktor [mol L^{-1}]

c_{iz} ... koncentracija substrata na izstopu iz reaktorja [mol L^{-1}]

Nato smo izračunali še produktivnost katalizatorja (enačba 3) in volumetrično produktivnost (enačba 4) pri doseženi najvišji konverziji.

$$P_m = \frac{c_P \times \Phi_V}{m_{suha}} \quad \dots (3)$$

P_m ... produktivnost katalizatorja (celic) [$\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$]

c_P ... koncentracija produkta na izstopu iz reaktorja [mol L^{-1}]

Φ_V ... volumenski pretok [L min^{-1}]

m_{suha} ... suha masa celic v mikroreaktorju [g]

$$P_v = \frac{c_P \times \Phi_V}{V_R} \quad \dots (4)$$

P_V ... volumetrična produktivnost [mol min^{-1}]

V_R ... volumen reaktorja [L]

Poskus smo opravili v treh ponovitvah.

3.5 ANALIZNE METODE

3.5.1 Določanje koncentracije celic

Suspenziji celic v vodi je bilo najprej potrebno določiti koncentracijo. Vzorec smo ustrezno razredčili z deionizirano vodo na pričakovano koncentracijo, ki bi bila primerna za štetje pod mikroskopom. Za štetje celic smo uporabili izboljšano Neubauerjevo komoro z globino 0,100 mm za neposredno določanje števila celic. V zarezo na števni celici smo previdno nanesti kapljico suspenzije celic. Kapilarni vlek nato enakomerno porazdeli suspenzijo celic med krovno in objektno stekelce. Celice smo šteli na povečavi 40 x 10. Štetni smo začeli v levem zgornjem robu, na kvadratu obdanem s tremi črtami.

Nato smo pripravili serijo vzorcev znanih koncentracij za določanje optične gostote. Z določitvijo optične gostote (spektrofotometer Shimadzu, Japonska) pri 600 nm smo pripravili umeritveno krivuljo (Slika 9), s pomočjo katere smo v nadaljnjih poskusih določali koncentracijo neznanim vzorcem.

Za določanje suhe mase celice smo razredčeno suspenzijo celic prešteli v števni komori in ji tako določili koncentracijo celic mL^{-1} . Pripravili smo vzorec suspenzije celic s koncentracijo 10^9 celic mL^{-1} . Osušene membranske filtre z velikostjo por 0,45 μm smo stekali in posamično shranili v eksikatorju do uporabe.

Filtre smo vstavili na porozno frito v presesalno erlenmajerico in s pomočjo vodne črpalke prefiltrirali natančno 1 mL vzorca. Meritev smo izvedli v treh paralelakah. Filtre smo nato vstavili v analizator vlažnosti snovi (Mettler Toledo, Švica) in sušili do konstantne mase, ki smo ji odšteli maso filtra in s tem dobili podatek o suhi masi 1 mL suspenzije celic s koncentracijo 10^9 celic mL^{-1} .

3.5.2 Določanje masne koncentracije nanodelcev

Za določanje masne koncentracije suspenzije nanodelcev smo 1 mL vsakega vzorca nanodelcev nanесли na predhodno stehan in osušen filtrni papir, vstavljen na porozno frito v presesalno erlenmajerico in s pomočjo vodne črpalke prefiltrirali vzorec. Filtre smo položili v analizator vlažnosti snovi (Mettler Toledo, Švica) in posušili do konstantne mase. Po tem, ko smo odšteli maso filtrnega papirja, smo izračunali masno koncentracijo posameznih vzorcev. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah.

3.5.3 Porazdelitev velikosti nanodelcev

V sodelovanju s prof. dr. Marjanom Marinškom smo določili porazdelitev velikosti nanodelcev (Stojkovič in sod., 2016). Velikost in morfologijo pripravljenih nanodelcev smo določili z opazovanjem na Zeiss UltraPlus FE-SEM, opremljenem s STEM detektorjem. Kvantitativno analizo digitalnih slik smo opravili s Zeiss KS300 3.0 programom za analizo slik (Stojkovič in sod., 2016).

3.5.4 HPLC analiza

Rezultate biotransformacije smo določali z analizo vzorca na HPLC aparaturi (Agilent, Varian, Pro Star, ZDA). Uporabili smo Synergi MAX-RP 50 x 4.6 mm C18 kolono (reverzna faza) s 4 µm delci (Phenomenex, Torrance, USA) in UV-Vis DAD detektor, s katerim smo spremljali meritve pri 208 in 257 nm. Mobilno fazo je predstavljala 0,1 M vodna raztopina H_3PO_4 , ki smo ji pH na 2,9 umerili z vodno raztopino NaOH (Preglednica 1). Za pripravo raztopin smo uporabljali ultra čisto vodo.

Preglednica 1: Kemikalije, ki so bile uporabljene za izdelavo mobilne faze.

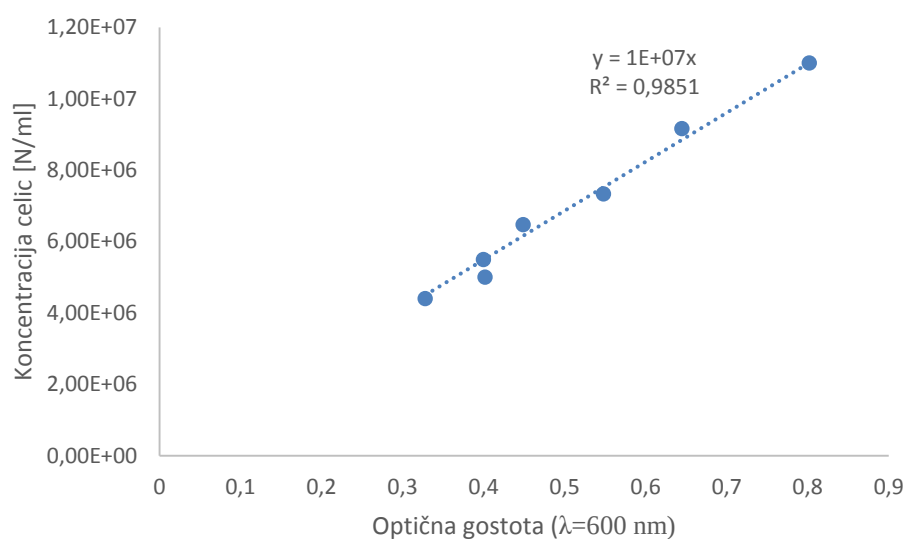
Izhodna kemikalija	Koncentracija raztopine [M]	vodne	Proizvajalec	Molska masa [g mol ⁻¹]
H ₃ PO ₄ (85 %)	0,1		Merck, Nemčija, Darmstadt	98
NaOH	0,2		Merck, Nemčija, Darmstadt	40

Pripravili smo umeritveni krivulji na HPLC za določanje koncentracije substrata in produkta.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE KVASOVK V SUSPENZIJI

Za določanje koncentracije celic kvasovk smo pripravili umeritveno krivuljo, s katero smo določili optično gostoto suspenzijam kvasovk z znanimi koncentracijami celic (Slika 7).



Slika 7: Umeritvena krivulja koncentracije suspenzije celic kvasovk v odvisnosti od izmerjene optične gostote.

Za določanje suhe mase celic smo pripravili suspenzijo kvasovk v deionizirani vodi s koncentracijo 10^9 celic mL^{-1} , katerim smo v treh ponovitvah s sušenjem v analizatorju vlažnosti snovi določili suho maso. Ugotovili smo, da 1 mg suhe mase celic predstavlja $7,41 \cdot 10^7$ celic, kar je primerljivo s podatki iz literatur, kjer so Stojkovič in sod. (2010) določili, da je 1 mg suhe mase celic *S. cerevisiae* enakovreden $5,7 \cdot 10^7$ celic.

4.2 LASTNOSTI NANODELCEV

Preizkusili smo različne nanodelce na osnovi CoFe_2O_4 in Fe_3O_4 , pripravljene z različnimi snovmi za njihovo koprecipitacijo, ter shranjenimi v *n*-dekanu ali v vodi z različnimi deleži dodanega PVP. Vsi delci so izkazovali magnetne lastnosti.

Vsem nanodelcem smo po 15-min inkubaciji s suspenzijo celic določili sposobnost imobilizacije celic pod vplivom magnetnega polja. S sušenjem v analizatorju vlažnosti snovi smo različnim vzorcem nanodelcev določili masno koncentracijo. Rezultati, zbrani v

preglednici 2, kažejo, da so se vse vrste nanodelcev vsaj delno uspešno izkazale glede imobilizacije celic na osnovi delovanja magnetnega polja, kar kaže, da so se delci zadržali na ali v celicah. Fe_3O_4 delci, oborjeni z NH_3 in shranjeni v 0,01 % vodni raztopini PVP, so med vsemi testiranimi delci izkazali največjo učinkovitost glede imobilizacije celic kvasovk pri izbranih pogojih. Zaradi količine vzorcev smo za nadaljnjo uporabo izbrali delce, shranjene v 0,05 % vodni raztopini PVP, s katerimi smo dosegli 93 % imobilizacijo celic kvasovk. Nanodelci, pri katerih smo za shranjevanje uporabili le H_2O , so se v povprečju slabše izkazali pri meritvah uspešnosti imobilizacije celic kot ostali delci. Nanodelci CoFe_2O_4 , obdelani v *n*-dekanu, so omogočili le 53 % delež imobilizacije celic.

