

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jernej JERMAN

**PRIPRAVA IN UPORABA STABILIZIRANIH OBLIK
ENCIMOV KETOREDUKTAZE (KRED) TER
LIPAZE CaLB**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jernej JERMAN

**PRIPRAVA IN UPORABA STABILIZIRANIH OBLIK ENCIMOV
KETOREDUKTAZE (KRED) TER LIPAZE CaLB**

MAGISTRSKO DELO

**PREPARATION AND APPLICATION A STABILIZED FORM OF
ENZYMES KETOREDUCTASE (KRED) AND LIPASE CaLB**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Biotehnologija.

Vse raziskave, poskuse in kemične analize, ter statistično in računalniško obdelavo podatkov sem opravil v laboratorijih podjetja KRKA, d. d., Novo mesto.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bil za mentorja magistrskega dela imenovan prof. dr. Marin Berovič, za somentorja doc. dr. Aleš Gasparič in za recenzenta prof. dr. Gregor Anderluh.

Komisija za oceno in predstavitev:

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

Član: prof. dr. Marin BEROVIČ
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za kemijsko in biokemijsko inženirstvo

Član: doc. dr. Aleš GASPARIČ
Krka, d. d., Novo mesto, Kemijski razvoj, Oddelek za biokemijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Datum predstavitve:

Podpisani izjavljam, da je naloga 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.

Jernej JERMAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 606:62:577.15(043.2)
KG Stabilizacija encimov/Ketoreduktaza/Lipaza/CLEA/Sepabeads EC-HA
AV JERMAN, Jernej, dipl. bioteh. (UN)
SA BEROVIČ Marin (mentor)/GASPARIČ Aleš (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2015
IN Priprava in uporaba stabiliziranih oblik encimov ketoreduktaze (KRED) ter lipaze CaLB
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XI, 77 str., 32 pregl., 56 sl., 1 pril., 66 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Ključni dejavniki, ki pogojujejo uporabnost encimov v industriji, so njihova dolgoročna stabilnost, vpliv na izplen in kakovost proizvodov v zaključnih procesih ter možnost njihove ponovne uporabe. Imobilizirani encimi ponujajo nekatere operativne prednosti v primerjavi z raztopljenimi encimi. Na osnovi lastnih študij ter podatkov iz literature, smo želeli razviti najugodnejši način stabilizacije encimov ketoreduktaz (KRED) in lipaz (CaLB). KRED smo stabilizirali brez uporabe nosilcev, in sicer s pripravo encimskih agregatov. Pripravili smo tudi zamrežene encimske aggregate imenovane CLEA KRED. Ugotovili smo, da ima KRED v obliki encimskih agregatov za 25 % višjo aktivnost v primerjavi z neoborjenimi KRED, obenem pa so oborjeni stabilnejši, saj so po več ciklih delovanja ohranili svojo prvotno aktivnost, medtem ko je pri nativnih encimih aktivnost padla po osmem ciklu delovanja na 73 %. Delovanje nativnih in agregiranih encimov KRED smo testirali tudi v gostih in viskoznih medijih, kjer je konverzija z aggregati KRED po pričakovanjih potekala za skoraj tretjino počasneje od konverzije z nativnimi encimi, in sicer zaradi počasnejše izmenjave snovi v reakcijski mešanici. Izvedli smo imobilizacijo lipaze CaLB, in sicer z njenkovalentno vezavo na nosilec Sepabeads EC-HA, kar smo izvedli na dva različna načina. Z aktivacijo nosilca smo pripravili imobiliziran CaLB z višjo aktivnostjo (130,8 %), z vezavo oksidiranih encimov pa CaLB z nižjo aktivnostjo od neimobiliziranih encimov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 606:62:577.15(043.2)
CX Enzyme stabilization/Ketoreductase/Lipase/CaLB/Sepabeads EC-HA
AU JERMAN, Jernej
AA BEROVIČ Marin (supervisor)/GASPARIČ Aleš (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TI Preparation and application a stabilized form of enzymes ketoreductase (KRED) and lipase CaLB
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XI, 77 p., 32 tab., 56 fig., 1 ann., 66 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The key factors that determine the usefulness of enzymes in the industry are their long-term stability, impact on yield and quality of products in the downstream processing and the possibility of their re-use. Immobilized enzymes provide a certain operational advantages compared to dissolved enzymes. Based on existing literature, we wanted to develop the protocol for immobilization of enzymes ketoreductase (KRED) and lipase (CaLB). Enzymes KRED were stabilized with the preparation of enzymes aggregates. In addition, cross – linked enzyme aggregates called CLEA KRED were prepared without the use of carriers. It has been found that the immobilized form of KRED (in the aggregate form of the enzyme) has 25 % higher activity compared to native KRED. The precipitated enzymes were stable, since after several cycles of operation to maintain its original activity, while the native enzymes activity decreased after the eighth cycle of operation at 73 %. Functioning of native and aggregated enzymes KRED were tested in a dense and viscous media. Due to slower exchange of substances in the reaction mixture, (as was expected) it was shown that conversion by KRED aggregates, took place for almost a third slower than the conversion rate of the native enzymes. The immobilization of enzyme lipase CaLB by its covalent bonding to the support Sepabeads EC-HA was carried out in two different ways. By binding enzyme on activated carrier we prepared immobilized CaLB which activity was 130.8 %. By binding enzyme on carrier through oxidation of the enzyme, we prepared the coupled enzymes which have less activity compared to the activity of unbound enzyme.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI NALOGE	1
1.2. DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 IMOBILIZACIJSKE TEHNOLOGIJE.....	3
2.1.1 Imobilizacija encimov na trden nosilec	5
2.1.2 Imobilizacija encimov z zamreženjem brez uporabe nosilca	6
2.2 ENCIMI.....	10
2.2.1 Ketoreduktaze.....	11
2.2.2 Esteraze in lipaze	13
2.3 OBARJANJE PROTEINOV	16
2.3.1 Obarjanje z izsoljevanjem	16
2.3.2 Obarjanje z organskim topilom	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI.....	18
3.1.1 Kemikalije	18
3.1.2 Pufri, raztopine, reagenti	18
3.1.3 Encimi	20
3.1.4 Laboratorijska oprema	20
3.2 METODE UPORABLJENE PRI IMOBILIZACIJI KRED.....	21
3.2.1 Določitev koncentracije proteinov	22
3.2.2 Določitev aktivnosti encimov	25
3.2.3 Obarjanje KRED.....	26
3.2.4 Priprava CLEA KRED	27

3.2.5 Določitev aktivnosti nativnega in oborjenega encima KRED pri različnih temperaturah, vrednostih pH ter ponovni uporabi	32
3.2.6 Testiranje delovanja oborjenega KRED v simuliranem industrijskem okolju oziroma reakciji.....	34
3.3 METODE UPORABLJENE PRI IMOBILIZACIJI CaLB	38
 3.3.1 Vezava CaLB na nosilec Sepabeads EC-HA z oksidacijo encima.....	39
 3.3.2 Vezava CaLB na nosilec Sepabeads EC-HA preko aktivacije nosilca	39
 3.3.3 Določitev količine vezanega encima na nosilec sepabeads EC-HA	40
 3.3.4 Določitev kinetike na nosilec vezanih CaLB	42
 3.3.5 Določitev količine encimov v reakciji kinetike.....	44
4 REZULTATI	46
 4.1. PRIPRAVA IN DOLOČITEV AKTIVNOSTI AGREGATOV KRED	46
 4.1.1 Umeritvena krivulja za določitev NADPH.....	46
 4.1.2 Optimizacija obarjanja encima KRED z nasičeno raztopino amonsulfata	46
 4.1.3 Optimizacija obarjanja encima KRED z acetonom	48
 4.2 VPLIV ZAMREŽEVALCA	50
 4.2.1 Vpliv glutaraldehyda na nativni encim KRED.....	50
 4.2.2 Vpliv dekstranaldehyda na aktivnost KRED	51
 4.3 PRIPRAVA IN DOLOČITEV AKTIVNOSTI CLEA KRED.....	52
 4.3.1 Določitev kinetike in naklona reakcije.	52
 4.3.2. Določitev količine encima v reakciji kinetike.....	53
 4.3.3 Priprava KRED CLEA – z dekstranaldehidom	56
 4.3.4 Priprava KRED CLEA s pomožnim proteinom BSA	56
 4.4 DOLOČITEV AKTIVOSTI NATIVNEGA IN OBORJENEGA ENCIMA KRED PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH, VREDNOSTIH PH TER PONOVNI UPORABI.....	57
 4.4.1 Vpliv temperature na aktivnost encima KRED.....	57
 4.4.2 Vpliv pH na aktivnost encima KRED.....	58
 4.4.3 Stabilnost KRED po več ciklih delovanja	58
 4.5 TESTIRANJE DELOVANJA OBORJENEGA ENCIMA KRED V SIMULIRANEM INDUSTRIJSKEM OKOLJU OZIROMA REAKCIJI.....	59
 4.5.1 Test v 30 mL serumskih stekleničkah (V = 15 mL).....	59
 4.5.2 Test v reaktorju (V = 2L).....	61
 4.6 USPEŠNOST VEZANJA ENCIMA CaLB NA NOSILEC.....	63

4.6.1 CaLB vezan na nosilec (vezava preko oksidacije encima).....	63
4.6.2 CaLB vezan na nosilec (vezava preko aktivacije nosilca).....	64
4.7 DOLOČITEV AKTIVNOSTI NA NOSILEC VEZANIH CaLB	65
 4.7.1 Kinetika na nosilec vezanih CaLB	65
 4.7.2 Določitev napak pri vzorčenju za kinetiko.....	65
 4.7.3 Določitev količine CaLB v reakciji kinetike.....	66
 4.7.4 Umeritvena krivulja za p-nitrofenol.....	67
 4.7.5 Aktivnost	67
5 RAZPRAVA	68
6 SKLEPI	72
7 POVZETEK.....	73
8 VIRI.....	74
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Dejavniki, ki jih je potrebno upoštevati pri imobilizaciji encimov (Hanefeld in sod., 2009).....	4
Preglednica 2: Sestava elektroforeznega pufra	18
Preglednica 3: Priprava 5× pufra za denaturacijo vzorcev za NaDS-PAGE.....	18
Preglednica 4: Priprava 50 mM K-fosfatni pufer.....	19
Preglednica 5: Priprava 50 mM K ₂ HPO ₄	19
Preglednica 6: Priprava 50 mM KH ₂ PO ₄	19
Preglednica 7: Priprava 50 mM Na-acetatnega pufra	19
Preglednica 8: Sestava elektroforeznega gela	19
Preglednica 9: Sestava raztopine za barvanje gelov.....	19
Preglednica 10: Raztopina za razbarvanje gelov.....	20
Preglednica 11: Sestava raztopin za pripravo Lowryjeve raztopine	20
Preglednica 12: Količine reagentov zaobarjanje KRED	27
Preglednica 13: Razporeditev vzorcev na gelu za NaDS-PAGE elektroforezo	32
Preglednica 14: Vezava nativnega CaLB na aktiviran nosilec Sepabeads EC-HA.....	40
Preglednica 15: Potrebne meritve mas posameznih komponent pred sušenju v liofilizatorju.....	45
Preglednica 16: Delež ujemanja vrednosti koncentracij raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo reakcij kinetike z amonsulfatom oborjenimi KRED	47
Preglednica 17: Izračun aktivnosti z amonsulfatom pripravljenimi agregati	47
Preglednica 18: Delež ujemanja vrednosti koncentracij raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo reakcij kinetike z acetonom oborjenimi KRED.....	49
Preglednica 19: Izračun aktivnosti z acetonom pripravljenimi agregati	49
Preglednica 20: Aktivnosti encima KRED ob dodatku razredčenega zamreževalca glutaraldehyda	51
Preglednica 21: S programom SynGene določene koncentracije proteinov	55
Preglednica 22: Aktivnost CLEA KRED v primerjavi z nativnim KRED	56
Preglednica 23: Aktivnosti CLEA KRED z različnim deležem pomožnega proteina BSA	56
Preglednica 24: Delež produkta v prvih šestih urah (3,25 mg KRED)	59
Preglednica 25: Delež produkta v prvih šestih urah (drugi poskus – 2 mg).....	60
Preglednica 26: Konverzija substrata v simuliranem industrijskem okolju, z agregati KRED (V = 2L)	61
Preglednica 27: Konverzija substrata v simuliranem industrijskem okolju, z nativnim KRED (V = 2L)	61
Preglednica 28: Izmerjene koncentracije proteinov v različnih redčitvah supernatantov ter deleži odstopanja.....	63
Preglednica 29: Izračun vezanega CaLB na 1 g vlažnega nosilca	63
Preglednica 30: Določene koncentracije nevezanih encimov v supernatantih.....	64
Preglednica 31: Izračun vezanega CaLB na 1 g mokrega nosilca.....	64
Preglednica 32: Deleži odstopanj nastalih pri vzorčenju med reakcijo kinetike	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Različni pristopi imobilizacije encimov brez uporabe nosilcev	4
Slika 2: Heksametilamin – funkcionalna skupina na nosilcu sepabeads EC-HA	5
Slika 3: Shema aktivacije aminske skupine z glutaraldehidom in vezava encima (Hanefeld in sod., 2009).....	6
Slika 4: Shematični prikaz priprave CLEA (Sheldon, 2007)	8
Slika 5: Ohranjanje aktivnosti in topnost encima v prisotnosti različnih koncentracij obarjalnega sredstva.....	9
Slika 6: Skupna tridimensionalna struktura aldo-ketoreduktaz (Jez in sod., 1997)	11
Slika 7: Aktivno mesto aldo-ketoreduktaz (Jez in sod., 1997).....	12
Slika 8: Vezava NADP v aktivno mesto aldo-ketoreduktaz. Prikazane so povezave molekule z aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu encima (Jez in sod., 1997).....	12
Slika 9: CaLB (Idris in Bukhari, 2012)	14
Slika 10: Enantioselektivna hidroliza racemata acetamida (R,S)-133 razvita v podjetju Bayer (Ghanem in Aboul-Enein, 2005)	15
Slika 11: Naboj proteinov v raztopini	16
Slika 12: Shema dela pri imobilizaciji encima KRED	21
Slika 13: Nastanek poliakrilamida (Menter, 2000)	23
Slika 14: Elektroforezne komponente za izvedbo NaDS-PAGE elektroforeze	24
Slika 15: Shema reakcije oksidacije 2-propanola v prisotnosti NADP	25
Slika 16: Priprava CLEA (Mahmod in sod., 2014)	28
Slika 17: Testiranje delovanja oborjene KRED v 30 mL serumskih stekleničkah	35
Slika 18: BIAZZI – reaktor sistem (levo) in mešalo – turbina (desno).....	36
Slika 19: Skica priprave in postavitev TLC	37
Slika 20: Shematični prikaz rezultata TLC analize vzorcev	37
Slika 21: Shema dveh načinov imobilizacije encima CaLB na trden nosilec	38
Slika 22: Pretvorba 4-nitrofenilacetata v p-nitrofenol z lipazo	42
Slika 23: Shema določitve deleža mase navlaženega nosilca (pripravljenega v 3.3.1) v primerjavi z mokrim nosilcem (uporabljenim pri kinetiki v točki 3.3.4.2).	44
Slika 24: Umeritvena krivulja NADPH (levo: v $\mu\text{mol}/\text{mL}$, desno: v $\mu\text{g}/\text{mL}$)	46
Slika 25: Kinetika z amonsulfatatom oborjenim KRED	46
Slika 26: Aktivnost neoborjenega KRED in z nasičeno raztopino amonsulfata oborjenega KRED	48
Slika 27: Kinetika z acetonom oborjenim KRED	48
Slika 28: Aktivnost neoborjenega KRED in z nasičeno raztopino amonsulfata oborjenega KRED	49
Slika 29: Agregati KRED (oborjeni z 50 % v/v acetonom)	50
Slika 30: Kinetika oksidacije IPA, ki jo katalizirajo nativni KRED zamreženi z raztopino glutaraldehyda	50
Slika 31: Vpliv glutaraldehyda na aktivnost KRED	51
Slika 32: Kinetika oksidacije IPA, ki jo katalizirajo nativni KRED zamreženi z raztopino glutaraldehyda	51
Slika 33: Vpliv dekstranaldehyda na aktivnost KRED	52

Slika 34: Kinetika nativnega KRED in CLEA KRED	52
Slika 35: Obarvani žepki 1. gela	53
Slika 36: Slika 1. gela s programom SynGene	53
Slika 37: Obarvani žepki 2. gela	54
Slika 38: Slika 2. gela s programom SynGene	54
Slika 39: CLEA KRED pod mikroskopom ($1000\times$ povečava)	56
Slika 40: Aktivnosti CLEA KRED z različnim deležem pomožnega proteina BSA	57
Slika 41: Vpliv različnih temperatur na aktivnost nativnega KRED in oborjenega KRED	57
Slika 42: Vpliv pH vrednosti reakcijske mešanice na aktivnost nativnega in oborjenega KRED ...	58
Slika 43: Prikaz aktivnosti nativnega KRED in oborjenega KRED po osmih ciklih delovanja	58
Slika 44: Primerjava aktivnosti oborjenega KRED in nativnega KRED (3,25 mg KRED).....	60
Slika 45: Kinetika nastalega produkta v prvih šestih urah (2 mg KRED).....	60
Slika 46: Primerjava aktivnosti oborjenega KRED in nativnega KRED (2 mg KRED).....	61
Slika 47: Hitrost nastajanja proizvoda – primerjava učinkovitosti oborjenega in nativnega encima v simuliranem industrijskem okolju oziroma reakciji ($V = 2L$)	62
Slika 48: Primerjava aktivnosti oborjenega KRED in nativnega KRED ($V = 2L$)	62
Slika 49: Umeritvena krivulja za oksidiran CaLB	63
Slika 50: Umeritvena krivulja za nativen CaLB	64
Slika 51: Kinetika nativnega CaLB brez nosilca (levo)	65
Slika 52: Kinetika CaLB preko oksidacije encima vezanega na nosilec (desno).....	65
Slika 53: Kinetika CaLB vezanega na z glutaraldehidom aktiviran nosilec	65
Slika 54: Shema določitve deleža mase navlaženega nosilca v primerjavi z mokrim nosilcem z vezanim encimom.....	66
Slika 55: Umeritvena krivulja za p-nitofenol	67
Slika 56: Aktivnost različno pripravljenih vezanih CaLB v primerjavi z nevezanim CaLB	67

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
ADH	alkoholne dehidrogenaze
BSA	goveji serumski albumin
CaCl ₂	kalcijev klorid
CaLB	lipaza iz kvasovke <i>Candida antarctica</i>
CLE	navzkrižno zamreženi encimi
CLEA	navzkrižno zamreženi encimski agregati
CLEC	navzkrižno zamreženi kristali encimov
CSDE	navzkrižno zamrežen prah encimov
CuSO ₄ × 5H ₂ O	bakrov(II) sulfat pentahidrat
dH ₂ O	destilirana voda
DKR	dinamična kinetična resolucija
DME	dimetil eter
DMF	dimetil fumarat
DMSO	dimetil sulfoksid
HCl	klorovodikova kislina
K ₂ HPO ₄	kalijev hidrogen fosfat
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogen fosfat
Konc.	koncentracija snovi
KRED	ketoreduktaza
Na ₂ CO ₃	natrijev karbonat
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfat (oksidirana oblika)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat (reducirana oblika)
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
Sepabeads EC-HA	polimetakrilni nosilec s funkcionalno skupino heksametilaminom
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilentiamin
% (v/v)	volumski delež

1 UVOD

Trajnostni razvoj industrije narekuje trend k zmanjšanju porabe energije in surovin, hkrati pa tudi k zmanjšanju količin odpadkov in stranskih toksičnih produktov. Tem sodobnim smernicam sledita z uporabo encimov v sinteznih in zaključnih procesih tudi kemijska in farmacevtska industrija.