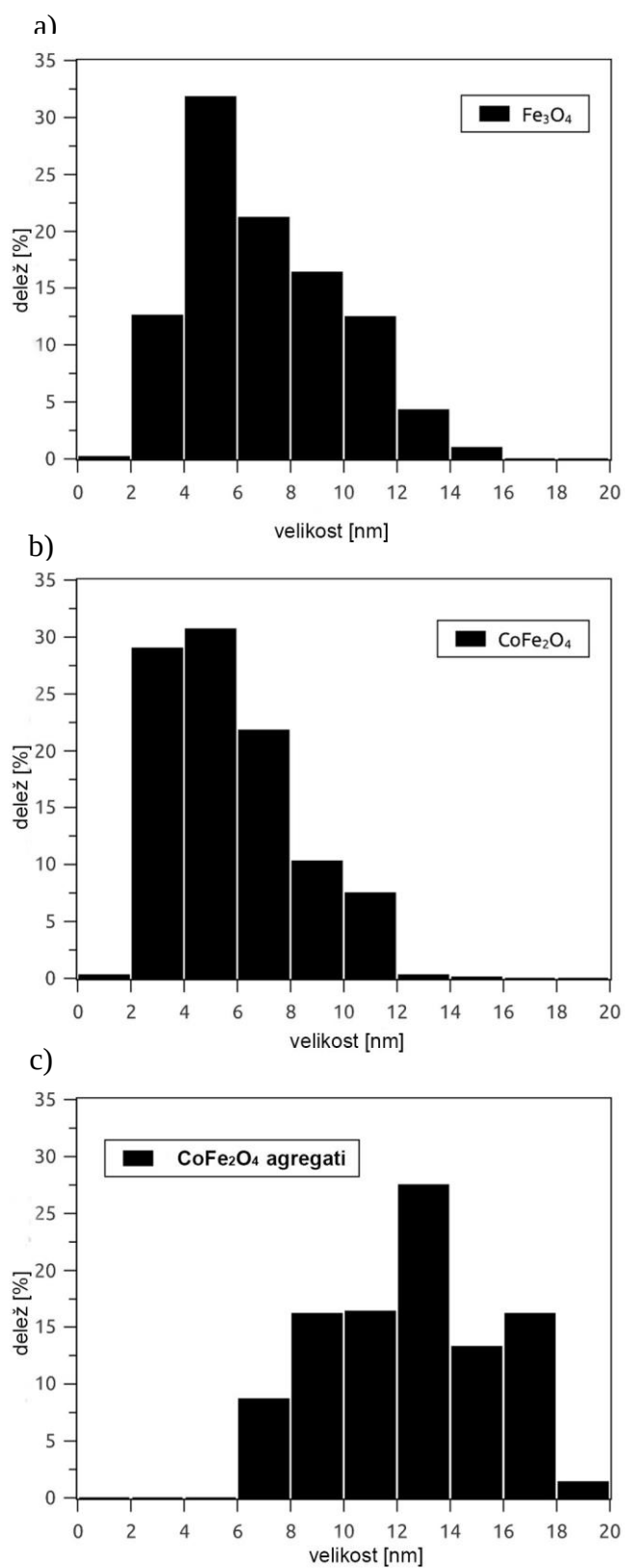
Preglednica 2: Pregled izračunanih povprečnih vrednosti določanja masnih koncentracij delcev in deleža imobiliziranih celic ob uporabi različnih vzorcev nanodelcev. Delci, ki smo jih nadalje uporabljali, so barvno označeni.

Vzorec	Snov za koprecipitacijo	Topilo	Masna koncentracija [g mL^{-1}]	Delež imobiliziranih celic [%]
CoFe_2O_4	-	<i>n</i> -dekan	32	53
CoFe_2O_4	-	H_2O	26	42
CoFe_2O_4	-	0,001 % PVP	21	87
CoFe_2O_4	-	0,01 % PVP	20	82
CoFe_2O_4	-	0,05 % PVP	25	70
CoFe_2O_4	-	0,1 % PVP	20	29
CoFe_2O_4	-	0,5 % PVP	36	79
CoFe_2O_4	-	1 % PVP	62	82
Fe_3O_4	NH_3	H_2O	43	76
Fe_3O_4	NH_3	0,001 % PVP	26	79
Fe_3O_4	NH_3	0,01 % PVP	37	99
Fe_3O_4	NH_3	0,05 % PVP	26	93
Fe_3O_4	NH_3	0,1 % PVP	29	36
Fe_3O_4	NH_3	0,5 % PVP	44	91
Fe_3O_4	NH_3	1 % PVP	24	89
Fe_3O_4	NaOH	H_2O	53	51
Fe_3O_4	NaOH	0,001 % PVP	46	39
Fe_3O_4	NaOH	0,01 % PVP	25	94
Fe_3O_4	NaOH	0,05 % PVP	33	87
Fe_3O_4	NaOH	0,5 % PVP	26	88
Fe_3O_4	NaOH	1 % PVP	39	12

4.2.1 Določitev porazdelitve velikosti nanodelcev

Rezultati o porazdelitvi velikosti nanodelcev so prikazani na grafikonih na sliki 8. Razpon velikosti Fe_3O_4 nanodelcev je bil relativno ozek, s povprečnim premerom 6,1 nm (Slika 8a). CoFe_2O_4 delci so se pojavljali v večjem velikostnem razponu, s povprečnim premerom 5,6 nm (Slika 8b) in so tvorili tudi aglomerate velikosti od 6 do 20 nm (Slika 8c) (Stojkovič in sod., 2016).

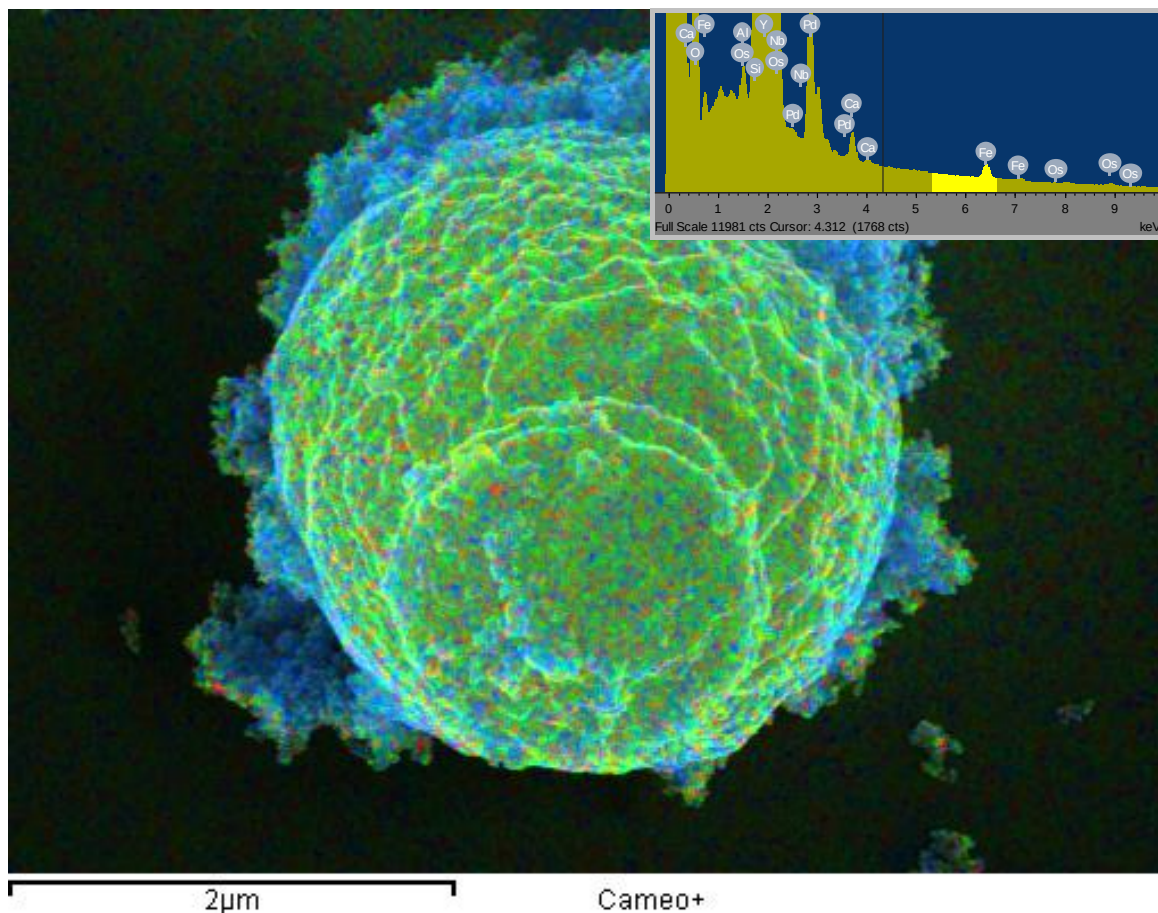
Kljub temu, da govorimo o delcih velikosti manjših od 10 nm, jih lahko poimenujemo z besedo suspenzija, saj se ob prisotnosti topila združijo v aglomerate in s tem tvorijo večje delce, ki so lepo vidni tudi s prostim očesom.



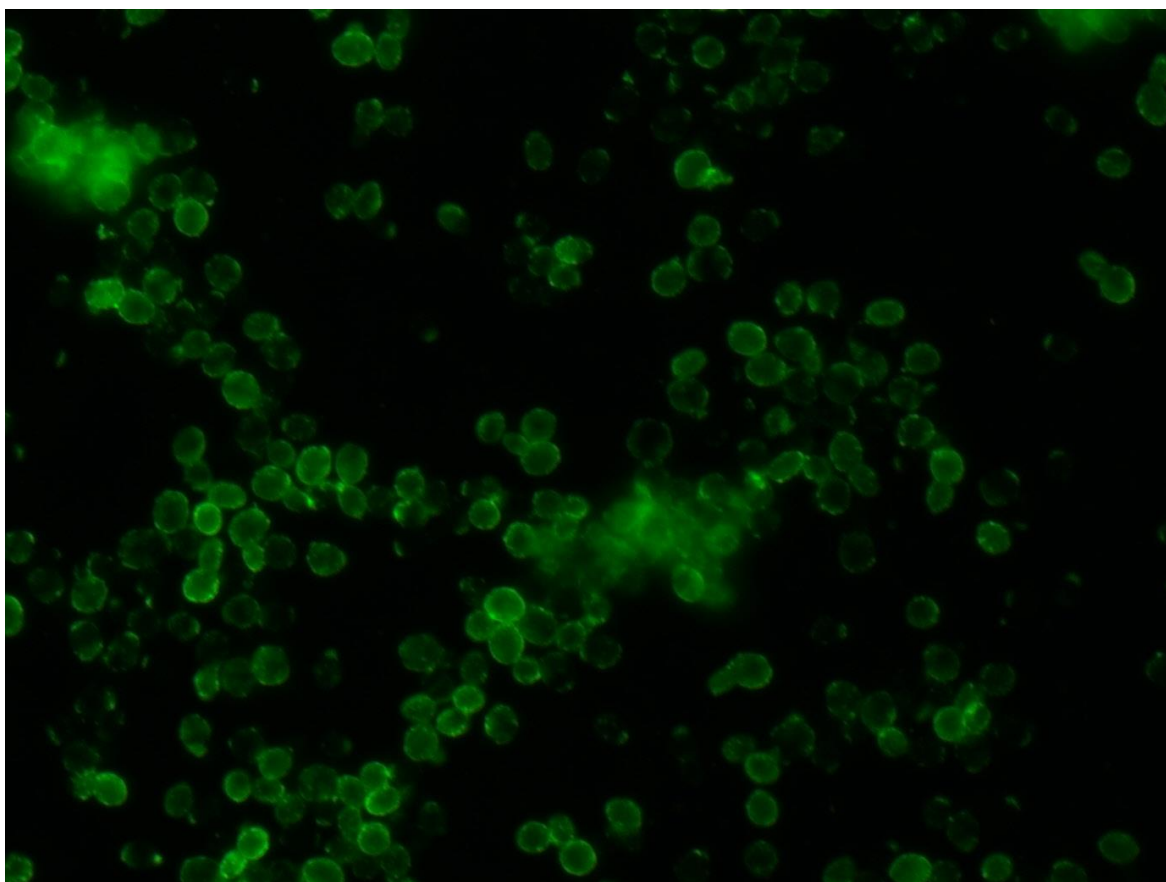
Slika 8: Porazdelitve delcev po velikosti: a) Delci Fe_3O_4 b) CoFe_2O_4 c) agregati CoFe_2O_4 (Stojkovič in sod., članek v pripravi).

4.2.2 Določanje položaja zadržanja nanodelcev na celice *S. cerevisiae*

Položaj vezave nanodelcev na celice *S. cerevisiae* smo vizualizirali s SEM. Na sliki 9 je vidno, da so se delci zadržali na zunanji strani celične stene kvasovk. Za dodatno lokalizacijo delcev smo uporabili filter, s katerim smo z modro barvo obarvali delce, ki vsebujejo železo (Stojkovič in sod., 2016).



Slika 9: SEM mikroskopija celic kvasovk z nanodelci in obarvanim železom.



Slika 10: Celice *S. cerevisiae* MZKI K86, inkubirane z Fe_3O_4 nanodelci, obarvani s fluorescentnim barvilom iridijev(III) acetil-acetonato-bis(3-(benzotiazol-2-il)-7-(dietilamino)-kumarin, vizualizirane s fluorescenčno mikroskopijo (Stojkovič in sod., 2016).

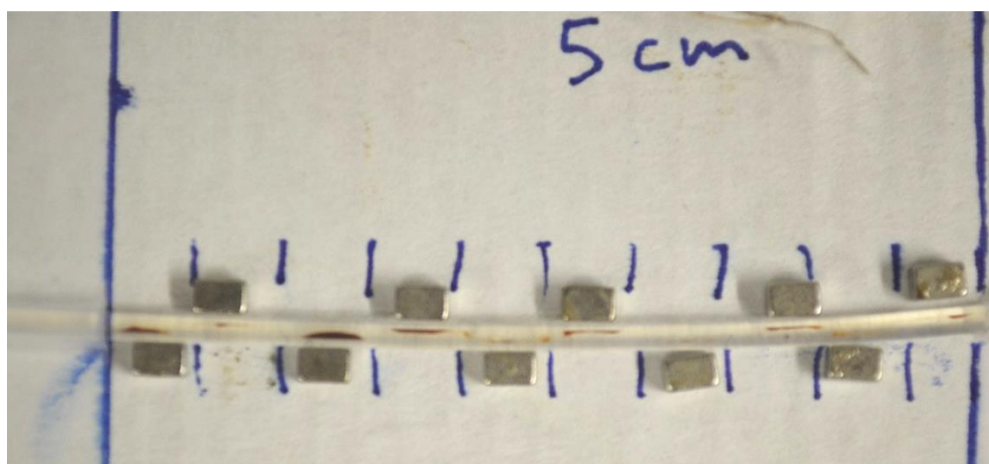
Za dodatno potrditev, da nanodelci ne penetrirajo v notranjost celice, smo s fluorescenčno mikroskopijo posneli celice kvasovk, obdane z Fe_3O_4 nanodelci, obarvani s fluorescentnim barvilom iridijev(III) acetil-acetonato-bis(3-(benzotiazol-2-il)-7-(dietilamino)-kumarin (Slika 10). Na sliki je videti, da so se delci, kot smo predvidevali, v največji meri zadržali na površini celic.

4.3 ŠTUDIJ RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA USPEŠNOST IMOBILIZACIJE CELIC

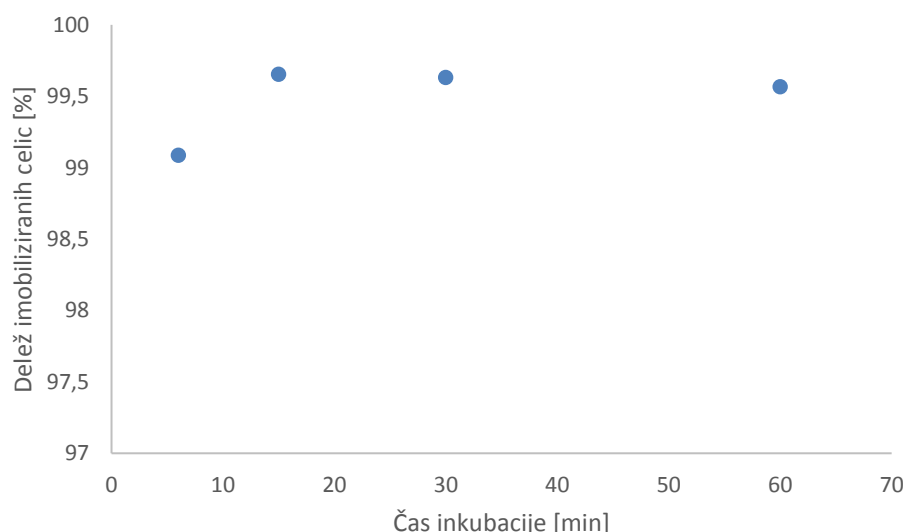
4.3.1 Vpliv časa izpostavitve celic nanodelcem

Za določitev najprimernejšega časa inkubacije celic *S. cerevisiae* in nanodelcev v testni posodi pred imobilizacijo, smo znano količino celic, obdanih z nanodelci, injicirali v mikrokanal in pričeli s spiranjem z deionizirano vodo. Sila toka vode je celice potiskala proti izhodu reaktorja, medtem ko jih je v njem zadrževalo magnetno polje. Ravnovesje med silo

hidrodinamskega vleka in magnetnega polja je povzročilo koncentriranje celic v smeri proti izstopu in nastanek skupka ob magnetih, podobnega tistemu, ki nastane ob uporabi imobilizacijskih nosilcev (Slika 11). Pri tem smo zbirali izhodno frakcijo, v kateri smo prav tako določili količino celic in na ta način izračunali odstotek imobiliziranih celic pri različnih časih izpostavitve celic nanodelcem. Kot je razvidno s slike 12, smo ugotovili, da se po pretečenih 15 min uspešnost imobilizacije celic ne izboljšuje več, zato smo se odločili, da je 15 min najprimernejši čas inkubacije suspenzije celic in suspenzije nanodelcev in tako tudi ravnali v nadaljnjih poskusih.