Preden so encime začeli uporabljati v industrijskem merilu, so morali tehnologi in raziskovalci odpraviti še nekatere pomanjkljivosti, ki se pojavljajo pri biokatalizi. Strošek encimov je ključen dejavnik, še posebej, če jih lahko uporabimo samo enkrat oziroma če so nestabilni. Stabilnost encimov je torej pomembna v kontekstu vsake posamezne šarže, še bolj pa v primeru, ko isto dozo encima porabimo v seriji zaporednih šarž biokatalize. Pogoj za ponovno uporabo iste doze encimov je, da jih lahko po vsakem zaključenem procesu ločimo iz reakcijske mešanice (Gustafsson, 2012).

Z imobilizacijo encimov na različne nosilce so močno izboljšali stabilnost encimov v industrijskih procesih, kjer jih je lažje ločiti iz reakcijske mešanice, ter ponovno uporabiti, kar močno zniža proizvodne stroške. Poznamo več načinov stabilizacije encimov. Od imobilizacije na različne nosilce, do priprave navzkrižno povezanih encimskih agregatov, ter kombinacij. Glede na proces, tip in strukturo encima, v praksi uporabljajo različne pristope.

V zadnjem času se zelo razvija področje, ki se ukvarja z imobilizacijo encimov brez uporabe nosilcev. Raziskave na tem področju je sprožila ugotovitev, da uporaba nosilcev lahko privede do zmanjšanja aktivnosti, zaradi nepotrebnega balasta, ki lahko moti dostop substrata do aktivnega mesta v encimu. Posledično se to odrazi na manjših izkoristkih v procesu. Težavam, ki jih lahko prinese nosilec, se izognemo s pripravo samo agregiranih encimov ali encimov, ki so imobilizirani brez nosilca (Bornscheuer, 2003).

1.1 CILJI NALOGE

1. Priprava encimskih agregatov, navzkrižno povezanih encimskih agregatov (ang. cross-linked enzyme aggregates, CLEA) ter imobiliziranih oblik encimov ketoreduktaze KRED in lipaze CaLB,
2. preveriti možnost njihove ponovne in večkratne uporabe,
3. doseči višjo aktivnost in/ali večjo stabilnost obeh encimov.

1.2. DELOVNE HIPOTEZE

Predhodne študije na področju imobilizacije encimov so pokazale, da so imobilizirani encimi stabilnejši in v nekaterih primerih tudi aktivnejši od neimobiliziranih encimov. Predpostavljam, da so oborjeni ali navzkrižno povezani encimi ketoreduktaz stabilnejši in/ali aktivnejši od nativnih ketoreduktaz.

Z vezavo lipaze na nosilec želimo preveriti, ali kljub študijam, ki so pokazale, da pri nekaterih encimih vezava encima na nosilec privede do zmanjšane aktivnosti, lahko pripravimo vezano lipazo, ki bo ohranila aktivnost. Predpostavljam, da bomo pripravili na nosilec vezano lipazo z aktivnostjo, ki bo enaka kontroli.

- *Ketoreduktaze (KRED)* oziroma alkoholne dehidrogenaze (ADH) uporabljamo kot pomožne encime za (re)generacijo reduciranih oblik kofaktorjev NADP in NAD. Zelo pogosto pa jih uporabljamo kot »glavne encime«, ki simultano, v istem sistemu opravljajo redukcijo ketona do alkohola (praviloma je to ciljni substrat/proizvod), obenem pa v isti reakcijski mešanici z oksidacijo 2-propanola v aceton, reducirajo NADP v NADPH. V našem primeru ima KRED samo pomožno vlogo. V prvem delu naloge bomo opisali pripravo stabiliziranih oblik encima KRED, agregatov ter CLEA, izbrali bomo aktivnejšo obliko ter ugotovili, ali so v eksperimentalnem okolju aktivnejši ter bolj stabilni od nativne KRED. Najaktivnejšo obliko bomo testirali tudi v reakcijski mešanici, ki bo po gostoti in viskoznosti podobna nekaterim industrijskim mešanicam. Na podlagi homologije drugih podobnih primerov pričakujemo, da bo struktura imobiliziranega encima bolj dostopna in bo aktivnost imobiliziranih encimov boljša. Hkrati pa se zavedamo na osnovi drugih podatkov iz literature, da to vedno ni mogoče.
- *Lipaza (CaLB)* je ena od najuporabnejših industrijskih esteraz, saj zagotavlja pretvorbo zelo širokega nabora substratov (predvsem estrov, kislin, alkoholov, aminov ...). Poleg tega je v ustreznih reakcijskih mešanicah ter reakcijskih pogojih strogo stereoselektivna. Uporabna je tako v hidroliznih reakcijah v vodnih medijih, ter vrsti reakcij v nevodnih medijih za preestritve, aminolizo, amonolizo, alkoholizo in podobno. Zaradi svoje izrazite stereoselektivnosti je primerna za kiralno sintezo ter kiralne ločbe racemnih substratov. Pogosto tudi v reakcijah dinamične kiralne ločbe, v kombinaciji z anorganskimi katalizatorji (racemizacija enega enantiomera). V okviru naloge bomo pripravili lastno imobilizirano lipazo CaLB, ter njeni aktivnost in stabilnost primerjali s komercialno dostopnimi viri tege encima. CaLB bomo vezali na nosilec sepabeads EC-HA (Mitsubishi). Pričakujemo, da bo imobilizacija encima na nosilec uspešna in bo ugodno delovala na aktivnost ali stabilnost encimov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMOBILIZACIJSKE TEHNOLOGIJE

Obstajajo številni postopki imobilizacije encimov, ki jih lahko razvrstimo v tri kategorije. Vezava encima na nosilec, zamreženje encima v organske ali anorganske polimere, ter imobilizacija encima brez nosilca.

1. **Vezava na nosilec** – je lahko fizikalna, ionska ali kovalentna.

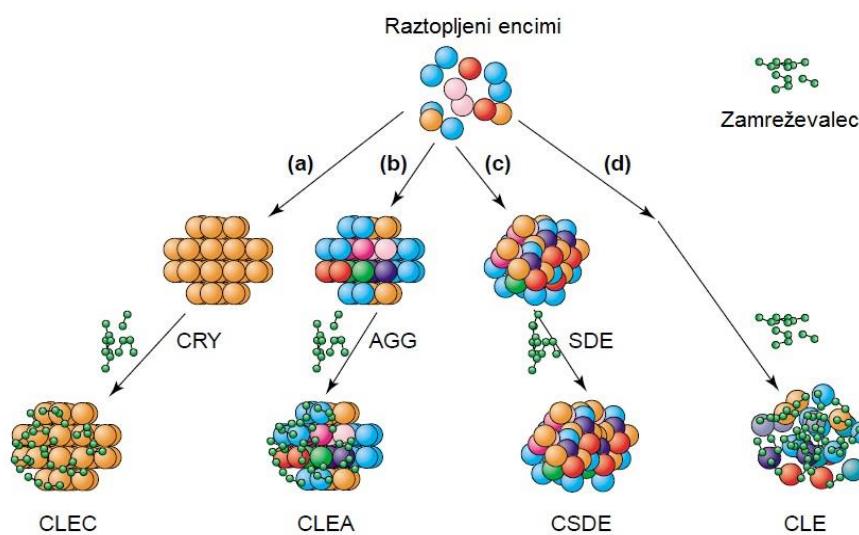
Fizikalna vezava je v splošnem prešibka (tvorba hidrofobnih vezi in van der Waalsovih interakcij), da bi v industrijskih pogojih, kjer so visoke koncentracije reaktantov in produktov, hkrati pa tudi prisotna visoka ionska moč, zadržala encim vezan na nosilec.

Ionska vezava je močna, vendar je *koalentna vez* še močnejša in zagotovi, da encim ostane trdno vezan na nosilec. Trdna vezava pa ima tudi svojo slabost. V primerih, ko encim ostane ireverzibilno inaktiviran, sta tako encim in nosilec (ki je pogosto zelo drag) neuporabna. Za nosilec lahko uporabimo sintetične ostanke, biopolimere ali anorganske polimere, kot sta na primer (mezoporni) silicij ali zeolit (Cao, 2006).

2. **Zamreženje encima v kletko** temelji na vključitvi encima v polimerno mrežo, ki je lahko organski polimer ali silica-sol gel. Encim lahko zamrežimo tudi v membransko strukturo, na primer v porozna vlakna. Pri uporabi zamrežitve encima v kletko moramo sintetizirati kletko iz polimerov v prisotnosti encima. Mreža okoli encima je lahko tudi prešibka, da bi popolnoma preprečila uhajanje encima, zato je včasih potrebna še dodatna kovalentna vezava, s katero preprečimo uhajanje, kar lahko privede do nejasnega razlikovanja med zamreženjem v oz. vezavo na nosilec (Avnir in sod, 1994).

3. **Imobilizacija encima brez uporabe nosilca**, temelji na procesu zamreževanja različno pripravljenih oblik encimov. Ti so lahko raztopljeni encimi, encimi v obliki prahu, kristalov ali pa v obliku agregatov (Amotz, 1987).

- CLE (ang. cross-linked dissolved enzyme) – navzkrižno zamreženi encimi
- CLEC (ang. cross-linked enzyme crystal) – navzkrižno zamreženi kristali encimov
- CSDE (ang. cross-linked spray-dried enzyme) – navzkrižno zamreženi in posušeni encimi
- CLEA (ang. cross-linked enzyme aggregate) – navzkrižno zamreženi encimski agregati



Slika 1: Različni pristopi immobilizacije encimov brez uporabe nosilcev

(a) kristalizacija, (b) agregacija, (c) sušenje, (d) takošnje zamreženje (Cao in sod., 2003)

Preglednica 1: Dejavniki, ki jih je potrebno upoštevati pri immobilizaciji encimov (Hanefeld in sod., 2009)

Imobilizacijska tehnika	Dejavniki, ki jih moramo upoštevati
Splošno	Dodatki in encimski pripravi, ki lahko motijo Stabilnost encima pod immobilizacijskimi pogoji Stabilnost nosilca pod operativnimi pogoji Izpiranje proteina pod operativnimi pogoji Nespecifične interakcije med nosilcem in substratom Cena in razpoložljivost nosilca
Adsorpcija/depozicija	
a) Hidrofobni organski nosilec	Prisotnost hidrofobnih regij na encimu Ionska moč immobilizacijskega pufra do želene adsorpcije proteina
b) Hidrofilni organski nosilec	Prisotnost hidrofilnih regij na encimu/glikolizacija
Ionske interakcije	pI encima Nabiti ostanki (tip in gostota le-teh) na površju proteina pH in ionska moč immobilizacijskega pufra.
Kovalentna vezava/navzkrižno zamreženje	Lokacija ostankov skupin potrebnih za povezovanje pH immobilizacije primerne za nukleofilni napad Konformacijska fleksibilnost potrebna za katalizni mehanizem
Enkapsulacija	Velikost encima Sintezni pogoji za polimer

2.1.1 Imobilizacija encimov na trden nosilec

Koncept imobilizacije encimov na netopne nosilce je bil v zadnjih tridesetih letih predmet obsežnih raziskav in posledično so bile razvite različne metodologije in širok spekter aplikacij. Med številnimi razvitimi imobilizacijskimi tehnikami je bil najpogosteje uporabljen princip kovalentne vezave, ker ustvari močno vez med encimom in nosilcem, ter s tem prepreči desorpcijo encima z nosilca. Encime lahko imobiliziramo na različne nosilce. To so anorganski materiali, ter naravni in sintetični polimeri.

2.1.1.1 Nosilec Sepabeads EC-HA

V svoji raziskavi smo se osredotočili na imobilizacijo lipaze na nosilec Sepabeads EC-HA. Nosilci sepabeads EC-HA imajo delce v velikosti med 100 in 300 μm s specifično gostoto $1,13 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$. Sestavljeni so iz zelo porozne metakrilne polimerne matrice, ki ima pore s premerom 10-20 nm. Imajo visoko mehansko stabilnost, visoko odpornost proti mikrobnemu napadu in ne nabreknejo v vodi (SEPABEADS® EC-HA ... , 2015). Surovine, ki se uporabljajo za proizvodnjo teh nosilcev, so vključene v seznam EU registra za prehrano (Resolution AP (97)1 ... , 2015).

Izbiro nosilca lahko utemeljimo zaradi njegove strukture, saj ima za razliko od drugih nosilcev z aminsko skupino ta nosilec daljše distančnike, na koncu katerih se nahajajo aminske skupine, ki skupaj z »distančnikom« tvorijo funkcionalno skupino nosilca – heksametilamin. Z distančniki lahko dosežemo konformalno fleksibilnost proteina. Daljši distančniki omogočajo večjo konformacijsko prilagodljivost proteina. To je lahko prednost pri encimih, kot je lipaza, ki so znani po tem, da so podvrženi k velikim konformacijskim spremembam, ko te interaktirajo s substratom.



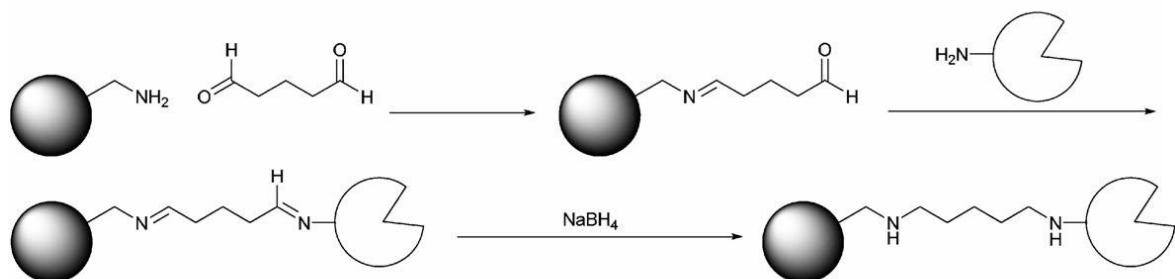
Slika 2: Heksametilamin – funkcionalna skupina na nosilcu sepabeads EC-HA

Do sedaj so na številne nosilce iz te skupine v predhodnih študijah že uspešno vezali encime, kot so penicilin G acilaze (Žuža in sod., 2009), lipaze (Hilterhaus in sod., 2008), β -galaktozidaze (Torres in sod., 2003) in fitaze (Celem in Onal, 2009).

2.1.1.2 Vezava encima na nosilec Sepabeads EC-HA

1. Encim izpostavimo delovanju periodata, ki oksidira aminske skupine encima do aldehidnih skupin. Aldehidne skupine se lahko nato povežejo z aminskimi, ki se nahajajo na nosilcu (Marek in sod., 1984, cit. po Prodanović in sod., 2001).
2. Drugi način vezave encima na nosilec je preko aktivacije nosilca z glutaraldehidom, kjer se glutaraldehid z aminsko skupino poveže na nosilec in

predstavlja povezavo (most), na katero se lahko veže aminska skupina na encimu (Prplainović in sod., 2011).



Slika 3: Shema aktivacije aminske skupine z glutaraldehidom in vezava encima
 (Hanefeld in sod., 2009)

2.1.2 Imobilizacija encimov z zamreženjem brez uporabe nosilca

CLE

V začetku šestdesetih let prejšnjega stoletja so študije proteinov pokazale, da encimi zamreženi z zamreževalcem, kot je glutaraldehid, preko površinskih skupin NH₂ vodijo do netopnih navzkrižno povezanih encimov (CLE). Vendar imajo tako pripravljeni encimi tudi pomanjkljivosti, kot so: slabo ohranjanje aktivnosti, slaba ponovljivost, nizka mehanska stabilnost, in želatinasta oblika, ki je oteževala uporabo v proizvodnih procesih. Mehansko stabilnost in problem oblike encima lahko izboljšamo z vezavo encima v gel ali na nosilec, kar pa privede do zmanjšanja aktivnosti (Cao in sod., 2003).