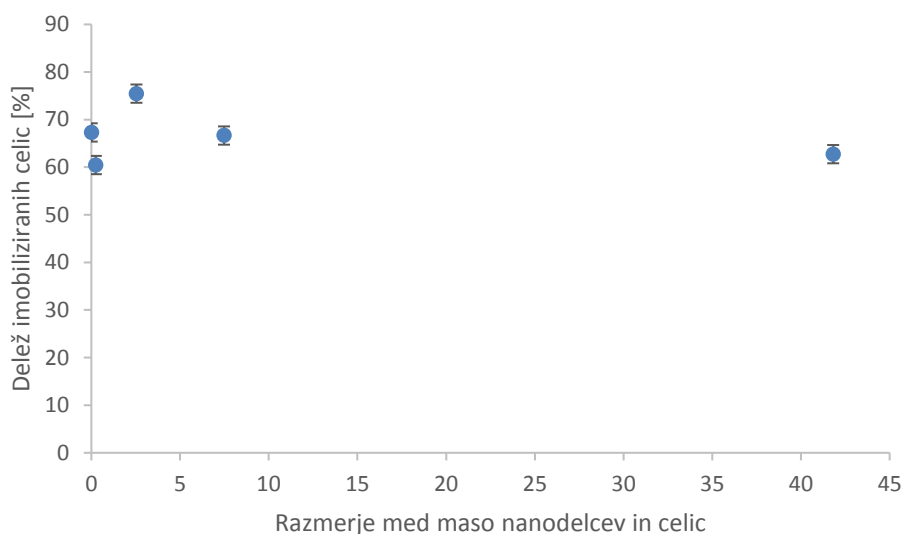
Slika 11: Mikrokanal, obdan z magnetki in z imobiliziranimi celicami, obdanimi z magnetnimi nanodelci.



Slika 12: Delež celic imobiliziranih v mikrokanalu v odvisnosti od predhodnega časa inkubacije celic *S.cerevisiae* z nanodelci v testni posodi.

4.3.2 Vpliv razmerja med nanodelci in celicami

Pripravili smo vzorce z različnimi razmerji med suho maso nanodelcev in celic, ter jih po 15-min inkubaciji v testni posodi s prostornino 150 μL injicirali v mikrokanal in izpostavili magnetnemu polju. Po 5-min spiranju z deionizirano vodo smo zbrani frakciji na izhodu določili količino spranih celic in glede na število celic v mikrokanalu na začetku postopka spiranja določili delež imobiliziranih celic. Rezultati so prikazani na sliki 13, iz katere je razvidno, da je bil najvišji delež imobiliziranih celic dosežen, ko smo v inkubacijski posodi, v kateri smo imeli suspenzijo celic (koncentracije 10^6 celic mL^{-1}), citratno fosfatni pufer vrednosti pH 7 in nanodelci (skupaj 150 μL), imeli koncentracijo nanodelcev $0,0001 \text{ g mL}^{-1}$. To pomeni, da je bilo razmerje med maso nanodelcev in suho maso celic v tem primeru 2,5. Glede na to, da smo pri višjih razmerjih dosegali tudi nižje rezultate, bi nekaj odstotkov višji delež imobiliziranih celic v tem primeru lahko pripisali tudi eksperimentalni napaki. Sicer je bila večina rezultatov v območju od 60 % do 70 % in z višanjem koncentracije nanodelcev v inkubacijski posodi ni bilo opaziti trenda uspešnejše imobilizacije celic.

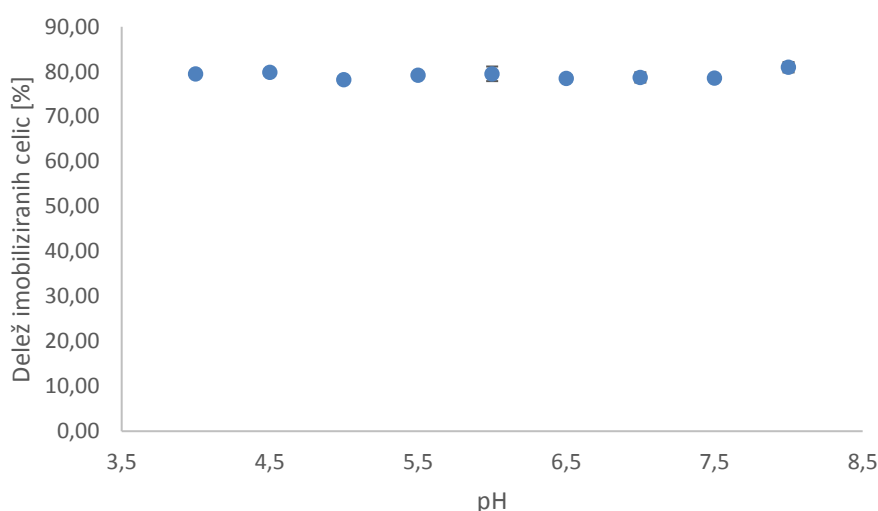


Slika 13: Delež imobiliziranih celic v mikrokanalu v odvisnosti od razmerja med maso nanodelcev in suho maso celic v inkubacijski posodi.

4.3.3 Vpliv pH vrednosti vodne raztopine uporabljene pri imobilizaciji

Pripravili smo vzorce celic kvasovk in nanodelcev Fe_3O_4 (oborjeni v vodni raztopini NH_3 in shranjeni v 0,05 % PVP) v vodnih raztopinah različnih pH vrednosti in jih inkubirali 15-min. Volumsko razmerje celic in nanodelcev je bilo 1 : 10. Delež imobiliziranih celic smo

določali s štetjem pod mikroskopom. Število celic, injiciranih v mikrokanal volumna 9,81 μL , je bilo 10^7 . S štetjem izhodnega vzorca po spiranju kanala smo pokazali, da se uspešnost imobilizacije s spremembo pH topila statistično značilno ne spreminja in je bila v vseh primerih okrog 80 %. Rezultati so grafično prikazani na sliki 14.



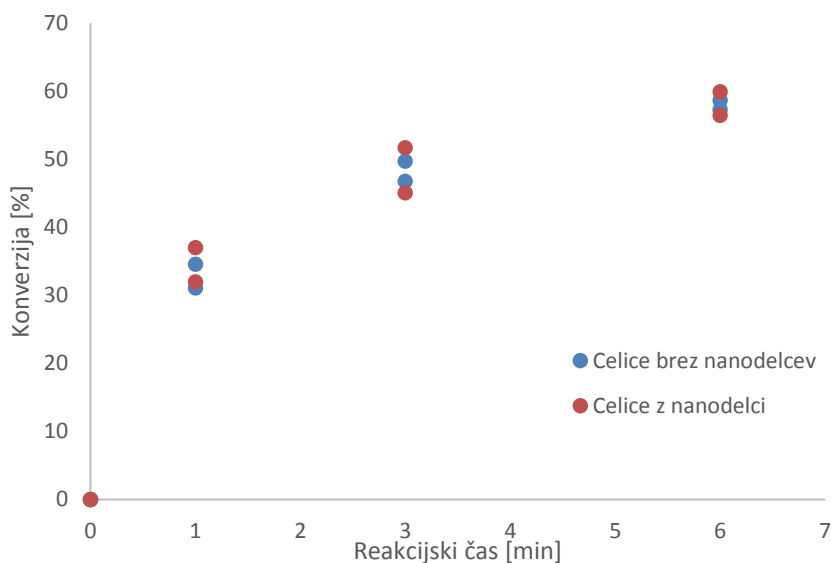
Slika 14: Grafični prikaz deleža imobiliziranih celic v odvisnosti od pH vrednosti vodne raztopine pufru, uporabljenega pri imobilizaciji.

4.4 BIOTRANSFORMACIJA FUMARNE V L-JABOLČNO KISLINO

4.4.1 Biotransformacija v šaržnem sistemu

V šaržnem sistemu smo v 15-mL centrifugirki izvedli biotransformacijo različnih koncentracij fumarne kisline v jabolčno in vzorce, odvzete pri različnih časih reakcije, analizirali na HPLC aparaturi. S tem smo preverjali katalitske sposobnosti celic kvasovk *S. cerevisiae* in morebitno spremembo le-teh po izpostavitvi celic nanodelcem.

Število celic v reaktorju je bilo $2 \cdot 10^9$ celic, kar je ekvivalentno 27 mg suhe mase celic. Rezultati so grafično prikazani na sliki 15. Poskus smo izvedli s kvasovkami, ki so bile, ali pa ne, predhodno za 15 min izpostavljene suspenziji nanodelcev, pri čemer med obema različicama ni bilo opaziti pomembnih razlik. Najvišja dosežena konverzija je bila 60 % pri zadrževalnem času 6 min. Produktivnost na maso katalizatorja je bila pri najvišji konverziji v obeh primerih $26 \text{ mmol mg}^{-1}_{\text{celic}} \text{ dan}^{-1}$.