CLEC

Zamreženje encimskih kristalov sta prva opisala Quiocho in Richards leta 1964. Njun glavni cilj je bil stabilizirati encimske kristale za rentgensko difrakcijo, hkrati pa sta tudi dokazala, da se pri takšni pripravi encimska aktivnost ohrani. CLEC so se v primerjavi z raztopljenimi encimi ali liofilizirani encimi izkazali za izredno stabilne proti temperaturni denaturaciji, organskim topilom ter proteolizni razgradnji. CLEC so robustni visoko aktivni imobilizirani encimi, katerih delci so v velikosti med 1 in 100 µm. Njihova operativna stabilnost in zmožnost recikliranja združena z visoko katalizno in volumetrično produktivnostjo, jih naredi idealne kandidate za industrijsko biotransformacijo (Quiocho in Richards, 1964).

To ugotovitev so v zgodnjih devetdesetih uporabili raziskovalci v podjetju Vertex Pharmaceuticals in tako postali pionirji v uporabi CLEC v industrijskih procesih. Tehnologijo so razvili za produkcijo aspartama s kristaliziranimi encimi termolizina, kasneje pa se je ta tehnologija razširila še na druge proizvodne postopke. Vendar priprava CLEC zahteva kristalizacijo zelo čistih oblik encima, za pripravo katerih potrebujemo veliko energije in denarja (St. Clair in Navia, 1992).

CLEA

Spoložno znano je, da dodatek soli, organskih topil ali neionskih polimerov v raztopino z encimi vodi do njihove precipitacije, brez porušenja struktur. Pravzaprav je obarjanje, izzvano z amonsulfatom, (poli)etilenglikolom in nekaterimi organskimi topili splošno uporabljena metoda za čiščenje proteinov. Obarjanje encimov privede do agregatov, ki imajo lahko zaradi svoje zgradbe za industrijo zanimive lastnosti. Ti trdni agregati, ki so povezani z nekovalentnimi vezmi, se v določenih primerih porušijo in ponovno raztopijo, ko jih izpostavimo vodnemu mediju. V želji, da bi ohranili encime v agregirani obliki, pa z navzkrižnim povezovanjem teh aggregatov privedemo do nastanka CLEA, v katerih je super struktura aggregatov ohranjena (Sheldon in sod., 2006; Munishwar in sod., 2011).

Začetni eksperimenti na tem področju so bili opravljeni na industrijsko pomembnem encimu penicilin G acilazi, ki je pomemben pri sintezi semi-sintetičnih penicilinskih in cefalosporinskih antibiotikov. Njegova omejena termalna stabilnost in nizka toleranca na organska topila sta raziskovalcem predstavljala edinstven izziv za izboljšane stabilnosti in tolerance encima s pripravo CLEA oblike encima (Cao in sod., 2000, 2001).

Velika prednost uporabe CLEA je enostavna ločitev encimov iz reakcijske mešanice z filtracijo ali centrifugiranjem. V primerjavi s prostimi encimi lahko že kratko centrifugiranje vodi do popolnega izkupička encimov. Tudi s filtracijo je mogoče odstraniti CLEA iz reakcijske brozge, vendar je potrebno paziti pri pravilni izbiri filtra. Agregati lahko spremenijo svojo obliko, saj so prožni kot votle žogice. Če pridobijo bolj ozko in podolgovato strukturo, se lahko izmaznejo tudi skozi manjše pore (Sheldon in sod., 2006).

Prednosti CLEA (Sheldon, 2011):

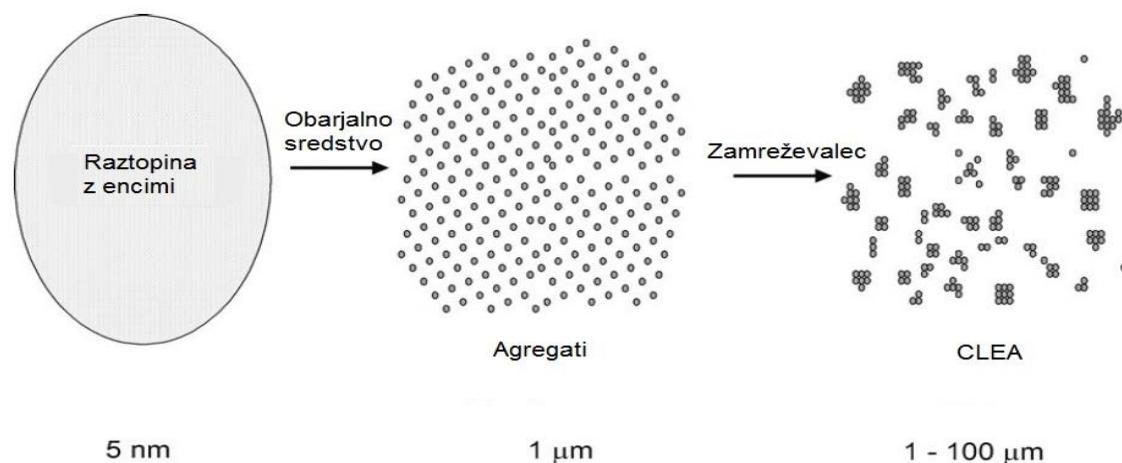
- pripravimo jih lahko iz predhodno neobdelanih encimskih ekstraktov,
- izognemo se stroškom nosilcev,
- njihovo skladiščenje je enostavno,
- so bolj obstojni na temperaturo, organska topila in avtoproteolizo,
- so stabilnejši proti raztapljanju v vodnih medijih,
- imajo visoko katalizno produktivnost,
- enostavno jih je ločiti iz reakcijske mešanice, ter jih lahko ponovno uporabimo,
- možnost ko-agregacije dveh ali več encimov.

2.1.2.1 Priprava CLEA

Predpostavlja se, da navzkrižno povezani encimski aggregati, ki so posledica obarjanja v prisotnosti ustreznega obarjalnega sredstva zaklenejo encim v najboljšo konformacijo. Še več, dodatek, ki ni kovalentno vezan na encim, lahko postopoma izperemo iz CLEA z ustreznimi organskimi topili. Obarjanje lahko izvedemo z različnimi obarjalnimi sredstvi. To so lahko: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, aceton, acetonitril, DME, etilacetat, amonsulfat, DMF, DMSO,... Vsak encim je drugačen, zato ni univerzalnega najboljšega

sredstva za obarjanje. Na encimsko aktivnost vplivajo različno, saj nekatera obarjalna sredstva lahko prizadenejo aktivno mesto encima (Schoevaart in sod., 2004).

Na aktivnost encima vpliva tudi izbira navzkrižnega zamreževalca. Kljub svoji široki uporabnosti in enostavnosti, ter cenovni dostopnosti, pa glutaraldehid za zamreženje nekaterih encimov ni primeren, saj lahko z vezavo na lizinske ostanke v aktivnem mestu encima privede do izgube aktivnosti. Da bi preprečili vstop zamreževalca v aktivna mesta, lahko uporabimo zamreževalec, ki ima večjo molekulsko maso. Dekstranaldehid je zaradi svoje velike strukture prevelik, da bi vstopil v aktivno mesto encima, zato v primerih, ko glutaraldehid povzroči izgubo aktivnosti, lahko z uporabo dekstranaldehida dosežemo, da ta z vezavo na površinske lizinske ostanke zamreži encimske aggregate (Caballero Valdés in sod., 2011).



Slika 4: Shematični prikaz priprave CLEA (Sheldon, 2007)

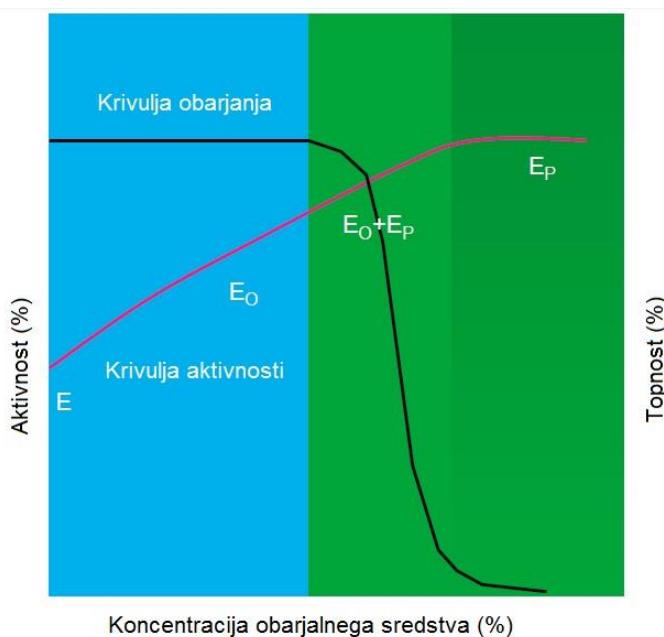
Nekateri encimi, ki imajo na površini zelo malo lizinskih ostankov, ne morejo biti pravilno zamreženi. Encim KRED ima še dodatno težavo, saj ima lizin v aktivnem mestu encima. V takšnih primerih se poslužujemo dodatka z amino skupinami bogatimi polimeri (oz. proteini, ki imajo na površini veliko aminskih skupin (Šulek in sod., 2011). Uporabo pomožnega proteina je smiselno uporabiti tudi, kadar imamo zelo nizko koncentracijo proteina oz. če je protein preobčutljiv za zamreženje (Shah in sod., 2006; Cruz in sod., 2012).

Metodologija priprave CLEA združuje čiščenje encima (med obarjanjem) in imobilizacijo v drugem koraku. Če je vzorec, s katerim delamo, mešanica nečistih encimov, lahko nastanejo CLEA, ki vsebujejo več različnih encimov. To lastnost uporabimo pri ustvarjanju combi-CLEAs, pri pripravi katerih namerno uporabimo dva ali več encimov (Mateo in sod., 2006).

2.1.2.2 Snovni prenos

Pri hitrih encimskih reakcijah se lahko pojavi limitacija prenosa mase, kar je posledica pakiranja encimov v skupke, kjer je v zelo majhnem volumnu pakiranih veliko encimov. Kljub temu se na povprečni časovni skali pri počasnejših reakcijah ta efekt izkaže za zanemarljivega.

Pojav limitiranja snovnega prenosa pri CLEA lahko preprečimo z vplivom na število molekul encima in način njihovega pakiranja v agregate. Zato znanje o vplivajočih faktorjih in možnostih spremicanja le-teh vodi do izboljšave CLEA v zelo definirane katalizne delce. Med agregacijo se topnost encima v mediju zmanjšuje. V primeru, da je ta proces prepočasen, lahko pride do denaturacije encima zaradi sil, ki začnejo delovati na zunanjo strukturo. S pomožnim proteinom, ki obdaja protein med obarjanjem, povečamo verjetnost ohranitve njegove terciarne zgradbe. Predhodni eksperimenti so pokazali, da povečanje hitrosti obarjanja v primerih slabe aktivnosti, dajo vedno popolno aktivne agregate. Morfologija aggregatov je tudi odvisna od glikolizirane površine in hidrofobnih ostankov. Če agregati vsebujejo več teh ostankov, so manjši.



Slika 5: Ohranjanje aktivnosti in topnost encima v prisotnosti različnih koncentracij obarjalnega sredstva

Krivulja roza barve podaja aktivnost encima. Krivulja obarjanja pa je črne barve. Modro in zelena področja prikazujejo različne predele, v katerih se encimi nahajajo v različnih agregiranih oblikah. E encimi; E_0 oligomerni agregati; E_p precipitirani encimski agregati (Cao, in sod., 2003).

2.2 ENCIMI

Encimi se nahajajo v vseh živečih organizmih. Imajo zelo visoko katalizno sposobnost, so specifični za določen substrat in delujejo v okoljih, ki zahtevajo nizko porabo energije. Imajo pomembno vlogo, saj povečajo hitrost biokemijskih reakcij z znižanjem energijske bariere. Med procesom se ne porabijo in se trajno ne spremenijo. Zanimivi so, ker ne vplivajo na ravnotežje reakcije, ampak le na hitrost, s katero ravnotežje dosežemo. Prav tako lahko katalizirajo sintezo visoko zahtevne, optično aktivne komponente, ki jih ne moremo pridobiti s postopki konvencionalne katalize.

Večina encimov so proteini. Proteini so biološki polimeri aminokislin, ki imajo veliko različnih struktur in funkcij. Sestavljeni so iz nabora 20 različnih molekul z značilno zgradbo (aminokislin). Značilna sestava in zaporedje aminokislin omogočata vsakemu proteinu, da se zvije v natančno določeno tridimenzionalno strukturo. Posamezne aminokisline imajo lahko tudi naboja na svoji površini in poznavanje le-tega ima še poseben pomen pri obravnavi strukture in funkcije celotnega proteina (Boyer, 2008).

Najpomembnejši vpliv na zvijanje proteinov ima aminokislinska sestava in aminokislinsko zaporedje. Danes vemo, da določene aminokisline in njihova zaporedja favorizirajo nastanek specifičnih sekundarnih, terciarnih in kvartarnih struktur. Fizikalne lastnosti encimov so odvisne predvsem od narave stranskih verig na aminokislinskih ostankih. Te tudi pripomorejo s svojo prostorsko strukturo ter nabojem k oblikovanju tridimenzionalne strukture, ki jo imenujemo nativna konformacija. Kako močan je lahko medsebojni vpliv stranskih verig, se lepo vidi pri globularnih proteinih, predvsem v njihovi naravnih težnjih k zvijanju v vodnem okolju, kjer se nepolarni aminokislinski ostanki zložijo v hidrofobno jedro, hidrofilno površino pa tvorijo polarni aminokislinski ostanki (Boyer, 2008).

Zelo pomemben dejavnik pri strukturi proteinov in posledično encimov so šibke nekovalentne interakcije, ki predstavljajo najpomembnejše stabilizirajoče sile v proteinu. V jedru proteinske strukture prevladujejo hidrofobne interakcije, ki se vzpostavijo med aminokislinami z nepolarnimi stranskimi verigami in na ta način iz osrednjega dela izločijo vodo. Poleg teh delujejo stabilizirajoče na proteinsko strukturo še ionske interakcije in van der Waalsove vezi. Skupna lastnost encimov je, da njihova nativna konformacija ni statična oz. toga. V bistvu so njihove terciarne strukture izredno fleksibilne zaradi proste vrtljivosti okrog vezi (z izjemo peptidne vezi), to pa omogoča številne različne konformacije v dani proteinski strukturi. Prav te majhne spremembe v konformaciji pogosto uravnavajo biološke aktivnosti nekaterih proteinov (Silverman in Holladay, 2014).

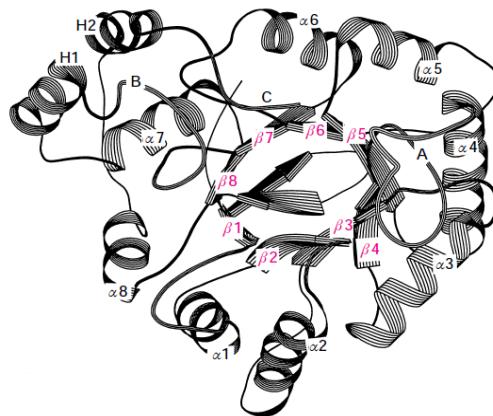
Nekateri encimi za pravilno delovanje potrebujejo poleg svojega proteinskega dela še drugo komponento, ki jo imenujemo kofaktor. Ta je lahko organska ali koordinacijska spojina (v tem primeru jo imenujemo koencim) ali pa kovinski ion.

Najpomembnejši del encima je aktivno mesto. Aktivno mesto je žep ali vdolbina v tridimenzionalni strukturi encima, kjer poteka kataliza. Število aktivnih mest na encimu lahko variira, vendar je to število vedno majhno. Navadno se na posamezni podenoti nahaja le eno aktivno mesto. Aktivno mesto je specifično; to pomeni, da izmed množice možnih substratnih molekul prepozna le nekatere (včasih le eno samo). Substrat se mora prilegati strukturi aktivnega mesta, kot ključ ključavnici, zato je oblika aktivnega mesta zrcalna »slika« substrata. Nekateri encimi celo ločijo med L- in D- izomeri substrata. Substratne molekule se vežejo na pravo mesto v aktivnem mestu s šibkimi nekovalentnimi reverzibilnimi interakcijami. Najpomembnejše so hidrofobne interakcije ter ionske in vodikove vezi (Boyer, 2008).

2.2.1 Ketoreduktaze

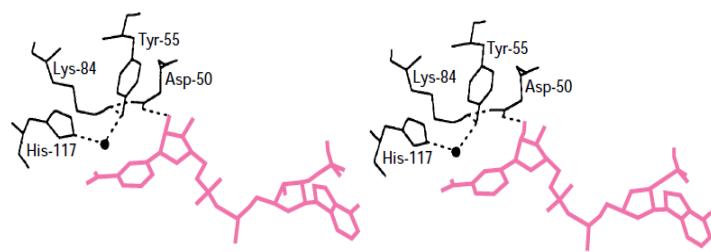
Encimi ketoreduktaze spadajo v družino aldo-ketoreduktaz. Ta proteinska skupina združuje aldozne reduktaze, aldehydne reduktaze, hidroksisteroidne dehidrogenaze in dihidrodiol dehidrogenaze. Aldo ketoreduktaze so monomerni proteini, in se nahajajo v sesalcih, dvoživkah, rastlinah, kvasovkah, praživalih in bakterijah (Bruce in sod., 1994).

Ti proteini prebavijo raznoliko paleto substratov. Od alifatskih in aromatskih aldehydov, monosaharidov, steroidov, prostaglandinov, policikličnih aromatskih ogljikovodikov do izoflavonoidov. Za encime, ki spadajo v to super družino, se je izkazalo, da imajo tudi podobne amino kislinsko zaporedje, kar posledično vodi tudi v podobno tridimenzionalno strukturo (Wilson in sod., 1995, El-Kabbani in sod., 1995).

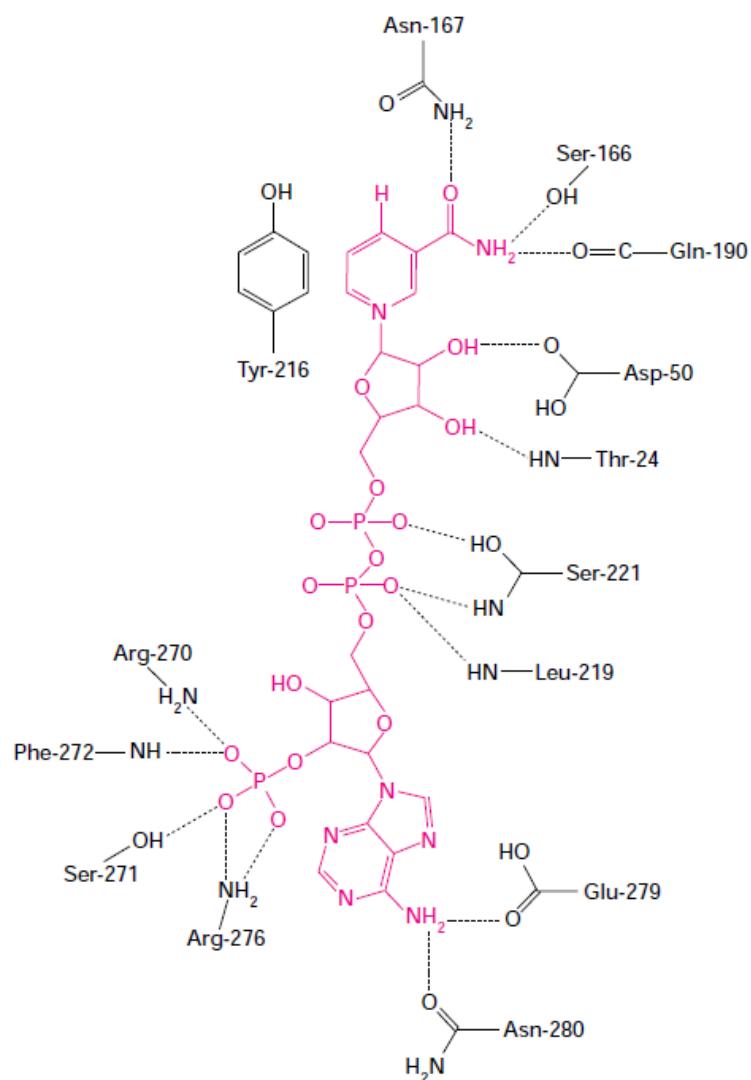


Slika 6: Skupna tridimenzionalna struktura aldo-ketoreduktaz (Jez in sod., 1997)

Ketoreduktaze za oksidacijo in redukcijo substratov potrebujejo kofaktor NADP(H). Jez in sod., 1997, so v svoji študiji pokazali, da je to aktivno mesto za NADP(H) ohranljeno med različnimi vrstami ketoreduktaz. Pomembne aminokisline, ki se nahajajo v aktivnem mestu za NADP, so histidin, lizin, tirozin in aspartat. Pokazali so, da mutacija tizozina in lizina vodi do delne ali celo do popolne izgube aktivnosti.



Slika 7: Aktivno mesto aldo-ketoreduktaz (Jez in sod., 1997)



Slika 8: Vezava NADP v aktivno mesto aldo-ketoreduktaz. Prikazane so povezave molekule z aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu encima (Jez in sod., 1997).

2.2.2 Esteraze in lipaze

Esteraze (karboksil-ester hidrolaze) in lipaze (triacilglicerol hidrolaze) spadajo med lipolitične encime; v encimsko skupino, katere biološki funkciji sta kataliza in hidroliza triaglicerolov v diaglycerole, monoglycerole, proste maščobne kisline in glicerol (Kempka in sod., 2008; Lopes in sod., 2011). Lipaze in esteraze je mogoče razvrstiti na osnovi njihovega spektra substratov, ki jih lahko razgradijo. Esteraze katalizirajo hidrolizo vezi karboksilnih kislin kratkoverižnih maščobnih kislin ($z < 10$ atomi ogljikov), medtem ko imajo prave lipaze sposobnost razgradnje vezi v dolgoverižnih maščobnih kislinah (> 10 atomov ogljika) (Gilham in Lehner, 2005).

Komparativne študije tridimenzionalnih struktur esteraz in lipaz so pokazale prisotno α/β hidrolazno zvitje, ki je sestavljeno iz centralne β -plošče obdane z različnim številom α -vijačnic, ter katalitično triado, sestavljeno iz serina, histidina in karboksilne kisline. Veliko lipaz in esteraz imajo svoje aktivno mesto skrito pod sekundarnimi strukturnimi elementi, katerih konformacija se mora spremeniti, da substrat lahko dostopa do aktivnega mesta. Ti sekundarni strukturni elementi so pokrovi ali zakrilca, in imajo pomembno vlogo pri urejanju dostopnosti substratov v aktivno mesto (Cygler in sod., 1993; Holmquist, 2000).

Lipaze so zaradi svoje visoke selektivnosti zelo pomembni biokatalizatorji v moderni kemijski in farmacevtski industriji. Razgradijo širok spekter substratov in ne potrebujejo kofaktorjev za svoje delovanje. So odporne na topila, zaradi česar jih lahko uporabimo v številnih biotehnoloških aplikacijah. Njihova vloga je razgradnja ogljiko-estrih vezi v tri-, di-, in mono-acilglicerolih na glicerol in maščobne kisline. Prav tako katalizirajo različne druge reakcije, kot so na primer hidroliza, razgradnja estrov, esterifikacija, alkoholiza. V organskih medijih se encimsko delovanje lipaz lahko tudi spremeni in opravlja sintezo različnih lipidov. Nove biotehnološke aplikacije so bile uspešno vzpostavljene v sintezi biopolimerov, v proizvodnji biodizla, obdelavi maščob v odplakah in odpadkih, v enantiočisti sintezi farmacevtskih izdelkov in prehrambni industriji (Uppenberg in sod., 1994).

Za industrijo zelo pomembna in uporabna lastnost je lipazna enantioselektivnost. To lastnost izkoriščajo v farmacevtski industriji, kjer s pomočjo lipaz pripravljajo izomerne kiralne spojine, uporabljam pa jih tudi za kinetično ločljivost racemičnih alkoholov, kislin, estrov ali aminov (Fernandez in sod., 2006).

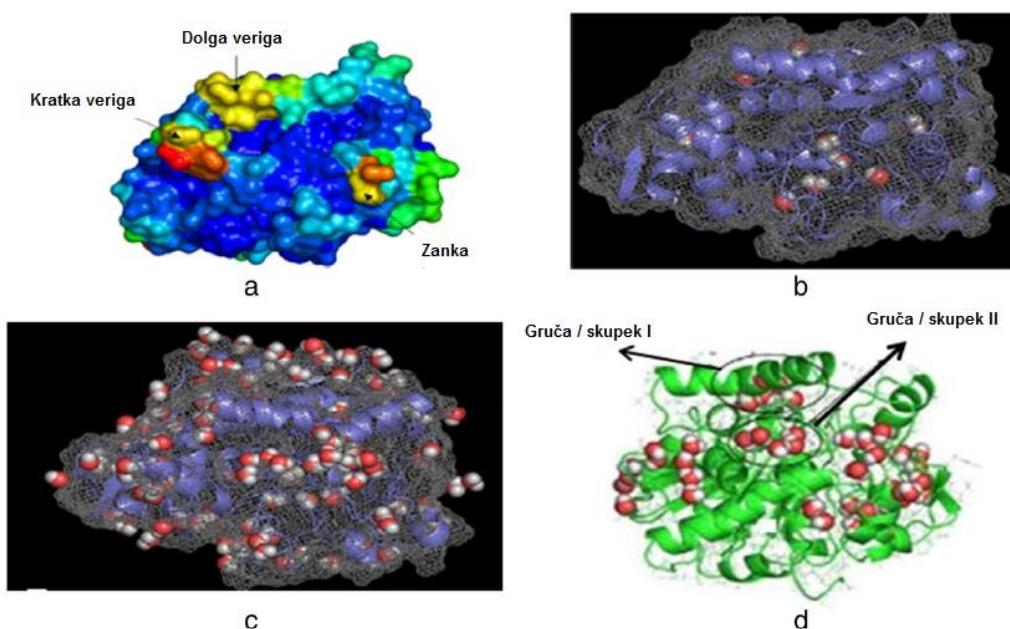
CaLB

Lipaza iz kvasovke *Candida antarctica* (CaLB) je biokatalizator znan po svoji učinkovitosti. Zaradi svoje visoke selektivnosti je zamenjala sintetične industrijske procese, kot so kinetična resolucija, aminoliza, esterifikacija in transesterifikacija (Anderson in sod., 1998.;Ghanem, 2007). CaLB je monomer, ki spada v α/β -vijačno družino hidrolaz, za katero je značilna ohranjena sredica obdana z osmimi večinoma

vzporedno postavljenimi β -listi, ter ima na obeh straneh α -vijačnici (Uppenberg in sod., 1994, 1995).

Velikost lipaz je $3\text{ nm} \times 4\text{ nm} \times 5\text{ nm}$ in imajo maso 33,273 Da. Aktivno mesto je prosto dostopno, kar nakazuje, da najbrž nima nobenih mehanizmov, ki bi dodatno regulirali vstop substrata. CaLB je sestavljena iz 317 aminokislin. 40,1 % delež predstavlja aminokisline, valin, levcin, izolevcin, glicin in alanin, medtem ko serin in treonin skupaj prispevata 18,3 % mase (Adriano in sod., 2005).

Uspešna imobilizacija CaLB s pomočjo zamreževanja s strani CLEA Technologies je privedla do patenta CaLB CLEA.



Slika 9: CaLB (Idris in Bukhari, 2012)

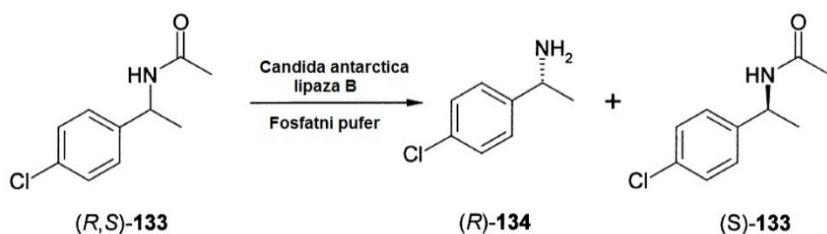
2.2.2.1 Kiralna sinteza in ločba s pomočjo lipaz

Številni encimi lahko pretvorijo substrat enantioselektivno, kar pomeni, da lahko encimi metabolizirajo le en enantiomer racemata. V reakciji s kiralnimi molekulami se lahko določeni enantiomeri hitreje pretvorijo kot drugi. Ločevanje kiralnih spojin pri proizvodnji učinkovin je izrednega pomena, saj je večina bioloških organskih molekul kiralnih. V naravi obstajajo biomolekule predvsem v eni od dveh možnih enantiomernih oblik; aminokisline v L-obliki in sladkorji v D-obliki. Človeško telo je izredno kiralno selektivno, zato lahko interagira z vsako racemno spojino različno, kar lahko privede do različnih farmakoloških odzivov. Posledično lahko en izomer sproži želene terapevtske učinke, medtem ko jih drugi ne, oz. v najslabšem primeru lahko povzroči tudi neželen učinek. Prav zaradi tega kiralnost predstavlja veliko skrb in hkrati izziv v sodobni farmacevtski industriji (Dalko, 2007).

Lipaze se pogosto uporabljajo v treh glavnih vrstah reakcij, v katerih pridobimo optično čiste spojine. To so kinetična resolucija racemičnih karboksilnih kislin ali alkoholov, enantioselektivne razlikovanje skupin *mezo*-dikarboksilnimi kislin ali *mezo*-diolov in enantiotopsko razlikovanje skupin prokiralnih dikarboksilnih kislin in derivatov diolov. V nasprotju z asimetrično (enantioselektivno) sintezo lahko s kinetično ločbo pridobimo do največ 50 % želenega enantiomera. Da bi dosegli višje donose, lahko neželen enantiomer ločimo in ponovno racemiziramo v ločenem koraku. Višji odstotek želenega enantiomera pa je mogoče doseči z dinamično kinetično resolucijo (DKR) (Ghanem in Aboul-Enein, 2005).

Resolucija (ločba) racemov z lipazami je ena najbolj privlačnih metod, ki se uporablja za pridobitev enantiomerno čistih spojin. Od vseh metod, ki se uporabljajo v kinetični resoluciji v organskih topilih, je najbolj prevladujoča lipazna kataliza. Tako encim v prisotnosti primernega darovalca acilne skupine, ustreznega topila in temperature, enantiomer racemne zmesi selektivno pretvori v ustrezen ester, pri čemer drugi enantiomer ostane nespremenjen. Zaradi teh sposobnosti in dolgoletnih pozitivnih izkušenj je postala uporaba lipaz v kemijski industriji enostavna in bolj predvidljiva. Številna kemijska podjetja so občutno povečala nabor procesov v sintezi, ki vključujejo biokatalizne oziroma kemo-encimske stopnje (Schmid in sod., 2001).

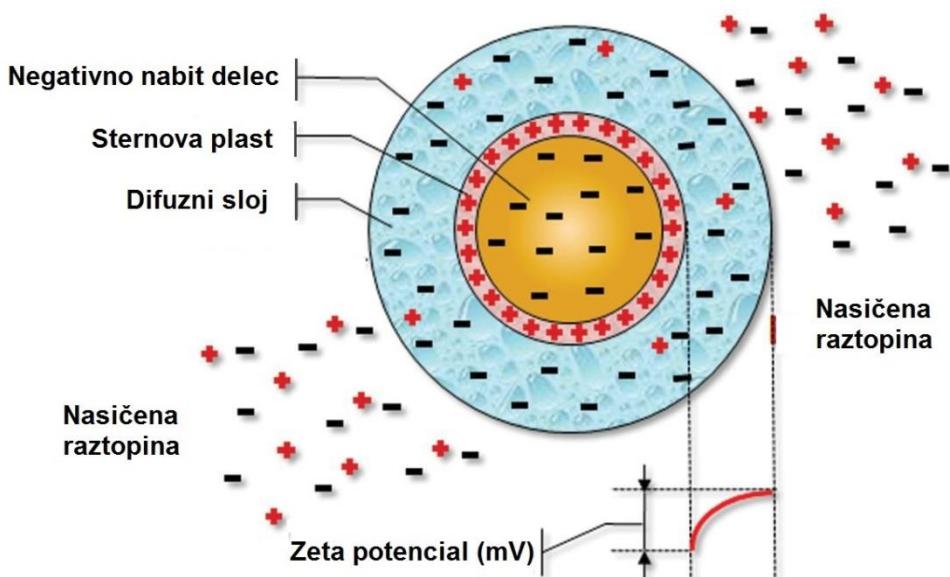
Lipaza B iz kvasovke *Candida antarctica* je enako kot druge lipaze sposobna ločevanja kiralnih spojin. Uporabna je tako v hidroliznih reakcijah v vodnih medijih ter vrsti reakcij v nevodnih medijih: za preestritve, aminolizo, amonolizo, alkoholizo in podobno. Zaradi svoje izrazite stereoselektivnosti je primerna za kiralno sintezo ter kiralne ločbe racemnih substratov. Pogosto tudi v reakcijah dinamične kiralne ločbe, v kombinaciji z anorganskimi katalizatorji (racemizacija enega enantiomera). Tako so bile že opravljene študije selektivnosti CaLB pri substratih, kot so aleni, v kompleksu fosfan-boran in bicikličnih heteroakrilnih primarnih aminih. V sredini devetdesetih let pa je družba Bayer razvila enantioselektivno hidrolizo racemnega acetamida (R,S)-133 ob prisotnosti lipaze *Candida antarctica* B (CaLB). Reakcija poteče do prostega amina (R) -134 v visoki enantiomernem presežku (> 99,5 %) (Ghanem in Aboul-Enein, 2005).



Slika 10: Enantioselektivna hidroliza racemata acetamida (R,S)-133 razvita v podjetju Bayer
 (Ghanem in Aboul-Enein, 2005)

2.3 OBARJANJE PROTEINOV

Encimi so večinoma globularni proteini, ki imajo veliko število neuniformno porazdeljenih nabitih delcev na površini. Stabilnost proteinov je odvisna od privlačnih in odbojnih sil med koloidnimi delci. Pogosto v raztopini raztopljeni proteini izražajo skupno negativno nabito površino, saj privlačijo pozitivno nabite ione v raztopini elektrolitov. Nastalo plast imenujemo Sternova plast. Poleg te plasti se vzpostavi bolj difuzna plast mobilnih pozitivnih ionov, ki privlačijo negativne ione. Med proteini se ustvari električna dvojna plast, ki inducira odboj dveh molekul proteina (Sivasankar, 2005).



Slika 11: Naboj proteinov v raztopini

V prisotnosti elektrolitov in organskih topil se dvojna plast lahko komprimira (stisne). Stopnja destabilizacije koloidov je odvisna od ionske moči in dielektrične konstante raztopine. Pri industrijskem obarjanju proteinov se poslužujemo zmanjšanja dvojne plasti z dodatkom soli ali organskih topil.

2.3.1 Obarjanje z izsoljevanjem

Anti-kaotropne soli izpostavijo hidrofobne lise na proteinu z odstranitvijo strukturirane vodne plasti, ki običajno obdajajo hidrofobne lise v vodni raztopini. Izpostavljeni hidrofobni ostanki na proteinu lahko medsebojno interaktirajo, kar posledično vodi do združevanja (agregiranja) proteinov. Soli lahko prav tako zmanjšajo topnost proteinov s prekritjem nabitih skupin na površini proteinov, ki normalno držijo proteinske molekule narazen v raztopini. Ko so elektrostatski naboji na proteinskih molekulah prekriti (izničeni), molekule lahko brez težav reagirajo in izoblikujejo se agregati. Soli, ki jih najpogosteje uporabljamo za obarjanje proteinov, so amonijev sulfat, natrijev sulfat in natrijev klorid (Ghosh, 2006).