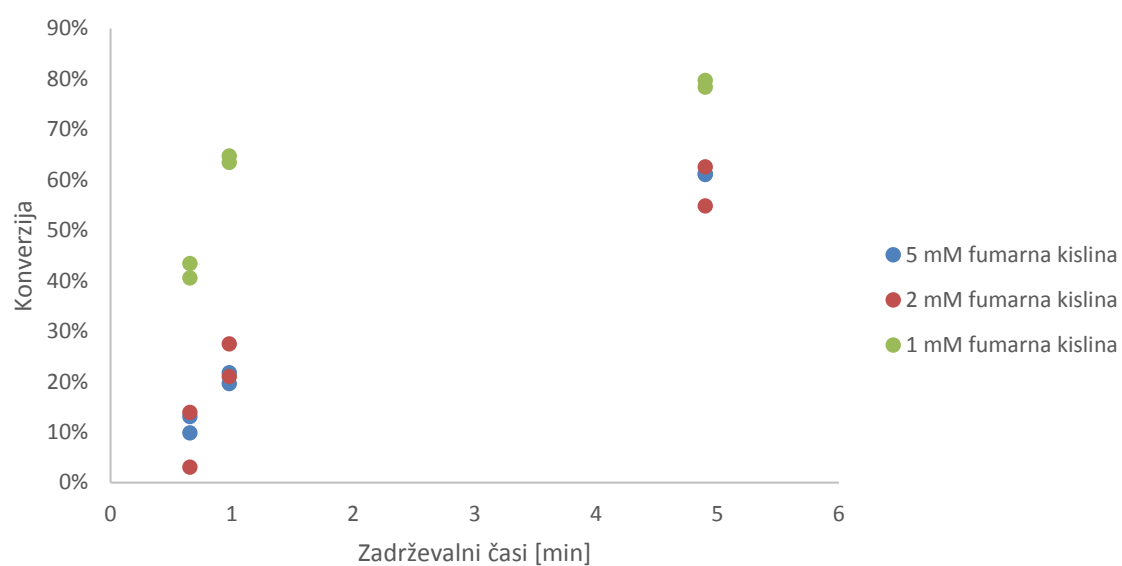
Slika 15: Grafikon, ki prikazuje dosežene konverzije fumarne kisline v L-jabolčno kislino v odvisnosti od reakcijskega časa pri celicah, inkubiranih z nanodelci in celicah, ki niso bile inkubirane z nanodelci.

4.4.2 Biotransformacija v kontinuirnem poskusu v mikroreaktorju

Za izvedbo poskusa v mikroreaktorju v kontinuirnem sistemu smo v mikrokanal injicirali 22,64 μL suspenzije celic kvasovk, ki so bile predhodno 15 min izpostavljene suspenziji izbranih nanodelcev. Po začetnem spiranju z deionizirano vodo in permeabilizaciji s CTAB smo po vzpostavitvi stacionarnih pogojev začeli z dovajanjem substrata (različne koncentracije raztopine fumarne kisline v citratno fosfatnem pufru pH 7) v mikrokanal in zbiranjem izhodne frakcije.

Delovni volumen mikroreaktorja je znašal 9,81 μL , kjer je bilo v mikrokanalu okrog $2 \cdot 10^7$ celic kvasovk, kar znaša 0,274 mg suhe mase celic. Razmerje suhe mase nanodelcev in celic je bilo v reaktorju 1,4.

Grafični prikaz rezultatov je na sliki 16. Najvišje konverzije smo dosegli pri najnižjem pretoku (zadrževalni čas 4,9 min) in najnižji koncentraciji substrata (1 mM) in so znašale okrog 80 %. Pripadajoča produktivnost katalizatorja (enačba 2) je pri teh pogojih znašala okrog 21 $\text{mmol mg}^{-1} \text{ dan}^{-1}$, volumetrična produktivnost (enačba 3) pa okrog 232 mmol dan^{-1} . Najvišja izmerjena konverzija pri 2 mM koncentraciji substrata, je bila pri zadrževalnem času 4,9 min 63 %, pri čemer je produktivnost na maso katalizatorja znašala 33 $\text{mmol mg}^{-1}_{\text{celic}} \text{ dan}^{-1}$ in volumetrična produktivnost 368 mmol dan^{-1} . V primeru 5 mM koncentracije substrata in zadrževalnem času 4,9 min, je konverzija znašala 61 %, pripadajoča produktivnost na maso katalizatorja 80 $\text{mmol mg}^{-1}_{\text{celic}} \text{ dan}^{-1}$ in volumetrična produktivnost 900 mmol dan^{-1} .



Slika 16: Grafikon, ki prikazuje dosežene konverzije fumarne kisline v odvisnosti od zadrževalnih časov v mikrokanalu pri različnih koncentracijah substrata (fumarna kislina).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Izbira magnetnih nanodelcev in pogojev imobilizacije

Uporabljene magnetne nanodelce smo pripravili z uporabo osnovne opreme in po enostavnem protokolu. Na podlagi šaržnih eksperimentov smo ugotovili, da so največji delež imobiliziranih celic omogočili delci Fe_3O_4 , koprecipitirani z NH_3 , zato smo le-te tudi uporabili v nadaljnjih eksperimentih. Najvišji delež imobilizacije je bil dosežen z delci, shranjenimi v 0,01 % PVP, vendar smo zaradi količine vzorca izbrali delce, shranjene v 0,05 % PVP, s katerimi smo dosegli 93 % imobilizacijo celic. so Z delci CoFe_2O_4 smo dosegli nižje odstotke imobilizacije, kar bi lahko pojasnili s tem, da so slednji v večji meri tvorili agregate. Jasnih razlik uspešnosti imobilizacije pri uporabi različnih nanodelci, z različnimi uporabljenimi snovmi za koprecipitacijo in topilom za shranjevanje, rezultati niso nakazali. Z opazovanjem celic s SEM mikroskopijo je vidno, da se v prisotnosti topila tvorijo agregati delcev, zato lahko pri uporabi nanodelcev kljub majhnim velikostim posameznih delcev v prisotnosti topila govorimo o suspenziji in ne raztopinah delcev (Mohanraj in Chen, 2006). Na sliki 8 so na površini kvasovke prikazani relativno veliki skupki nanodelcev. Zadrževanje delcev na površini kvasovke smo nadalje potrdili tudi s fluorescenčno mikroskopijo (Slika 9). Natančnega mehanizma interakcije nanodelcev s celicami v tem delu nismo določali, vendar zbrani rezultati nakazujejo, da se delci zadržijo na površino celice.

Z določanjem porazdelitve velikosti nanodelcev smo ugotovili manjši razpon velikosti delcev Fe_3O_4 kot pri CoFe_2O_4 , saj je pri slednjih relativno širok časovni razpon nastajanja kristalizacijskih jeder, rasti kristalov in aglomeracije pripomogel k razporeditvi velikosti delcev po večjem območju (Slika 8).

Pri študiji najprimernejših pogojev imobilizacije *S. cerevisiae* z magnetnimi nanodelci smo ugotovili, da je za doseganje visokih odstotkov imobiliziranih celic potrebna okrog 15-min inkubacija nanodelcev in kvasovk za optimalno adsorpcijo delcev na površino celic. Pri večanju časa inkubacije nad 15 min ni bilo več mogoče opaziti večjih odstotkov imobilizacije celic znotraj mikrokanala (Slika 12).

S spreminjanjem razmerja mase nanodelcev in celic je bil v povprečju odstotek imobiliziranih celic v območju med 60 in 70 % glede na začetno število celic v testni posodi. Ugotovili smo, da z višanjem koncentracije nanodelcev v inkubacijski posodi ni bilo opaziti trenda uspešnejše imobilizacije celic (Slika 13).

Pri študiji vpliva pH vrednosti medija, v katerem poteka inkubacija celic in nanodelcev, smo ugotovili, da le-ta ne vpliva na uspešnost imobilizacije v mikrokanalu (Slika 14). Uspešnost imobilizacije z isto vrsto nanodelcev pri različnih vrednostih pH je praktično enaka oziroma

v okvirju eksperimentalne napake. Hkrati je znano, da kvasovke v nekaterih primerih celičnega naboja v vodnih raztopinah z različnimi vrednostmi pH ne spremenijo (Tazhibaeva in sod., 2003).

5.1.2 Šaržni in kontinuirni proces biotransformacije

V šaržnem eksperimentu smo potrdili hipotezo, da prisotnost nanodelcev ne bo vplivala na katalitsko aktivnost celic *S. cerevisiae*. Rezultati po obdelavi z nanodelci niso statistično odstopali od tistih, kjer je biotransformacija potekala brez njihove prisotnosti, konverzije so po 6 min v obeh primerih dosegle okrog 60 %. Slika 15 prikazuje grafikon povečevanja konverzije z daljšanjem zadrževalnih časov in skladnost rezultatov postopka z in brez vključenih nanodelcev.