2.3.2 Obarjanje z organskim topilom

Uporaba organskih topil priobarjanju proteinov je zelo pogosto uporabljena metoda. Metoda temelji na zmanjšanju dielektrične konstante raztopine. Najpogosteje uporabljena organska topila zaobarjanje proteinov sta etanol in aceton. Topnost snovi v topilu je odvisna od njene sposobnosti tvorjenja vezi s topilom, pri tem ima velik vpliv polarnost oz. nepolarnosttopljenca in topila. Največkrat uporabljenomerilo za polarnost je dielektrična konstanta; pri tem velja, da imajo bolj polarne snovi višjo dielektrično konstanto. Dielektrična konstanta vode pri 25 °C je 78,3, medtem ko je konstanta acetona pri enaki temperaturi le 20,7. Iz razmerja lahko ugotovimo, da ima protein nižjo topnost v acetondvotri raztopini, kot pa le v vodi. Višje koncentracije organskih topil denaturira beljakovine. Organska topila navadno vežejo na določene lokacije na beljakovinskih molekulah in s tem motijo hidrofobne interakcije, ki stabilizirajo zgradbo proteina (Ghosh, 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Pri delu smo uporabili naslednje kemikalije: 2-propanol (J. T. Baker), aceton (Sigma Aldrich), akitilamid/Bis-akrilamid (Sigma, ZDA), amonij 25 % raztopina (Emsure), amonijev persulfat (Sigma), HCl (Sigma Life Science), bakrov sulfat $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Fluka Analytical), β -merkaptetoanol (Aldrich Chemistry, ZDA), bromfenol modro (Sigma, ZDA), Coomassie Brilliant Modro (Sigma, Francija), dekstran iz Leuconostoc spp. Mr 100.000 (Fluka, Kanada), etanol 95 % (Sigma Aldrich), etilen glikol (Riedel-de Haën), Folin in Ciocalteu's Phenol 2N (Sigma-Aldrich), fosforna kislina 85 % (Sigma Aldrich), glicerol, glicin (Acros Organics), glutaraldehid (Sigma Aldrich), goveji serumski albumin (Merck), HCl (J.T. Baker), K_2HPO_4 (Sigma Aldrich, Španija), kalcijev diklorid CaCl_2 (Baker Grade), KH_2PO_4 (Sigma Life Science, Japonska), metanol (J.T. Baker Nizozemska), 2-merkaptetoanol (Sigma-Aldrich), natrijev karbonat Na_2CO_3 (Fluka Analytical), $\text{Na}_2\text{tartrate} \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat NADP, natrijev Dodecil sulfat (Sigma, Japonska), natrijev hidroksid (Fluka Analytical), natrijev acetat (Sigma-Aldrich, Nemčija), natrijev periodat (Aldrich), ocetna kislina (Emsure), p-nitrofenilacetat (Fluka), p-nitrofenilbutirat (BioChemika), p-nitrofenol (Fluka), TEMED (Fluka Bio Chemika), trizma base (Sigma, ZDA).

3.1.2 Pufri, raztopine, reagenti

Sestava pufrov, ki smo jih uporabili za delo, je razvidna iz preglednic 2–7.

Preglednica 2: Sestava elektroforeznega pufra

1× elektroforezni pufer	1 L
Tris baza	3 g
Glicin	15 g
NaDS	1 g

Preglednica 3: Priprava 5× pufra za denaturacijo vzorcev za NaDS-PAGE

5× nanašalni pufer	10 mL
NaDS	1 g
100 mM β -merkaptetoanol	1 mL
glicerol	2 mL
raztopina bromfenol modro	100 μL (5 mg)
destilirana voda	1,9 mL
0,4 M Tris-HCl, pH 6,8	5 mL

Preglednica 4: Priprava 50 mM K-fosfatni pufer

50 mM K-fosfatni pufer	100 mL
1 M K ₂ HPO ₄	4 mL
1 M KH ₂ PO ₄	1 mL
destilirana voda	95 mL

Preglednica 5: Priprava 50 mM K₂HPO₄

50 mM K₂HPO₄	100 mL
1 M K ₂ HPO ₄	5 mL
destilirana voda	95 mL

Preglednica 6: Priprava 50 mM KH₂PO₄

50 mM KH₂PO₄	100 mL
1M KH ₂ PO ₄	5 mL
destilirana voda	95 mL

Preglednica 7: Priprava 50 mM Na-acetatnega pufra

50 mM Na- acetatni pufer	200 mL
CH ₃ COONa	0,820 g
dH ₂ O	180 mL
ocetna kislina	Po potrebi, da znižamo pH na 5,04
destilirana voda	Dopolnimo do 200 mL

Preglednica 8: Sestava elektroforeznega gela

Zbiralni gel	10 mL
destilirana voda	5,95 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 mL
10% (w/v) NaDS	0,1 mL
aktilamid/bis-akrilamid (30%/0,8% w/v)	1,34 mL
10% (w/v) amonijev persulfat	0,1 mL
TEMED	0,01 mL

Preglednica 9: Sestava raztopine za barvanje gelov

Raztopina za barvanje gelov	0,5 L
Coomassie Brilliant Modro	2 g
ocetna kislina	50 mL
metanol	200 mL
destilirana voda	Dopolnimo do 0,5 L

Preglednica 10: Raztopina za razbarvanje gelov

Raztopina za razbarvanje gelov	1 L
ocetna kislina	100 mL
metanol	400 mL
destilirana voda	500 mL

Preglednica 11: Sestava raztopin za pripravo Lowryjeve raztopine

Lowry raztopina	A:B:C = 100:1:1
Raztopina A	
NaOH	125 mg
Na ₂ CO ₃	630,4 mg
destilirana voda	22 mL
Raztopina B	
CuSO ₄ × 5H ₂ O	41,2 mg
destilirana voda	2,894 mL
Raztopina C	
Na ₂ tartrat × 2H ₂ O	60,5 mg
destilirana voda	2,12 mL

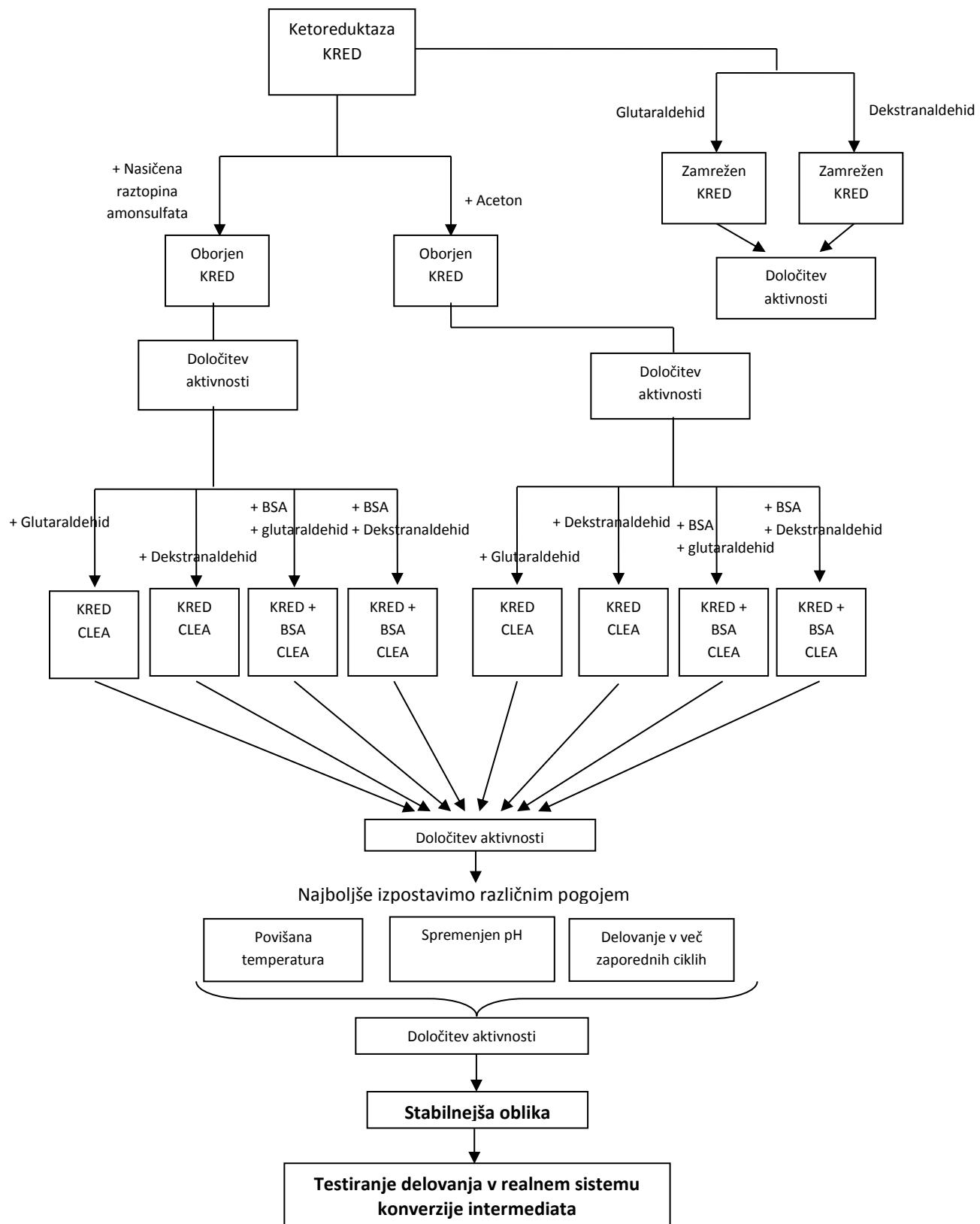
3.1.3 Encimi

Encimi, ki smo jih uporabili pri svojem delu: Ketoreduktaza (KRED) (Vir: Krka, K022014), Lipaza (CaLB) (Vir: Krka, Addzyme CaLB 10P), Proteinaza K (Vir: Krka, P102013).

3.1.4 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri svojem delu: optični čitalec Safire Tecan, elektroforezne komponente BioRad Power Pac 3000, stresalnik (Lab-Therm B. Braun), centrifuga (Centrifuge Stratos HERAEUS), centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5810), tehnicka (Exacta, Železniki), tehnicka (PG503 DeltaRange, Mettler), tehnika (Mettler Toledo), pH meter (Mettler Toledo MP 220), mikro pH sonda (Hamilton Bonaduz AG, Švica), magnetna mešala (JK_RO 15 Power IKA WERKE), vodna kopel (WB 30E, Kambič), magnetna mešala (JK_RET basic IKA WERKE), grelnik (Karl Hecht GMbH&6.KG), mikroskop (Olympus BX OF, Japonska), rotavapor (BUCHI Rotavapor R-215), UV – svetilka (CAMAG), analizator gelov (SYN GENE), velik stresalnik (Kambič), liofilizator (Kambič Lio-10P).

3.2 METODE UPORABLJENE PRI IMOBILIZACIJI KRED



Slika 12: Shema dela pri immobilizaciji encima KRED

3.2.1 Določitev koncentracije proteinov

Pri določitvi smo uporabili dve različni metodi za določitev koncentracije proteinov. Raztopini z raztopljenim nativnim KRED smo koncentracijo določili z metodo po Bradfordu. Encimskim agregatom KRED smo koncentracijo določili s NaDS-PAGE elektroforezo. Zamreženim agregatom KRED (CLEA KRED) pa smo prav tako določili koncentracijo s NaDS-PAGE elektroforezo, vendar smo upoštevali tudi delež CLEA KRED, ki niso vstopili v elektroforezni gel.

3.2.1.1. Metoda po Bradfordu

Metoda temelji na principu vezave barvila Comassie brilliant modro G-250 na proteine. Barvilo se poveže z ostanki bazičnih in aromatskih aminokislin. Pri tem se rdeča barva barvila spremeni v modro, s tem pa se premakne absorpcijski maksimum barvila s 465 na 595 nm. Vezava barvila je zelo hitra in tvori zelo stabilen kompleks protein-barvilo (Bradford, 1976).

Priprava Bradfordovega reagenta.

Najprej smo raztopili 40 mg Coomassie-Brilliant modro v 20 mL 95 % etanola. Nato smo dodali 40 mL 85 % fosforne kisline in volumen dopolnili do 240 mL. Raztopino smo nato filtrirali in ji dodali 40 mL glicerola. Dodali smo tudi destilirano vodo do končnega volumna 400 mL. Tako pripravljeno raztopino hranimo v temi na 4 °C (Bradford, BT 0413 Skripta za vaje – Department of Biotechnology SRM University).

Priprava standardne umeritvene krivulje za določitev vsebnosti proteinov.

Najprej smo pripravili svežo raztopino KRED v 50 mM K-fosfatnem pufru (5 mg/mL). Nato smo pripravili redčitveno vrsto tako, da smo prenašali po 5 mL raztopine v 5 mL 50 mM K-fosfatni pufer. Ta korak smo ponovili desetkrat. Za določitev umeritvene krivulje smo uporabili zadnjih pet redčitev (koncentracija KRED pri teh redčitvah je med 3 in 50 µg/mL). V 1,5 mL mikrocentrifugirki smo zmešali 500 µL raztopine encima in ji dodali 300 µL Bradfordovega reagenta. Kot negativno kontrolo smo uporabili samo pufer, brez encima. Nato smo prenesli 160 µL reakcijske mešanice na mikrotitrsko ploščo in ji pomerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm.

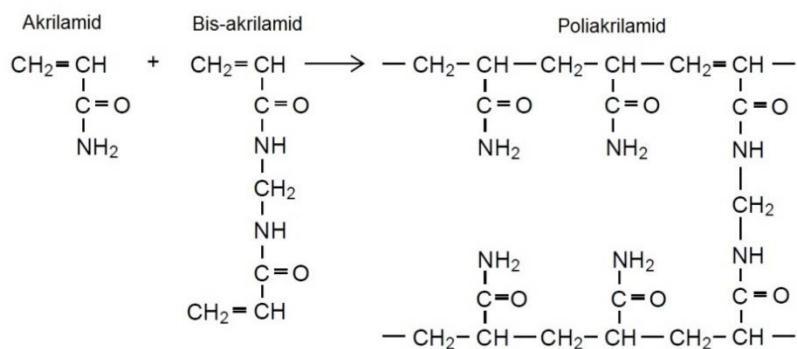
Metodo smo nato ponovili z našimi vzorci, pri katerih nas je zanimala koncentracija. Vzorce smo ustrezno redčili, da smo z vrednostmi absorbkcije prišli v linearne območje umeritvene krivulje. Koncentracijo proučevanega proteina odčitamo iz umeritvene krivulje narejene iz raztopin nativnega KRED, pri čemer je absorbanca obarvane raztopine proporcionalna koncentraciji beljakovin v vzorcu.

3.2.1.2 NaDS – PAGE elektroforeza

Koncentracijo agregatov v raztopini ne moremo določati spektrofotometrično, saj vezano barvilo na površini encimskih agregatov ne odraža prave koncentracije proteinov v vzorcu. V nekaterih znanstvenih člankih, ki opisujejo pripravo različnih CLEA, so avtorji teh člankov rešitev našli v določitvi koncentracije proteinov v supernatantu, ki ga pridobimo pri spiranju agregatov ter zamreženih agregatov (Guauque Torres in sod., 2013). Omenjena metoda se nam ni zdela primerna, saj so v takšnih supernatantih prisotni reagenti, ki motijo spektrofotometrično detekcijo, ali pa hkrati vsebujejo tudi delež majhnih agregatov oz. skupkov. Na podlagi omenjenih dejstev smo se odločili, da bomo merili količino proteinov v vzorcu in ne v supernatantu. Kot alternativo spektrofotometričnim določevanjem proteinov pa smo uporabili elektroforezo.

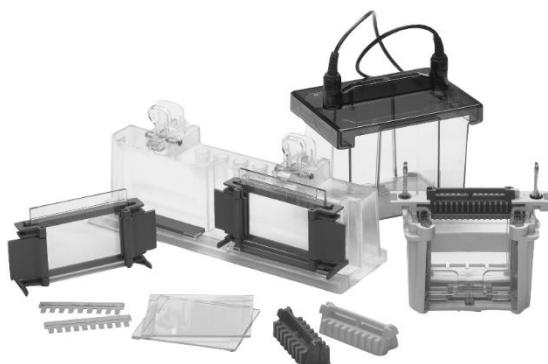
Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (bolj znanega pod okrajšavo NaDS-PAGE), je separacijska metoda, s katero ločujemo proteine na osnovi mase. Na splošno je elektroforezna mobilnost (hitrost potovanja nabitega delca v električnem polju) odvisna od razmerja med nabojem in maso delca, a zaradi stohiometrične vezave lavrilsulfata na polipeptidno verigo je to razmerje pri NaDS-PAGE za vse proteine enako. Elektroforezno mobilnost proteina, ki potuje skozi zamrežen gel, tako določa le velikost proteina (tj. dolžina polipeptidne verige). Metodo pogosto uporabljam v biokemiji, forenziki, genetiki in molekularni biologiji (Buxbaum, 2011).

Osnovni gradnik poliakrilamidnih gelov je akrilamid. Polimerizacija akrilamida poteče v prisotnosti prostih radikalov, katerih vir je običajno amonijev persulfat, stabilizira pa jih TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin). Če v polimerizacijsko reakcijo vključimo bifunkcionalni reagent N,N'-metilembisakrilamid, se poliakrilamidne verige prečno povežejo in tvorijo gel (slika 12). Gel vlijemo med dve stekleni plošči, vzorce pa nanašamo z vrha. Elektroforezni gel sestavlja dva različna gela, ki se razlikujeta po velikosti por. Prvi gel, ki se nahaja zgoraj, imenujemo zbiralni gel, njegova naloga je, da zbere vse proteine v gručo, tako da lahko ti hkrati vstopijo v drugi gel, ki ima manjše pore in v katerem se proteini ločijo glede na velikost (Weber, 1969).



Slika 13: Nastanek poliakrilamida (Menter, 2000)

Po končani elektroforezi lahko gel obarvamo, običajno z barvilmom Coomassie Brilliant Modro R-250 ali srebrovimi solmi, s čimer detektiramo ločene proteine. Po barvanju ločene proteine zaznamo kot različne izrazite lise v gelu. Intenziteta lis je odvisna od količine proteina v vzorcu. To lastnost smo tudi uporabili pri preoblikovanju NaDS-PAGE elektroforezne metode za določevanje koncentracije proteinov v vzorcih. Ker naš namen ni bil ločevanje proteinov glede na velikost, saj smo imeli homogene vzorce z ketoreduktazami, smo metodo prilagodili tako, da smo pripravili gel, ki je imel pore enake velikost kot zbiralni gel. S tem smo zbrali vse proteine vzorca v eni lisi, intenziteta lise pa je bila pogojena s količino proteina v vzorcu. Metodo smo zastavili tako, da smo predhodno pripravili raztopine z različnimi znanimi koncentracijami in jih nanesli na gel. Intenziteto teh lis smo uporabili kot standard, na podlagi katerega smo lahko določili količino proteinov v vzorcih.



Slika 14: Elektroforezne komponente za izvedbo NaDS-PAGE elektroforeze

Priprava gelske kasete in vlivanje gelov

Najprej smo očistili vse potrebne dele za elektroforezo z destilirano vodo in etanolom. Sledila je sestava stekel in distančnikov, ter njihova postavitev v stojalo za vlivanje gelov. Gelsko raztopino smo pripravili neposredno pred vlivanjem, in sicer s sestavo, ki je navedena v preglednici 8. Med stekla smo ulili sveže pripravljen gel. Žepke v gelu smo izoblikovali s 10-mestnim glavnikom enake debeline kot distančnika. Sledila je 30 min polimerizacija. Po končani polimerizaciji smo odstranili glavnice in stekla skupaj s polimeriziranimi geli prenesli iz stojala v elektroforezni sestav. Nato smo med stekla nalili elektroforezni pufer (preglednica 2) in vse skupaj potopili v elektroforezno kadičko, ki smo jo predhodno do polovice napolnili z elektroforeznim pufrom.

Priprava in nanos vzorcev

Najprej smo pripravili redčitve vzorcev, ki so bile med 40 in 100 µg/mL. Nato smo k 80 µL redčenega vzorca dodali 20 µL 5× pufra (preglednica 3) za pripravo vzorcev. Vzorce smo nato segrevali 10 minut v vodni kopeli na 100 °C. Sledil je nanos denaturiranih vzorcev na gel. V vsak žepek smo dali 10 µL denaturiranega vzorca.

Elektroforezno kadičko zapremo s pokrovom in začnemo poces elektroforeze. Elektroforeza je potekala 35 minut pri konstantni električni napetosti 150 V.

Po končani elektroforezi smo gele prenesli v raztopino za barvanje gelov (preglednica 9) in jih barvali 1 uro. Sledilo je spiranje nevezanega barvila v raztopini za razbarvanje gelov (preglednica 10). Med spiranjem gelov smo raztopino večkrat zamenjali s svežo, dokler nismo odstranili vsega nevezanega barvila iz gela. Gele smo nato analizirali s SYNGENE analizatorjem.

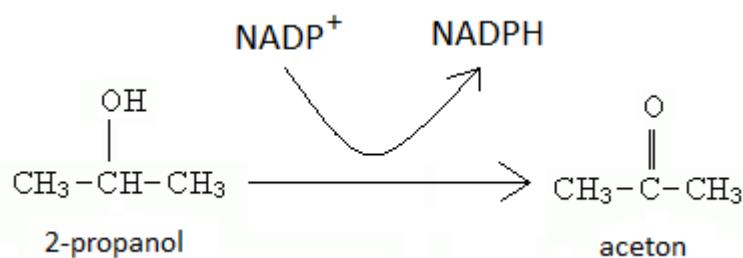
Analiza elektroforeznih gelov s SYNGENE analizatorjem

Gel smo vstavili na sredino transiluminatorja in zaprli vratca. S računalniškim programom GeneSnap smo zajeli sliko. Če je slika zmerno jasna, ustrezeno velika in brez motenj v ostrini, jo posnamemo. Ko smo sliko posneli smo preverili še ostrino posnetka in kontrast, ter ju še dodatno korigirali.

Sliko gela smo nato odprli s programom GeneTools. Na sliki smo definirali posamezne stolpce, ter lise s proteini. Lisam ki so vsebovale znano količino proteina (standardom) smo pripisali vrednosti, ter izrisali kromatogram. Nato smo določili širino posameznih elektroforeznih vrhov, ter nastavili bazno linijo (ozadje). Program nam je glede na nastavljene parametre podal izmerjene vrednosti proteinov v posameznih vzorcih.

3.2.2 Določitev aktivnosti encimov

Aktivnost ketoreduktaz smo določali spektrofotometrično. V reakcijsko mešanico smo ketoreduktazam dodali substrat 2-propanol, ki ga lahko ketoreduktaza v prisotnosti kofaktorja oksidira v aceton. Kofaktor NADP ima ključno vlogo pri oksidaciji substrata, saj sprejme elektrone in vodik, pri tem pa nastane NADPH. NADPH pri valovni dolžini 340 nm doseže svoj absorpciski vrh. Tako lahko z merjenjem absorbance pri tej valovni dolžini spremljamo pretvorbo NADP v NADPH, kar pa je tudi odraz aktivnosti encima. Ker smo želeli, da je rezultat kinetike pogojen samo s količino encima in nastalega NADPH, smo v reakcijo dali presežek 2-propanola.



Slika 15: Shema reakcije oksidacije 2-propanola v prisotnosti NADP⁺

Sestava reakcijske mešanice za merjenje kinetike je bila naslednja:

- 40 % v/v raztopine encima KRED s koncentracijo 50 µg/mL
- 40 % v/v 2-propanol
- 20 % v/v raztopine NADP s koncentracijo 2 mg/mL

Po dodatku NADP v reakcijsko mešanico takoj prenesemo 250 µL reakcijske mešanice na mikrotitrsko ploščo in merimo vrednosti absorbanc pri valovni dolžini 340 nm. Absorbanco smo merili 20 minut z minutnimi intervali.

Umeritvena krivulja za nastali NADPH

Reakcijo smo pripravili na mikrotitrski plošči. V luknjah mikrotitrskih plošč smo pripravili 50 mL redčitve NADP raztopljenega v 50 mM K-fosfatnem pufru s pH 7,4. Koncentracije redčitev so bile 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,13 µg/mL in 1,56 µg/mL. Nato smo v luknje dodali 50 µg KRED raztopljenega v 100 µL 50 mM K-fosfatnem pufru. Količina encima je 10-krat večja kot količina za določanje kinetike. S tem smo zagotovili, da je reakcija stekla takoj in imamo v luknji samo nastali NADPH. Sledil je še dodatek 100 µL 2-propanola. Po petih minutah smo pomerili absorbenco pri 340 nm.

3.2.3 Obarjanje KRED

Z različnimi obarjalnimi sredstvi dosežemo porušitev tercialne in kvartarne zgradbe encima. Izoblikujejo se novi privlaki in ustvari se nova oblika encima. Pri encimih, kjer proces obarjanja prizanese aktivnemu mestu, lahko obarjanje izkoristimo za pripravo bolj stabilnih oblik encimov. Oborjeni encimi so zaradi svoje nove zgradbe bolj odporni na spremenjene reakcijske pogoje in ohranijo aktivnost (Gsponer in Vendruscolo, 2006). Ker se encimi različno odzovejo na različna obarjalna sredstva, smo podobno kot Prabhavathi in sod., 2009 pri pripravi agregatov KRED uporabili nasičeno raztopino amonsulfata ter aceton.

3.2.3.1 Optimizacija obarjanja encima KRED z amonsulfatom $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Najprej smo pripravili svežo raztopino encima KRED v 50 mM K-fosfatnem pufru s pH 7,4. V raztopini je bilo 50 mg KRED na mL pufra. Nato smo v 1,5 mL centrifugirkah združili določeno količino raztopine KRED in obarjalnega sredstva, ki je bil v našem primeru nasičena raztopina amonsulfata. Nasičeno raztopino amonsulfata smo pripravili v destilirani vodi. Razmerja raztopine encima in obarjalnega sredstva so prikazana v preglednici 12.

Preglednica 12: Količine reagentov za obarjanje KRED

Oznaka	Delež precipitanta v %Vol	Količina Precipitanta [μL]	Količina KRED (50 mg/mL) [μL]	Končna koncentracija
KRED	0%	0	500	25 mg/mL
80 %	80%	400	100	5 mg/mL
70 %	70%	350	150	7,5 mg/mL
60 %	60%	300	200	10 mg/mL
50 %	50%	250	250	12,5 mg/mL
40 %	40%	200	300	15 mg/mL

Ko smo združili vse reagente, smo mikrocentrifugirke zaprli in premešali. Nato smo jih inkubirali 2 uri na sobni temperaturi. Po končanem obarjanju smo raztopino z obarjenimi encimi redčili s 50 mM K-fosfatnim pufrom do konc. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tako pripravljene encimske aggregate smo do nadaljnje analize shranili v hladilnik na 4 °C.

3.2.3.2 Optimizacija obarjanja encima KRED z acetonom

Postopek obarjanja z acetonom je bil enak postopku priprave agregatov z nasičeno raztopino amonsulfata. Encimsko aktivnost smo kasneje določali z reakcijo, pri kateri je kot produkt nastajal tudi aceton. Ker bi presežen aceton, ki smo ga dodali med obarjanjem motil delovanje encima, smo ga po končanem obarjanju odstranili. To smo storili tako, da smo vzorce centrifugirali 5 minut na 3000 obr/min. Supernatant, ki je vseboval aceton, smo nato odlili in obarjene encime raztopili v 500 μL 50 mM K-fosfatnem pufru. Tako pripravljene encimske aggregate smo do nadaljnje analize shranili v hladilnik na 4 °C.

3.2.4 Priprava CLEA KRED

Na podlagi optimizacije obarjanja encima KRED smo izbrali postopek obarjanja, pri katerem je aktivnost obarjenega KRED najvišja v primerjavi z nativnim KRED. Ugotovili smo, da so agregati pripravljeni z nasičeno raztopino amonsulfata premalo trdni in se po večkratnem spiranju raztopijo, medtem ko ostanejo encimski agregati, pripravljeni z acetonom, trdno povezani. Ker take tudi potrebujemo, smo za pripravo CLEA uporabili postopek obarjanja z acetonom.

CLEA KRED smo pripravili tako, da smo predhodno obarjene encime zamrežili z zamreževalcem. Vendar, preden smo začeli s pripravo CLEA KRED, smo preverili vpliv samega zamreževalca na aktivnost encima KRED.

3.2.4.1 Vpliv glutaraldehyna na aktivnost KRED

Vpliv zamreževalca na aktivnost encima smo preverili s pripravo CLE KRED. Najprej smo pripravili svežo raztopino encima KRED s koncentracijo 50 mg/mL v 50 mM K-fosfatnem pufru. Nato smo pripravili redčitve 25 % glutaraldehyda. Pripravili smo 2×, 5× in 10×

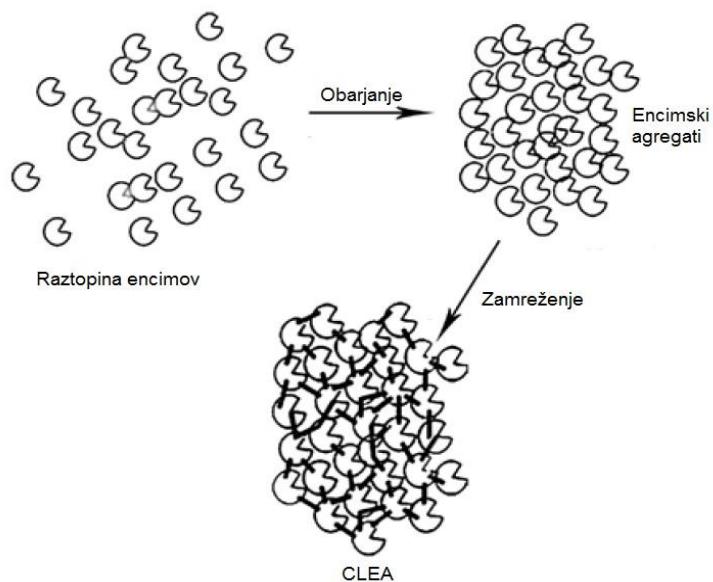
redčeno 25 % raztopino glutaraldehida. V 15 mL centrifugirko s 1475 µL 50 mM K-fosfatnemu pufru s pH 7,4 smo dodali 25 µL predhodno ustrezeno redčenega glutaraldehida in tako pripravili raztopino za zamreževanje. Raztopini smo dodali še 1,5 mL raztopine KRED s koncentracijo 50 mg/mL. Ob dodatku smo raztopino večkrat premešali z večkratnim pipetiranjem in inkubirali na sobni temperaturi 2 uri. Delali smo v dveh ponovitvah. Po končanem zamreževanju smo določili aktivnost encimov.

3.2.4.2 Vpliv dekstranaldehida na aktivnost KRED

Priprava dekstranaldehida je potekala v digestoriju. V čašo smo natehtali 0,93 g dekstrana in 2,17 g Na-metaperiodata. Nato smo dodali 28 mL destilirane vode. Sledilo je mešanje 90 minut. Medtem smo 40 cm membrane za dializo večkrat sprali v destilirani vodi. Spiranje membrane je potekalo 30 minut. Po končani oksidaciji dekstrana v dekstranaldehid smo membrano za dializo napolnili z reakcijsko mešanico. Membrano smo prenesli v 5 L čašo napolnjeno z destilirano vodo. V čašo smo dali tudi mešalo in jo postavili na magnetno mešalo. Dializa je potekala 2 uri. Na vsake pol ure smo zamenjali destilirano vodo s svežo (Caballero Valdés in sod., 2011).

V 1,5 mL mikrocentrifugirkah smo pripravili 2×, 5× in 10× redčitve raztopine dekstranaldehida. Nato smo izvedli zamreženje. K 2,5 mL [37,5 mg] raztopini KRED (pripravljen v 50 mM K-fosfatnem pufru pH 7,4) smo dodali 70,6 µL predhodno redčene raztopine dekstranaldehida. Zamreževanje je potekalo 2 uri na sobni temp. Po zamreženju smo encimom določili aktivnost.

3.2.4.3 Priprava KRED CLEA



Slika 16: Priprava CLEA (Mahmod in sod., 2014)

1. način

Pripravo KRED CLEA smo izvedli v 25 mL stekleni bučki za rotavapor. 200 mg KRED smo raztopili v 4 mL 50 mM K-fosfatnem pufu (pH 7,4). Nato smo z dodatkom 4 mL acetona oborili KRED. Po dveh urahobarjanja smo aggregate zamrežili z dodatkom 376,4 µL [10 mg] dekstranaldehyda (raztopino dekstranaldehyda smo pripravili v točki 3.2.4.2). Zamreževanje agregatov je potekalo med stresanjem na stresalniku pri 200 rpm. Potekalo je 2 uri pri sobni temperaturi. V naslednjem koraku smo z rotavaporjem odparili aceton (temp. 30 °C, 40 mBar, 20 min). Pripravljenim CLEA KRED smo dodali 2,5 mL 50 mM K-fosfatnega pufra pH 7,4. Tako pripravljene CLEA KRED smo shranili v hladilnik (4 °C).

2. način

V 50 mL centrifugirko smo dali 10 mL v 50 mM K-fosfatnem pufru (pH 7,4) pripravljene raztopine encima KRED s konc. 50 mg/mL. KRED smo nato z dodatkom 10 mL acetona oborili. Obarjanje je potekalo pri sobni temperaturi 2 uri. Vmes smo občasno premešali. V naslednjem koraku smo oborjenim KRED dodali 896,1 µL raztopine, ki je vsebovala 23,81 mg dekstranaldehyda (tega smo pripravili v točki 3.2.4.2). Sledilo je zamreževanje, ki je potekalo 2 uri na stresalniku pri 250 rpm. Zamrežene aggregate smo nato 5 minut centrifugirali pri 2700 obr/min. Supernatant smo odlili v teflonsko centrifugirko in mu dodali 20 mL 50 mM K-fosfatnega pufra pH 7,4. Supernatant smo nato centrifugirali 10 minut pri 10000 obr/min (njegov supernatant smo zavrgli in pelet supernatanta raztopili v 5 mL 50 mM K-fosfatnem pufru pH 7,4, ter raztopino dodali k peletu CLEA. Peletu s CLEA KRED smo dodali še 10 mL pufra in ga resuspendirali. Nato smo CLEA KRED ponovno centrifugirali 4 minute na 2500 obr/min. Supernatant smo odlili v teflonsko centrifugirko in mu dodali 20 mL 50 mM K-fosfatnega pufra pH 7,4. Supernatant smo nato centrifugirali 10 minut pri 10.000 obr/min, njegov supernatant smo zavrgli in pelet supernatanta raztopili v 5 mL 50 mM K-fosfatnem pufru pH 7,4 ter raztopino dodali k peletu CLEA.

3.2.4.4 Priprava KRED CLEA s pomožnim proteinom BSA

Priprava CLEA KRED s pomožnim proteinom BSA, kjer smo proteine oborili z acetonom

Pri pripravi CLEA KRED z BSA pomožnim proteinom smo testirali vpliv dveh razmerij, ki sta jih uporabili tudi Caballero Valdés in sod. (2011) v svoji študiji.