Procesne parametre je bilo v kontinuirnem sistemu enostavno nadzirati. V mikoreaktorskem smo se tudi izognili centrifugiranju vzorca in odstranjevanju permeabilizacijskega agensa v šaržnem sistemu, ki prispeva k času delovanja na celice. Ker je inkubacijski čas zadrževanja celic v detergentu ključnega pomena za ohranjanje encima v celicah in s tem uspeh biotransformacije, je to velika prednost mikoreaktorskega sistema. S spreminjanjem pretokov in s tem zadrževalnih časov detergenta v reaktorju s celicami in kasnejšim spiranjem z vodo je bilo mogoče določiti čas permeabilizacije do sekunde natančno.

V mikoreaktorju z magnetno imobiliziranimi kvasovkami, je bila koncentracija celic v delovnem volumnu reaktorja okrog $2,07 \cdot 10^9$ celic mL⁻¹, kar je skoraj sedem krat toliko, kot v primerljivem poskusu s kvasovkami *S. cerevisiae*, kovalentno imobiliziranimi v PFA mikrokanal, obdelan s postopkom silanizacije, na osnovi premreženja z glutaraldehydom (Stojkovič in Žnidaršič Plazl, 2012). Najvišja dosežena konverzija v pretočnem sistemu je bila 78 % (Slika 16), kar je blizu ravnotežne konverzije (80 %), dosežene po času 25 min pri isti vstopni koncentraciji substrata v predhodni študiji s celicami v PFA mikrokanalu (Stojkovič in Žnidaršič Plazl, 2012). Tolikšno konverzijo smo v mikoreaktorskem pretočnem sistemu dosegli pri koncentraciji fumarne kisline 1mM v fosfatno citratnem pufru s pH 7 in pri zadrževalnem času 5 min. Stojkovič in Žnidaršič Plazl (2012) sta v šaržnem sistemu plato konverzije dosegla šele po pretečenem pet krat tolikšnem zadrževalnem času.

V primerjavi s poskusom silanizacije površine in kovalentnim pripetjem celic na stene mikrokanala (Stojkovič in Plazl, 2012) je produktivnost na suho maso celic v našem poskusu skoraj 7-krat tolikšna, kot je navedena v njihovem eksperimentu. Volumetrična produktivnost se je v primerjavi s 616 mM dan⁻¹ pri kovalentno imobiliziranih celicah (Stojkovič in Plazl, 2012) v našem poskusu magnetno imobiliziranih celic zvišala na 900 mM dan⁻¹. Z imobilizacijo z magnetnimi nanodelci smo dosegli razporeditev celic po celotnem kanalu in ne le na površini cevke, kar se da enakomerna porazdelitev magnetnega polja pa zmanjša tvorbo skupkov na predelih povišanega magnetizma. Pri tem je poraba tako

časa kakor kemikalij izredno nizka. Število celic pri imobilizaciji s silanizacijo v mikrokanalu je bila $8 \cdot 10^6$ celic mL^{-1} v 24,5 μL delovnega volumna, medtem ko je bilo v našem poskusu v volumnu 9,81 μL imobiliziranih $2 \cdot 10^7$ celic kvasovk (Stojkovič in Žnidaršič Plazl, 2012).

Imobilizacija celic z izkoriščanjem magnetizma se je pokazala za izredno učinkovito in obenem preprosto tehniko. Postopek ne terja porabe dragih kemikalij in dolgih inkubacijskih časov, med tem ko so rezultati boljši od mnogih drugih tehnik. Pri tem sta bile tako produktivnost na suho maso katalizatorja, kakor tudi volumetrična produktivnost občutno višji, kot v poskusu s silanizacijo površine in kovalentnim pripetjem celic.

V mikrofluidnem sistemu je enostavno hitro in natančno spreminjati procesne pogoje. Takšni sistemi so zato zanimivi za razvoj in optimizacijo procesov in bi jih bilo smiselno vpeljati tudi v industrijske razvojne oddelke.

Imobilizacija z izkoriščanjem magnetizma je enostavna metoda imobilizacije kvasovk *S. cerevisiae* znotraj PFA mikoreaktorja. Čeprav podrobna študija ekonomskega vidika predstavljene metode ni bila opravljena, kombinacija poceni nanodelcev, majhne porabe energentov in vloženega časa nakazuje smotrnost razvoja tovrstnega sistema.

Pri tem je smiselno poudariti široko aplikativnost uporabe magnetnih nanodelcev v različne veje kemijskih, biokemijskih in bioloških znanosti. Edinstvena lastnost nanodelcev, da se odzivajo na prisotnost magnetnega polja, omogoča razvoj različnih medicinskih aplikacij, med katere sodijo dostava zdravil, bioseparacije, vključno z ločevanjem celic, slikanje z magnetno resonanco, , itd. Ob tem je pomembno, da magnetni nanodelci veljajo za biokompatibilne in netoksične. Enostavna in hitra imobilizacija tako celotnih celic, kakor tudi posameznih proteinov s pomočjo magnetnih nanodelcev, nudi možnosti izboljšave danes znanih postopkov, kot na primer encimska imunoabsorpcijska preiskava (ELISA), ki sodi med ene pogostejših tehnik tako v medicinskih, kakor tudi različnih drugih biokemijskih laboratorijih. Na ta način bi bilo mogoče s poenostavitvijo imobilizacije protiteles na notranji površini mikrokanala občutno zmanjšati čas, potreben za izvedbo analize.

5.2 SKLEPI

- Imobilizacija celic z izkoriščanjem magnetnega polja je bila uspešna, saj smo v mikrokanalu uspeli zadržati do 99 % vseh injiciranih celic. Metoda je enostavna in zahteva nižjo porabo, tako časa kakor reagentov v primerjavi z ostalimi metodami imobilizacije celic v mikrokanalu.
- Z magnetnim poljem lahko dosežemo imobilizacijo celic po celotnem volumnu in ne le na notranjih stenah mikrokanala.
- Magnetni nanodelci po do zdaj pridobljenih rezultatih ne penetrirajo v notranjost celic kvasovk, ampak se zadržijo na njihovi površini.

- Predhodna izpostavitve celic kvasovk magnetnim nanodelcem ne vpliva na njihovo sposobnost biotransformacije fumarne kisline v L-jabolčno kislino.

6 POVZETEK

V diplomskem delu smo izvedli biotransformacijo fumarne kisline v L-jabolčno kislino v mikrobioreaktorju. L-jabolčna kislina je organska kislina, ki ponuja širok spekter uporabe, saj je pomembna tako v živilski, kakor tudi farmacevtski industriji in medicini. Sodi na tretje mesto najbolj pogosto uporabljenih snovi za uravnavanje kislosti. Njena sinteza v industriji trenutno poteka iz maleinske in fumarne kisline, katere v večih korakih pridobivajo iz nafte.

Biotehnologija ponuja alternativo takšni metodi, ki temelji na izkoriščanju encima fumaraze za biotransformacijo fumarne v L-jabolčno kislino. Reakcijo smo izvedli s pomočjo imobiliziranih celic *Saccharomyces cerevisiae* v kontinuirno delujočem mikroreaktorskem sistemu in s tem pokazali, da je na ta način mogoče postaviti enostaven sistem za pridobivanje L-jabolčne kisline, ki omogoča visoke izkoristke, obenem pa ne zahteva dragih postopkov čiščenja. Za izvedbo biotransformacije v pretočnem sistemu smo izkoristili magnetno silo, s katero smo znotraj mikrokanala imobilizirali z magnetnimi nanodelci obdane celice *Saccharomyces cerevisiae*.

Visoko razmerje med površino in volumnom, laminarni tok tekočin in povečanje zmogljivosti s povečanjem števila osnovnih enot, predstavljajo bistveno razliko med konvencionalno in mikrofluidno tehnologijo. Zaradi enostavne kontrole procesnih parametrov so mikroreaktorji odlično orodje za optimizacijo procesov, njihova uporaba pa je smiselna tudi na industrijski ravni, kadar imamo opravka s snovmi z visoko dodano vrednostjo, ali kadar so v procesu prisotni vnetljivi, toksični ali eksplozivni materiali.

Pri proučitvi različnih vzorcev CoFe_2O_4 in Fe_3O_4 delcev, smo ugotovili, da so delci Fe_3O_4 omogočali višje odstotke imobiliziranih celic, zato smo se odločili, da bomo v nadaljnjih poskusih uporabljali slednje. Z mikroskopskim pregledom vzorca celic, ki so bile predhodno tretirane z nanodelci, smo potrdili domnevo, da se delci zadržujejo na površini celic in vsaj v večji meri ne penetrirajo v notranjost celic. Po proučitvi različnih pogojev, smo ugotovili, da je najprimernejši čas inkubacije celic in nanodelcev, preden vzorec injiciramo v mikrokanal, 15 minut. Ker pH imobilizacijskega medija v naših poskusih ni pokazal značilnih razlik v rezultatih uspešnosti imobilizacije, smo se odločili za uporabo citratno fosfatnega pufra s pH vrednostjo 7. Izvedli smo šaržni proces v centrifugirki in kontinuirni proces v mikroreaktorju. Ugotovili smo, da prisotnost nanodelcev na celicah ni statistično značilno vplivala na njihovo aktivnost, saj rezultati niso statistično značilno odstopali. Magnetno silo smo vzpostavili s približanjem dvajsetih neodimskih magnetov (volumen vsakega je bil 96 mm^3) mikrokanalu. Za tem smo proučili vpliv različnih zadrževalnih časov na uspešnost biotransformacije, ki smo jo preverili z analizo izhodnega vzorca na HPLC aparaturi.