- KRED:BSA = 15:1

Pripravo KRED CLEA s pomožnim proteinom smo izvedli v 25 mL stekleni bučki za rotavapor. 3750 µL raztopine KRED pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufu (s konc. 50 mg/mL) smo skupaj z 250 µL raztopine BSA pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufu (s konc. 50 mg/mL) dali v bučko. Nato smo označili nivo, do katerega je segala raztopina. Encime smo oborili z dodatkom 4 mL acetona. Z

dodatkom 376,4 µL [10 mg] dekstranaldehida (pripravljenega v točki 3.2.2.2) smo zamrežili aggregate proteinov. Zamreževanje agregatov je potekalo 2 uri pri sobni temperaturi med stresanjem na stresalniku pri 200 rpm. V naslednjem koraku smo z rotavaporjem odparili aceton (temp. vode 35 °C, 75 mBar, 15 minut). Ko smo odstranili ves aceton iz bučke, smo v bučko dodali 1 mL 50 mM K-fosfatnega pufra ter 1,5 mL dH₂O, z namenom, da smo sprali vse encime s sten bučke. Raztopino s CLEA KRED/BSA smo trikrat prečrpali skozi iglo injekcije, tako da smo razbili večje kose CLEA. Tako pripravljene CLEA KRED smo shranili v hladilnik (4 °C).

- **KRED:BSA = 5:1**

Pripravo KRED CLEA s pomožnim proteinom smo izvedli v 25 mL stekleni bučki za rotavapor. 3333 µL raztopine KRED pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufru (s konc. 50 mg/mL) smo skupaj s 667 µL raztopine BSA pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufu (s konc. 50 mg/mL) dali v bučko. Nadaljnji postopek priprave je enak kot v zgornji točki, kjer je opisana priprava CLEA, ki ima razmerje KRED:BSA = 15:1

Priprava CLEA KRED s pomožnim proteinom BSA, kjer smo proteine oborili z nasičeno raztopino (NH₄)₂SO₄

- **KRED:BSA = 15:1**

Pripravo KRED CLEA s pomožnim proteinom smo izvedli v 25 mL stekleni bučki za rotavapor. 2,813 mL raztopine KRED pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufru (s konc. 50 mg/mL) smo skupaj s 187 µL raztopine BSA pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufru (s konc. 50 mg/mL) dali v bučko. Nato smo encime oborili z dodatkom 7 mL nasičene raztopine amonsulfata. Obarjanje je potekalo 2 uri pri sobni temperaturi. Vmes smo reakejsko zmes občasno premešali. Po končanem obarjanju smo dodali 22,82 µL raztopine dekstranaldehida. Zamreževanje je nato potekalo 2 uri pri sobni temperaturi pri 250 rpm. Po končanem zamreževanju smo vzorce centrifugirali 20 minut pri 3000 obratov/min. Supernatant smo zavrgli in peletu dodali 10 mL dH₂O. Usedlino smo homogenizirali in shranili v hladilnik.

- **KRED:BSA = 5:1**

Pripravo KRED CLEA s pomožnim proteinom smo izvedli v 25 mL stekleni bučki za rotavapor. 2,5 mL raztopine KRED pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufru (s konc. 50 mg/mL) smo skupaj z 0,5 mL raztopine BSA pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufu (s konc. 50 mg/mL) dali v bučko. Nato smo encime oborili z dodatkom 7 mL nasičene raztopine amonsulfata. Nadaljni postopek je bil enak opisanemu postopku za pripravo CLEA KRED/BSA z razmerjem KRED: BSA = 15:1.

3.2.4.5 Razgradnja CLEA za analizo z elektroforezo

Ker so lahko zamreženi agregati v obliki CLEA tudi po denaturaciji in kuhanju preveliki, da bi vstopili v gel, smo že leli ugotoviti, ali ostane kaj CLEA v žepku gela in kolikšen je ta delež. Dobljeni delež smo nato upoštevali pri prej z elektroforezo določenih vrednostih proteinov v vzorcih. Delež proteina, ki ostane v žepku, smo določili z analizo gela s programom Syngene. Za kontrolo smo uporabili proteinazo K razgrajenine CLEA. Pričakujemo, da bodo vzorci CLEA, ki smo jih predhodno razgradili s proteinazo K vstopili v gel, medtem ko bo pri nerazgrajenih CLEA ostal delež CLEA v žepkih. Pripravili smo več različnih redčitev tako razgrajenih kot tudi nerazgrajenih CLEA. Te smo nato denaturirali s $5\times$ nanašnem pufrom, jih prekuhalili ter jih nanesli na gel. S pripravo več različnih redčitev smo že leli dobiti čim širše območje detekcije na gelu.

Razgradnja vzorca CLEA

V destilirani vodi smo pripravili raztopino proteinaze K s koncentracijo 20 mg/mL. V 1,5 mL mikrocentrifugirko smo dali 1 mL CLEA KRED pripravljenih v točki 3.2.4.3 in dodali 40 μ L raztopine proteinaze K. Dodali smo tudi 50 μ L 1 M K_2HPO_4 pufera ter 10 μ L 180 mM $CaCl_2$. Mikrocentrifugirko smo nato prenesli v vodno kopel, ker smo inkubirali 48 ur na 50 °C.

Za kontrolo v poskusu smo že leli na gel nanesti nerazgrajene CLEA KRED. Pripravili smo jih tako, da smo k 1 mL CLEA dodali proteinaze, vendar nismo dodali za njeno delovanje potrebnega $CaCl_2$ in tudi vsebino epice nismo inkubirali v vodni kopeli.

Redčenje vzorcev

Oba pripravljena vzorca (s proteinazo K razgrajeni in nerazgrajeni CLEA KRED) smo nato redčili v 50 mM K-fosfatnem pufru v razmerju 1:1. Z nadaljevanjem redčitvene vrste smo pripravili vedno bolj redčene vzorce. Ustrezno redčene vzorce smo nato pripravili po postopku (opisanem v točki 3.2.1.2) za pripravo vzorcev za nanos na elektroforezni gel. 160 μ L ustrezno redčenemu vzorcu smo dodali 40 μ L $5\times$ nanašnega pufra. Vzorce smo 10 minut kuhalili v vreli vodi ter jih nato po 10 μ L nanesli na gel (preglednica 13). Po nanosu vzorcev smo elektroforezno kadičko zaprli in izvajali proces elektroforeze 35 minut pri konstantni napetosti 150 V. Zaradi suma, da bi se lahko proteini, ki so ostali v žepku gela, med nadalnjim postopkom barvanja in spiranja odlepili, smo nadaljnji postopek priprave gela za kasnejšo računalniško analizo prilagodili. V žepke smo nanesli 10 μ L barvila, ki smo mu predhodno dodali 20 % v/v glicerola (400 μ L barvila in 100 μ L glicerola) ter ga nanesli v žepek. To smo storili tako, da smo iz elektroforezne kadičke, med geloma odpipetirali približno 30 mL 1× elektroforeznega pufra (toliko, da žepeki niso več potopljeni v pufru). Nato smo v žepeke dali po 10 μ L raztopine za barvanje žepek. Po 10–15 minutah smo ponovno dodali 1× elektroforezni pufer, ter znova zagnali elektroforezo za 2–3 minute. Nadaljnja priprava je potekala po klasičnem postopku.

Elektroforezo smo ustavili, razstavili komponente in gele barvali ter razbarvali (protokol opisan v točki 3.2.1.2).

Preglednica 13: Razporeditev vzorcev na gelu za NaDS-PAGE elektroforezo

	1. Gel	2. Gel
1	S10	S10
2	S12	S12
3	8A	5A
4	8B	5B
5	9A	7A
6	9B	7B
7	8aA	3A
8	8aB	3B
9	Neredčen CLEA	2A
10	Nered. razgrajen CLEA	2B

S10 in S12 sta vzorca nativnega KRED, in sicer s konc. 56 µg/mL in 32 µg/mL. Drugi vzorci so vzorci CLEA KRED. Številka predstavlja število redčitev. Črka A – nerazgrajen CLEA KRED. Črka B – s proteinazo K razgrajeni CLEA KRED.

3.2.5 Določitev aktivnosti nativnega in oborjenega encima KRED pri različnih temperaturah, vrednostih pH ter ponovni uporabi

3.2.5.1 Vpliv temperature na aktivnost različnih oblik KRED

Aktivnost nativnega in oborjenega KRED smo testirali pri temperaturi 30 °C, 40 °C in 50 °C. Najprej smo pripravili ustrezne redčitve encimov. Redčitve encimov smo pripravljali v velikih volumnih (10 mL), tako da smo zmanjšali možnost napak, ki bi lahko nastale pri pipetiranju. Redčitev smo izvedli v dveh korakih. Najprej smo pripravili redčitev 1250 µg/mL, nato pa še 125 µg/mL. Redčitve smo izvedli s 50 mM K-fosfatnim pufrom s pH 7,4.

Reakcijsko mešanico za določitev kinetike encimov pri 30 °C in 40 °C smo pripravili v 1,5 mL mikrocentrifugirkah. Reagente, potrebne za reakcijo, smo predhodno ogreli na ustrezeno temperaturo s pomočjo vodne kopeli. Ko smo v mikrocentrifugirki združili vse tri komponente potrebne za reakcijo (encim, NADP, 2-propanol), smo reagente premešali in prenesli 250 µL reakcijske mešanice na mikrotitrsko ploščo, ki smo jo predhodno segreli v čitalcu za mikrotitrsko ploščo Safire Tecan. Ko smo na ploščo nanesli reakcijsko mešanico, smo takoj začeli z meritvami vrednosti absorbanc pri valovni dolžini 340 nm. Kinetiko smo spremljali 20 minut, in sicer smo vrednosti absorbanc odčitali vsako minuto.

Aktivnost encimov pri 50 °C smo spremljali na enak način kot pri 30 in 40 °C. Vse reagente smo predhodno segreli v vodni kopeli. Volumen reakcijske mešanice je bil 10 mL. Nato smo z injekcijo vzorčili na dvominutne intervale po 1 mL reakcijske mešanice in

jo prefiltrirali skozi filter, ter jo na ploščo nanesli po 250 µL. Vrednost absorbance smo pomerili pri valovni dolžini 340 nm.

3.2.5.2 Vpliv pH na aktivnost različnih oblik KRED

Predhodno pripravljene encime KRED, ki so bili v nativni obliki ter v oborjeni obliki, smo redčili do redčitve 0,5 mg/mL. Redčitve smo pripravili v šestih korakih redčenja, ki smo jih izvedli v 1,5 mL mikrocentrifugirkah, in sicer tako, da smo 500 µL raztopine z encimom prenašali k 500 µL svežemu 50 mM K-fosfatnem pufru. Kinetiko smo spremeljali spektrofotometrično s čitalcem Tecan Safire. Kinetiko smo določali pri treh različnih pH vrednostih. Uporabili smo 50 mM K-fosfatni pufer s pH 7,4 ter pufr, ki sta imela višjo oz. nižjo pH vrednost. Pufer z nižjim pH je bil 50 mM KH₂PO₄ pH 4,5. Pufer z višjim pH pa je bil 50 mM K₂HPO₄ s pH vrednostjo 9,3. Reakcijsko mešanico, ki je bila sestavljena iz 53 µL [27 µg] raztopine KRED, 447 µL pufra z določenim pH ter 500 µL 2-propanola, smo pripravili v 1,5 mL mikrocentrifugirkah. Nato smo vsem vzorcem hkrati dodali 250 µL [0,5 mg] raztopine NADP ter premešali. Na mikrotitrsko ploščo smo nanesli 250 µL vzorca z reakcijsko zmesjo ter kinetiko spremeljali 20 minut, in sicer smo vrednosti absorbanc odčitali vsako minuto. Z mikro pH sondo smo pomerili vrednost pH reakcijske mešanice, saj se ob dodatku vseh komponent pH vrednost spremeni.

3.2.5.3 Ohranitev aktivnosti po večkratnih ciklih uporabe encima.

S tem testom smo preverili delovanje encima v določeni encimski obliki po daljšem delovanju. Test smo zastavili tako, da smo merili količino nastalega NADPH. V tem primeru nas hitrost reakcije ni zanimala, zanimalo nas je le, ali encim po večkratnih ciklih opeša in pretvorji manj NADP v NADPH kot v prejšnjem ciklu. Komponente reakcijske mešanice so bile enake kot pri prejšnjih reakcijskih mešanicah, razlika je bila le v količini encima, ki je bila v presežku (kar štirikrat več kot v prejšnjih reakcijskih mešanicah).

Predhodno pripravljene encime KRED, ki so bili v nativni obliki ter v oborjeni obliki, smo redčili do redčitve 0,2 mg/mL. To smo storili tako, da smo v 1,5 mL mikrocentrifugirkah redčili encim v razmerju 1:1 (500 µL raztopine encima + 500 µL 50 mM K-fosfatnega pufra). Reakcijsko mešanico za prvi cikel smo pripravili v 50 mL centrifugirki. Vsebovala je 0,5 mL [100 µg] encima, 0,5 mL 2-propanola in 0,25 mL [0,5 mg] raztopine NADP. Raztopino z reakcijsko mešanico smo stressali na stresalniku pri 200 rpm. Po petih minutah, ko je reakcija pretvorbe NADP v NADPH potekla do konca, smo reakcijski mešanici dodali 2× volumen sveže reakcijske mešanice brez encima. Razmerja komponent smo ohranili (40 % v/v 50mM K-fosfatni pufer pH 7,4, 40 % v/v 2-propanol in 20 % raztopine NADP z konc. 2mg/mL). Prvič smo absorbanco pomerili po četrtem ciklu. To smo storili tako, da smo raztopino premešali ter nato homogeno odvzeli 250 µL vzorca, ki smo mu pomerili vrednost absorbance pri 340 nm. Po petem ciklu je bil volumen reakcijske mešanice približno 35 mL. Da smo lahko poskus nadaljevali, smo prenesli 2 mL

homogeno odvzete reakcijske mešanice petega cikla in ji tako kot v prejšnjih ciklih dodali 2 mL sveže reakcijske mešanice, ki je bila brez encima. Sedmi cikel smo dobili tako, da smo k reakcijski mešanici šestega cikla dodali še enkratni volumen (4mL) mL sveže reakcijske mešanice, ki je bila brez encima. V zadnjem osmem ciklu smo dodali k 7,5 mL 0,8 mL [1,6 mg] raztopine NADP.

3.2.6 Testiranje delovanja oborjenega KRED v simuliranem industrijskem okolju oziroma reakciji

Pripravljeno obliko KRED smo testirali še v simuliranem industrijskem okolju, kjer encim KRED opravlja oksidacijo 2-propanola v aceton ter redukcijo NADP v NADPH. Ker so reakcijski pogoji v različnih kombinacijah biokataliznih procesov različni, med drugim pogosto naletimo na goste in viskozne reakcijske mešanice, smo želeli njihov učinek preveriti tudi v omenjenih pogojih. Za kontrolo smo izbrali laboratorijsko simulacijo enega od tovrstnih procesov, v katerih ima KRED vlogo zagotavljanja NADPH drugemu encimu – oksidoreduktazi. Poskrbeli smo, da je bila doza KRED dovolj nizka, da je bila proizvodnja NADPH omejujoči dejavnik celotnega sistema. Reakcijo smo izvedli v volumnu 15 mL ter 2 L.

3.2.6.1. Test v 30 mL serumskih stekleničkah (V = 15 mL)

Testni sistem je bil dizajniran tako, da sta se v vseh poskusih razlikovali samo oblika in (suboptimalna) količina encima KRED. Druge komponente so ostale nespremenjene. Vprašanje, na katera smo želeli odgovoriti, je bilo samo eno, in sicer, ali ima agregiran encim KRED kakršno koli prednost pred neagregiranim tudi v okolju, v katerem je reakcijska mešanica gosta in viskozna.

- 3,25 mg oborjenega KRED v sistemu

Poskus smo zastavili tako, da smo encim KRED oborili v steklenički, v kateri smo kasneje izvedli reakcijo v simuliranem industrijskem okolju. Tako smo preprečili nastanek izgub encima, ki bi lahko nastale med pripravo in prenosom acetonskih agregatov iz druge embalaže. Delali smo v dveh ponovitvah, tako da smo imeli dva poskusa z oborjenim in dva poskusa z nativnim KRED (ta sta služila kot kontroli). Poskus smo izvedli v 30 mL serumskih stekleničkah. Najprej smo v dveh oborili 3,25 mg KRED. Obarjanje smo izvedli tako, da smo v čisto stekleničko prenesli 65 µL raztopine KRED [3,25 mg] pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufru pH 7,4 in ji dodali 65 µL acetona. Volumen je bil namensko zelo majhen, saj smo hoteli ohraniti razmerje pogojevobarjanja iz laboratorijskih poskusov, kjer je imela raztopina KRED koncentracijo 50 mg/mL. Če bi želeli obarjati v večjih volumnih, bi morali delati z raztopino KRED, ki bi imela nižjo koncentracijo, da bi v stekleničko prinesli 3,25 mg encima. S tem dejanjem pa bi spremenili pogoje, ki smo jih imeli pri poskusih optimizacije obarjanja KRED, saj bi na enoto encima prišlo več enot

acetona. Steklenički smo zaprli s kosom vate prepojenim z acetonom in pustili na sobni temperaturi 2 uri. Po dneh urah smo steklenički odprli in ju postavili v digestorij, ter na ta način odhlapeli aceton iz raztopine. Po končanem odparevanju smo steklenički zaprli z gumijastim pokrovčkom in ju shranili čez noč v hladilniku na 4 °C. Naslednji dan smo nadaljevali s poskusom. Poleg dveh stekleničk z oborjenim KRED smo pripravili še dve steklenički, ki smo ju uporabili za kontrolo poskusa. V vse štiri stekleničke smo dodali 50 mM K₂HPO₄ pufer. Sledil je dodatek substrata, 2-propanola, drugih encimov in kofaktorja NADP. Stekleničke smo pri sobni temperaturi mešali s pomočjo magnetnih mešal. Vzorcili smo z injekcijo skozi gumijast pokrovček. Vzorec smo pripravili za analizo tako, da smo 0,3 mL vzorca dodali k 10 mL metanola.