Pri primerjavi izračunanih konverzij v mešalnem in pretočnem sistemu smo ugotovili, da smo v pretočnem sistemu uspeli doseči do 10 % višje konverzije pri krajših zadrževalnih časih. Koncentracija celic v mešalnem sistemu je bila sicer $5 \cdot 10^8$ celic mL^{-1} , v mikrokanalu

pa $2,04 \cdot 10^9$ celic mL^{-1} . Produktivnost na maso katalizatorja pri 60 % konverziji je bila v mešalnem sistemu $26 \text{ mmol mg}^{-1}_{\text{celic}} \text{ dan}^{-1}$ in v pretočnem sistemu $80 \text{ mmol mg}^{-1}_{\text{celic}} \text{ dan}^{-1}$.

Če povežemo predstavljene rezultate, porabo časa in sredstev, je naše raziskovalno delo nedvomno potrdilo smotrnost razvoja tovrstnega procesa. Opisana metoda imobilizacije bi bila lahko osnova za mnoge aplikacije, saj so konvencionalne metode praviloma veliko bolj zamudne in dražje. Metoda je po dosedanjih raziskavah neinvazivna in ne vpliva na živost in aktivnost celic. Ob enem so bile jasno vidne tudi prednosti mikrofluidike, med katere sodijo enostavno spreminjanje procesnih parametrov in visoki izkoristki.

7 VIRI

Abbott point of care.

<http://www.i-stat.com> (maj, 2016)

Agresti J. J., Antipov E., Abate A. R., Ahn K., Rowat A. C., Baret J. C., Marquez M., Klibanov A. M., Griffiths A. D., Weitz D. A. 2009. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Analytica Chimica Acta*, 107, 14: 4004–4009

Akay G., Erhan E., Keskinler B. 2004. Bioprocess intensification in flow-trough monolithic microbioreactors with immobilized bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 90, 2: 180 – 190

Akira I., Masashige S., Hiroyuki H., Takeshi K. 2005. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 1: 1-11

Andrade H. L., Kroutil W., Jamison F. T. 2014. Continuous flow synthesis of chiral amines in organic solvents: immobilization of *E. coli* cells containing both ω -transaminase and PLP. *Organic Letters*, 16: 6092 – 6095

Asanomi Y., Yamaguchi H., Miyazaki M., Maeda H. 2011. Enzyme-immobilized microfluidic process reactors. *Molecules*, 16: 6041-6059

Atalay Y. T., Vermeir S., Witters D., Vergauwe N., Verbruggen B., Verboven P., Nicolai B. M., Lammertyn J. 2011. Microfluidic analytical systems for food analysis. *Trends and Food Science & Technology*, 22: 286-404

Bolivar J. M., Weisbauer J., Nidetzky B. 2011. Biotransformation in microstructured reactors: more than flowing with the stream. *Trends in Biotechnology*, 29, 7: 303-342

C. A. Roa Engel, A. J. J. Straathof, T. J. Zijlmans, van Gulik W. M., L. A. M. van der Wielen. 2008. Fumaric acid production by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78: 379-389

Cernia E., Libori R., Macroni W., Soro S. 1995. Study of fumarase activity in nonconventional media. Part I. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1: 81-88

Chen A., Chitta R., Chang D., Amanullah A. 2008. Twenty-four well plate miniature bioreactor system as a scale-down model for cell culture process development. *Biotechnology and Bioengineering*, 102: 148-16

Cherry J. M., Hong E. L., Amundsen C., Balakrishnan R., Binkley G., Chan E. T., Christie K. R., Costanzo M. C., Dwight S. S., Engel S. R., Fisk D. G., Hirschman J. E., Hitz B. C., Karra K., Krieger C. J., Miyasato S. R., Nash R. S., Park J., Skrzypek M. S., Simison M., Weng S., Wong E. D., 2012, *Saccharomyces* genome database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 5, 10: 1081-1090

Deacon J. W. 2006. *Fungal biology*. 6. izdaja. Malden. MA: 384 str.

- Ellis J. L., Tomasko D. L., Dehghani F. 2008. Novel dense CO₂ technique for β -galactosidase immobilisation in polystyrene microchannels. *Biomacromolecules*, 9: 1027-1034
- Feldman H. 2010. *Yeast: molecular and cell biology*. Weinheim. Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 464 str.
- Gordian A., Metze J., Henkel T., Martin K., Roth M., Kohler J.;. 2004. Segmented flow generation by chip reactors for highly parallelized cell cultivation. *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 1421-1428
- Griffiths A. J. F., Wessler S. R., Lewontin R. C., Grlbsrt W. M., Suzuki D. T., Miller J. H. 2005. *Introduction to genetic analysis*. 8. izdaja. New York. W. H. Freeman: 782 str.
- Kaur J., Panesar P. S., Bera M. B., Kumar H. 2009. Hydrolysis of whey lactose using CTAB-permeabilized yeast cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32: 63-67
- Kim B. J., Wu M. 2012. Microfluidics for mammalian cell chemotaxis, invited review. *Annals of Biomedical Engineering*, 40, 6: 1316-1327
- Kitahara K., Fukui S., Misawa M. 1960. Preparation of L- malate from fumarate by a new process »enzymatic transcrystallization«. *The Journal of Generač and Applied Microbiology*, 6, 2: 108-116
- Krenkova J., Foret F. 2004. Immobilized Microfluidic encymatic reactors. *Electrophoresis*, 25: 3550-3563
- Li Y., Xu X., Yan B., Deng C., Yu W., Yang P., Zhang X. 2006. microchip reactor with metal-ion chelated magnetic silica microspheres for highly efficient proteolysis. *Journal of proteome research*, 6: 2367-2375
- Liese A., Seelbach K, Wandrey C. 2000. *Industrial biotransformations*. Weinheim. Wiley: 570 str.
- Madigan T. M., Martinko M. J., Parker J. 2000. *Brock; Biology of microorganisms*. 9th Edition. New Jersey. Upper Saddle River: 991 str.
- Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*: 40: 1451-1463
- Matsunaga T., Suzuki T., Tanaka M., Arakaki A. 2007. Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano-biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 25, 4: 182-188
- Min K., Yoo J. Y. 2014. Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its appliction. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19: 553-567

- Mistlberger G., Koren K., Scheucher E., Aigner D., Borisov S. M., Zankel A., Polt P., Klimat I. 2010. Multifunctional magnetic optical sensor particles with tunable sizes for monitoring metabolic parameters and as basis for nanotherapeutics. *Advanced Functional Materials*, 20: 1842-1851
- Miyazaki M., Maeda H. 2006. Microchannel enzyme reactors and their applications for processing. *Trends in Biotechnology*, 24, 10: 463-470
- Mohanraj V. J., Chen Y. 2006. Nanoparticles – a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 1: 561-573
- NCBI: National Center for Biotechnology Information.
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid4932\[orgn\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid4932[orgn]) (maj, 2016)
- Nomura A., Shin S., Mehdi O. O., Kauffmann J.-M. 2004. Preparation, characterization, and application of an enzyme-immobilized magnetic microreactor for flow injection analysis. *Analytical Chemistry*, 76: 5498-5502
- Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J. 2000. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64, 34: 34-50
- Pandya P. H., Jasra R. V., Newalkar B. L., Bhatt P. N. 2005. Studies on activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 77: 67-77
- Pines O., Even-Ram S., Elnathan N., Battat E., Aharonov O., Gibson D., Goldberg I. 1997. The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46: 393-399
- Pohar A., Plazl I., Žnidaršič-Plazl P. 2009. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/n heptane two-phase system at the microreactor scale. *Lab on a Chip*, 9: 3385-3390
- Rajapakse K. 2013. Ugotavljanje toksičnosti nanodelcev s praživaljo *Tetrahymena thermophila*. Doktorska disertacija. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani. 100 str.
- Ramsey H. S., Schultz G. R. 1991. Preparation of malic acid. Pisarna za patente in blagovne znamke Združenih držav Amerike. US 5210295
- RCS PDB. An Information to Biological Macromolecular Structures.
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1YFM> (maj, 2016)
- Regev-Rudzki N., Battat E., Goldberg I., Pines O. 2009. Dual localization of fumarase is dependent on the integrity of the glyoxylate shunt. *Molecular Microbiology*, 72, 2: 297-306
- Roberge D. M., Durcy L., Bieler N., Cretton P., Zimmermann B. 2005. Microreactor technology: a revolution for the fine chemical and pharmaceutical industries. *Chemical Engineering and Technology*, 28: 318 – 323

Roberge D. M., Gottsponer M., Eyholzer M., Kockmann N. 2009. Industrial design, scale up and use of microreactors. *Chemistry Today*, 27, 4: 8-11

SGD: *Saccharomyces* Genome Database.

<http://www.yeastgenome.org/locus/S000006183/overview> (maj, 2016)

Sacchettini J.C., Meininger T., Roderick S., Banaszak L.J. 1986. Purification, crystallization and preliminary X-ray data for porcine fumarase. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 15183-15185

Sauer M., Porro D., Mattanovich D., Branduardi P. 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets, *Trends in Biotechnology*, 26: 100-108

Schüller D., Frankel R. B. 1999. Bacterial magnetosome: microbiology, biomineralization and biotechnological application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 4: 464-473

Schwegmann H., Feitz J. A., Frimmel F. H. 2010. Influence of the zeta potential on the sorption and toxicity of iron oxide nanoparticles on *S. cerevisiae* and *E. coli*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 347: 43-48

Song Y. S., Shin H. Y., Lee Y. J., Park C., Kim S. W. 2012. β -Galactosidase-immobilised microreactor fabricated using a novel technique for enzyme immobilisation and its application for continuous synthesis of lactulose. *Food Chemistry*, 133: 611-617

Sheldon R. A. 2007. Enzyme Immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349, 8-9

Stein I., Peleg Y., Even-Ram S., Pines O. 1994. The single translation product of the FUM1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Sacharomyces cerevisiae*. *Molecular. Cell Biology*, 14, 7: 4770-4778

Stojković G., Plazl I., Žnidaršič-Plazl P. 2010. L-Malic acid production within a microreactor with surface immobilised fumarase. *Microfluidics Nanofluidics*, 10: 627-635

Stojković G., Žnidaršič-Plazl P. 2012. Continuous synthesis of L-malic acid, using whole cell microreactor. *Process Biochemistry*, 47: 1102-1107

Stojković G. 2013. Razvoj mikoreaktorjev z imobiliziranimi biokatalizatorji za študij biotransformacij. Doktorska disertacija. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Univerza v Ljubljani: 99 str.

Stojković G., Krivec M., Vesel A., Marinšek M., Žnidaršič-Plazl P. 2014. Surface cell immobilization within perfluoroalkoxy microchannels. *Applied Surface Science*, 320: 810-817

- Stojković G., Marinšek M., Drobne D., Žnidaršič-Plazl P. 2016. Whole-cell biotransformation within magnetic-field assisted microreactor, using magnetic nanoparticles. (neobjavljeno, članek v pripravi)
- Šalić A., Pindrić K., Podrepšek Hojnik G., Leitgeb M., Zelić B. 2013. ADH oxidation in a microreactor catalyzed by ADH immobilized on γ -Fe₂O₃ particles. *Green Processing and Synthesis*, 2: 6: 569-578
- Tazhibaeva S. M., Musabekov K. B., Orazymbetova A. B., Zhubanova A. A. 2003. Surface properties of yeast cells. *Colloid Journal*, 65, 1: 122-124
- Vrsalović Presečki A., Zelić B., Vasić-Rački Đ. 2007. Comparison of the L-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 605-612
- Vrsalović Presečki A., Zelić B., Vasić-Rački Đ. 2009. Modelling of continous L-malic acid production by porcine heart fumarase and fumarase in yeast cells. *Chemical and Biochemical Engineering*, 23: 519-25
- Weaver T., Banaszak L. 1996. Crystallographic studies of the catalytic and a second site fumarase c from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 35: 13955-13965
- Wirth T. 2013. *Microreactors in organic chemistry and catalysis*. 2. izdaja. Nemčija. Wiley, VCH: 477 str.
- Wohlgemuth R., Plazl I., Žnidaršič-Plazl P., Gernaey K. V., Woodley J. M. 2015. Microscale technology and biocatalytic processes: oppurtunities and challenges for synthesis. *Trends in Biotechnology*, 33, 5: 302-314
- Wu M., Tzagoloff A. 1987. Mitochondrial and cytoplasmic fumarases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single nuclear gene FUM1. *Jornual of Biological*, 262, 25: 12275-12282
- Žnidaršič-Plazl P., H. Podgornik. 2005. *Vaje iz biotehnologije*. 1. izdaja. Ljubljana. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 80 str.
- Žnidaršič-Plazl P., Plazl I. 2007. Steroid extraction in a microchannel systemathematical modeling and experiments. *Lab on a Chip*, 7: 883-889.
- Žnidaršič-Plazl P., Plazl I. 2009. Modeling and experimental studies on lypase catalysed isoamyl acetate synthesis in a microreactor. *Process Biochemistry*, 44, 10: 1115-1121
- Žnidaršič-Plazl P., Plazl I. 2011. *Microbioreactors*. V: *Comprehensive biotechnology*, Moo-Young M. (ur.) Elsevier. 2: 289-301
- Yi C., Li C., Ji S., Yang M. 2006. Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells. *Analitica Chimica Acta*, 560: 1-23

ZAHVALA

Želim se najlepše zahvaliti svoji mentorici, izr. prof. dr. Poloni Žnidaršič Plazl, ne le za strokovno vodenje, temveč tudi vso podporo, spodbudo in razumevanje, ki mi ga je nudila. Iskrena hvala.

Hvala prof. dr. Poloni Jamnik za temeljito recenzijo in vlivanje pozitivnih misli zadnje dni pred zagovorom.

Iskrena hvala osebju v laboratoriju Katedre za kemijsko, procesno, okoljsko in biokemijsko inženirstvo za prijetno vzdušje in pomoč pri delu. Pri tem gre posebna zahvala dr. Gorazdu Stojkoviču, Nataši Miložič in Mojci Seručnik, Marijanu Bajiću in Klemnu Birtič. Za pomoč pri izvedbi eksperimentov posebna hvala tudi izr. prof. dr. Marjanu Marinšku iz Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, ter dr. Sari Novak in izr. prof. dr. Damjani Drobne iz Biotehniške fakultete. Hvala tudi osebju na Inštitutu za analizo kemijo in kemijo živil Tehniške univerze v Gradcu za sodelovanje pri eksperimentalnem delu.

Hvala prof. dr. Cirilu Poharju in doc. dr. Andreju Poharju za pomoč tekom študija in med nastajanjem diplomskega dela, brez katere bi bila moja pot veliko težja.

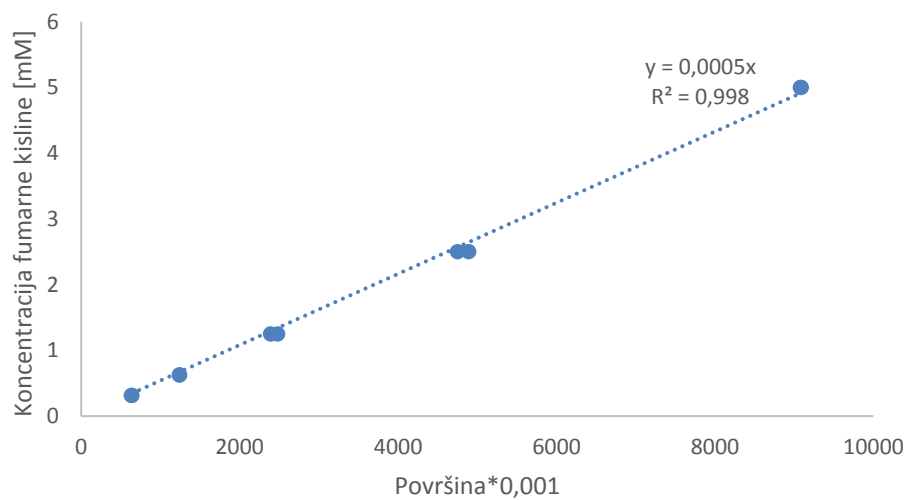
Posebna zahvala gre moji družini: mojima staršema, Silvi in Francu Njegač, ki sta mi omogočila študij in mi vlivala moči tudi takrat, ko je bilo težko videti cilj; mojemu sinu, Klemnu Poharju, ki je stiskal pesti in predstavljal največjo motivacijo, kar se je da; naši Sabini Janžekovič za pomoč pri prevajanju; mojemu bratu, Primožu Njegač, ki je še zadnjo noč pred tiskanjem naloge preživel z mano za računalnikom in mi pomagal pri ustvarjanju končne oblike.

Hvala vsem prijateljem, ki so polepšali moja študentska leta. Hvala Ines Lokar in Ninotu Demo, ki sta pazila sina Klemna, ko je bil urnik najbolj natrpan. Hvala Jerneju Stavbar za vse ure in dneve in tedne, ko sem sedela pred knjigami in je poskrbel, da nisem imela nobenih drugih skrbi.

Hvala vsem, ki tukaj niste omenjeni in ste kakorkoli pripomogli k nastanku pričujočega izdelka.

PRILOGA A

Umeritvena krivulja: Koncentracija fumarne kisline v 0,1 M citratno fosfatnem pufru pH vrednosti 7 v odvisnosti od površine vrha pri HPLC analizi.



PRILOGA B

Umeritvena krivulja: Koncentracija jabolčne kisline v 0,1 M citratno fosfatnem pufru pH vrednosti 7 v odvisnosti od površine vrha pri HPLC analizi.