- 2 mg oborjenega KRED v sistemu

Poskus smo zastavili tako, da smo encim KRED oborili v steklenički, v kateri smo kasneje izvedli reakcijo. Uporabili smo 30 mL serumske stekleničke. Najprej smo v vsaki od dveh oborili 2 mg KRED. Obarjanje smo izvedli tako, da smo v čisto stekleničko prenesli 40 µL raztopine KRED, pripravljene v 50 mM K-fosfatnem pufru pH 7,4 in ji dodali 40 µL acetona. Volumen je bil namensko zelo majhen, saj smo hoteli ohraniti razmerje pri pogojih obarjanja iz laboratorijskih poskusov. Steklenički smo zaprli s kosmom vate, prepojenim z acetonom in inkubirali na sobni temperaturi 2 uri. Po dveh urah smo steklenički odprli in ju postavili v digestorij, ter na ta način odhlapeli aceton iz raztopine. Po končanem odparevanju smo steklenički zaprli z gumijastim pokrovčkom in ju shranili čez noč v hladilniku na 4 °C. Naslednji dan smo nadaljevali s poskusom. Poleg dveh stekleničk z oborjenim KRED smo pripravili še dve steklenički z enako količino nativnega KRED, ki smo ju uporabili za kontroli poskusa. Nato smo v vse štiri stekleničke dali enake količine vseh reagentov (50 mM K₂HPO₄ pufer, substrat, 2-propanol, druge encime in kofaktor NADP) ter pri sobni temperaturi mešali s pomočjo magnetnih mešal. Vzorcili smo z injekcijo skozi gumijast pokrovček. Vzorec smo pripravili za analizo tako, da smo 0,3 mL vzorca dodali k 10 mL metanola.



Slika 17: Testiranje delovanja oborjene KRED v 30 mL serumskih stekleničkah

3.2.6.2 Test v reaktorju ($V = 2L$)

Poskus smo začeli s pripravo 7 mL raztopine KRED s konc. 50 mg/mL (350 mg KRED smo raztopili v 7 mL 50 mM K-fosfatnega pufra). Nato smo v 200 mL plastični centrifugirki, v kateri je bilo 6 mL acetona, oborili 6 mL [300mg] KRED. Z rahlim stresanjem smo vsebino premešali in centrifugirko zaprli. Obarjanje je potekalo 1 uro pri sobni temperaturi. Po končanem obarjanju smo centrifugirko odprli in jo postavili v degistorij, kjer smo 30 minut izhlapevali aceton.

OPOMBA: KRED je bil izpostavljen acetonu vse do prenosa v reaktor, kar je skupno 3 ure.

Poskus smo izvedli v 10-litrskem reaktorju BIAZZI S. A. Switzerland (Delovni volumen: 2L, aksialno turbinsko mešalo).



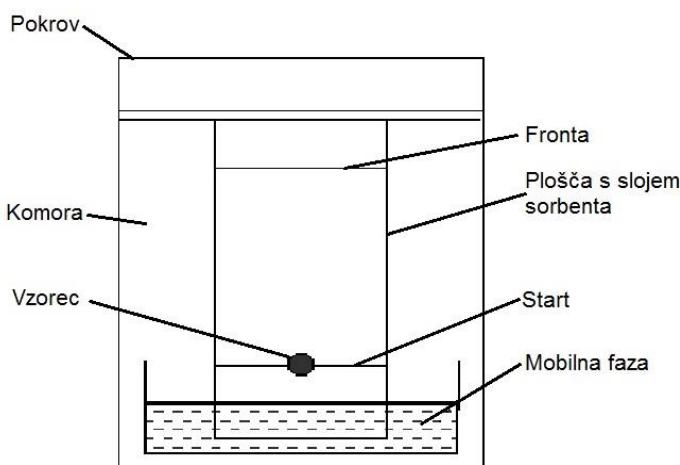
Slika 18: BIAZZI – reaktor sistem (levo) in mešalo – turbina (desno).

Reaktor smo najprej temeljito sprali z etanolom, ter počakali, da se je posušil. Nato smo vanj dali 50 mM K₂HPO₄ pufer, 2-propanol in substrat. Sledil je dodatek oborjenega KRED [0,3 g]. Reaktor zapremo in mešamo 2 minuti. Premešamo in pomerimo pH. Ko smo dodali še zadnje komponente (druge encime in kofaktor NADP), smo reaktor zaprli in nastavili reakcijske pogoje. Vzorčili smo na dvourne intervale in vzorce analizirali s HPLC analizo.

3.2.6.3 Tankoplastna kromatografija (TLC)

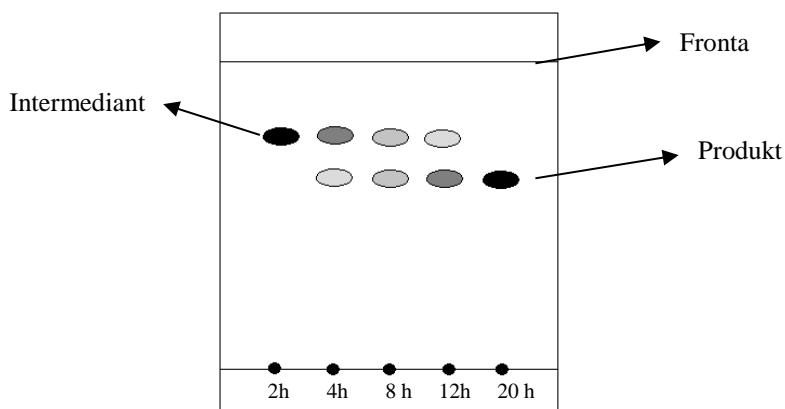
Tankoplastna kromatografija je planarna separacijska tehnika. Komponente se ločujejo med potovanjem mobilne faze po tanki plasti sorbenta. Sorbent je običajno nanesen na steklene, aluminijaste plošče ali plastične folije. TLC (Thin Layer Chromatography) je odprt sistem, zato je pomembna tudi plinska faza, ki se ustvari v kromatografski kadi (Prošek in Pukl, 1991).

Vzorce na ploščo lahko nanašamo v točko ali v črto, v razdalji 10 mm do 20 mm, odvisno od števila vzorcev. Nanašamo jih s pomočjo steklene kapilare 10 mm od spodnjega roba. V točko se nanese 0,2 µL do 10 µL vzorca. Razvijanje kromatograma poteka v posebnih kromatografskih posodah. Na dno kadi nalijemo mobilno fazo, ki je mora biti toliko, da je TLC plošča potopljena vanjo okoli 0,5 cm globoko. Ploščo se postavi v kad in mobilna faza začne potovati po plošči navzgor. S seboj nosi tudi molekule komponent vzorca. Med potovanjem prihaja do različnih interakcij, zato se komponente v vzorcu ločijo. Ko mobilna faza prispe do zgornje meje plošče, imenovane fronta, jo vzamemo iz kadi in posušimo.



Slika 19: Skica priprave in postavitev TLC

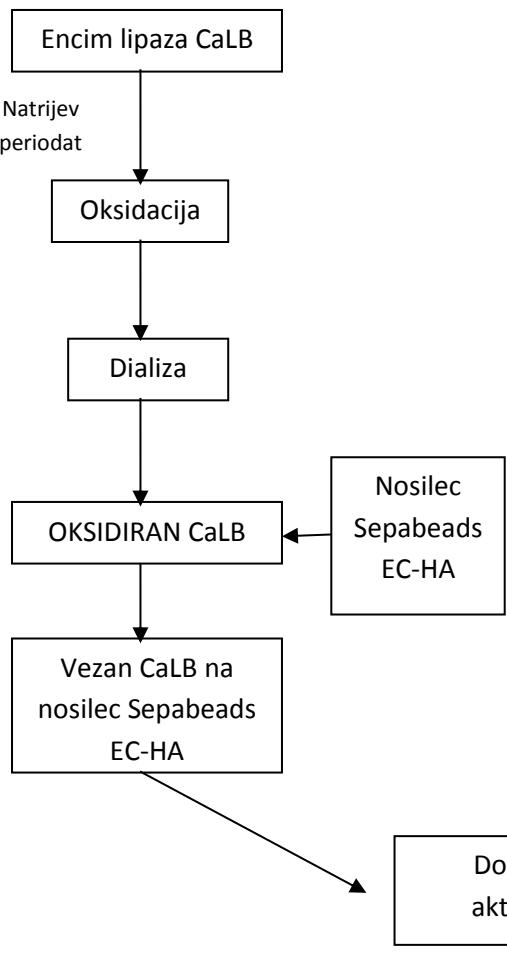
S tankoplastno kromatografijo smo spremljali nastanek produkta in porabe intermediata v simuliranem industrijskem procesu oziroma reakciji. Na začetku procesa je bila samo ena lisa, ki je prikazovala intermediat. Skozi proces transformacije se je količina intermediata zmanjševala in nastajal je produkt. To smo lahko prepoznali v vedno šibkejši lisi intermediata ter vedno močnejši lisi produkta. Proses reakcije smo vodili, dokler se ni pretvoril ves intermediat v produkt. Mobilna faza je imela sestavo: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : 25 \% \text{ NH}_3 = 85 : 10 : 1$.



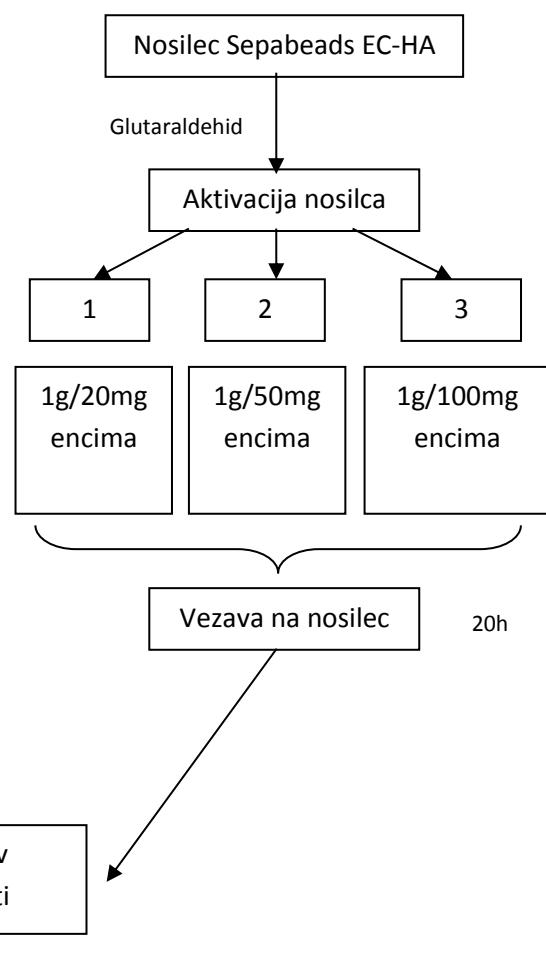
Slika 20: Shematični prikaz rezultata TLC analize vzorcev

3.3 METODE UPORABLJENE PRI IMOBILIZACIJI CaLB

Vezava CaLB na nosilec Sepabeads
 EC-HA skozi oksidacijo encima



Vezava CaLB na nosilec Sepabeads
 EC-HA preko aktivacije nosilca



Slika 21: Shema dveh načinov imobilizacije encima CaLB na trden nosilec

Encim + p-nitrofenil acetat

3.3.1 Vezava CaLB na nosilec Sepabeads EC-HA z oksidacijo encima

Metoda imobilizacije – vezave encima, temelji na vezavi aldehidne skupine z aminske skupino na nosilcu in/ali encimu. Postopek imobilizacije smo izvedli po protokolu Prlainović in sod., 2011. Najprej smo pripravili oksidacijo lipaze z natrijevim periodatom. Encim izpostavimo delovanju periodata, ki oksidira aminske skupine encima do aldehidnih skupin. Aldehidne skupine se lahko nato povežejo z aminskimi, ki se nahajajo na nosilcu. Priprava 50 mM Na-periodata je potekala v digestoriju, kjer smo v 50 mL Na-acetatnem pufru s pH 5,04 raztopili 534,7 mg natrijevega periodata. Nato smo v 100 mL erlenmajerici raztopili 300 mg CaLB v 51 mL Na-acetatnem pufru s pH 5,04. Oksidacijo encima smo sprožili s 36 mL predhodno pripravljenega 50 mM Na-periodata. Sledila je 6-urna inkubacija v temi na ledu. Oksidacijo smo ustavili z dodatkom 66 µL etilen glikola ter inkubacijo 30 minut.

Medtem smo pripravili membrano za dializo. Dvajset centimetrov membrane MWCO 3500 smo sprali z namakanjem v destilirani vodi. Vsebino reakcijske zmesi oksidiranega encima smo prelili v predhodno na enem koncu zavezane membrane. Dializo smo izvajali v 50 mM acetatnem pufru s pH 5.

1. dializa: 30 min v 1 L 50 mM Na-acetatni pufer s pH 5,04
2. dializa: 14 h v 2 L 50 mM Na-acetatni pufer s pH 5,04
3. dializa: 3 h v 2 L 50 mM Na-acetatni pufer s pH 5,04
4. dializa: 3 h v 2L 50 mM Na-acetatni pufer s pH 5,04

Po končani dializi je sledila vezava oksidiranega encima na nosilec sepabeads EC-HA. V 250 mL stekleničko smo odpipetirali 80 mL (konc. 3,45 mg/mL) dializirane raztopine z oksidiranim encimom. Oksidiranemu encimu smo dodali 1,84 g navlaženega (navlažen je bil že v originalni embalaži) nosilca sepabeads EC-HA. Steklenico smo postavili v izolirano škatlo, v kateri so bili skupaj z ledom, ohlajeni hladilni geli. Vezava na nosilec je potekala 48 ur na stresalniku pri 190 rpm. Pripravljene nosilce z vezanimi nosilci smo pustili na pultu nekaj minut, da so se posedli, ter nato odpipetirali supernatant z nevezanimi encimi in ga shranili v zamzrovalnik na -20 °C. Sledilo je 5× spiranje nosilcev s 50 mM K-fosfatnim pufrom pH 7,2. Po zadnjem spiranju smo k nosilcu z encimi dali še 40 mL 50 mM K-fosfatnega pufra pH 7,2, z namenom, da smo preprečili posušitev. Pripravljene nosilce smo do merjenja aktivnosti shranili v hladilniku na 4 °C.

3.3.2 Vezava CaLB na nosilec Sepabeads EC-HA preko aktivacije nosilca

Vezavo encima lahko izvedemo tudi preko aktivacije nosilca, kjer se glutaraldehid z aminske skupino poveže na nosilec in predstavlja povezavo (most), na katero se lahko veže aminska skupina na encimu. Postopek imobilizacije smo izvedli po protokolu Prlainović in sod., 2011.

V 50 mL centrifugirki smo pripravili 20 mL 2 % (w/v) raztopine glutaraldehyda, tako da smo k 1,509 mL 25 % raztopine glutaraldehyda dodali 18,5 mL dH₂O. Tej raztopini smo dodali še 5 g navlaženega nosilca Sepabeads EC-HA. Aktivacija nosilca je potekala pri sobni temperaturi, med rahlim stresanjem. Po eni uri in pol smo k raztopini z aktiviranim nosilcem dodali 20 mM K-fosfatnega pufera s pH 8, ter raztopino večkrat sprali v tem pufru. Na koncu smo raztopino s spranim nosilcem centrifugirali in supernatant zavrgli.

Nadalje smo poskus razdelili v tri dele. Namen tega koraka je bila priprava nosilcev, ki so imeli na voljo za vezavo različno količino encima. V 50 mL centrifugirki z oznako A smo pripravili nosilec, ki je imel na svoji površini najmanj encima, medtem ko sta centrifugirki B in C imeli na voljo več encima.

Preglednica 14: Vezava nativnega CaLB na aktiviran nosilec Sepabeads EC-HA

A	B	C
1g aktiviran mokri nosilec	1g aktiviran mokri nosilec	1g aktiviran mokri nosilec
4 mL 20 mM K-fosfatni pufer pH 8	4 mL 20 mM K-fosfatni pufer pH 8	4 mL 20 mM K-fosfatni pufer pH 8
20 mg nativni CaLB	50 mg nativni CaLB	100 mg nativni CaLB

Za kasnejši izračun aktivnosti vezanih encimov je zelo pomemben ta korak, saj smo določeno količino encima dodali k 1 g mokrega in ne navlaženega nosilca, kot smo to storili v prejšnji metodi. To maso je potrebno upoštevati pri interpretaciji rezultatov.

Po dodatku vseh komponent, ki so navedene v preglednici 14, smo centrifugirke inkubirali. Vezava je potekala 20 ur na stresalniku pri 190 rpm pri sobni temperaturi. Po končani vezavi encima na nosilec smo supernatant, ki je vseboval nevezane encime, odpipetirali in ga shranili v zamzrovalnik na -20 °C. Nosilce smo še 3× sprali z 20 mM K-fosfatnim pufrom pH 8. Po zadnjem spiranju smo k nosilcu dodali še 5 mL 20 mM K-fosfatnega pufera, toliko da so bili nosilci v pufru in se niso posušili. Pripravljeni nosilci smo do merjenja aktivnosti shranili v hladilniku na 4 °C.

3.3.3 Določitev količine vezanega encima na nosilec sepabeads EC-HA

Količino vezanega encima smo določili s spektrofotometrično metodo po Lowryju, ki smo jo priredili za delo v mikrotitrskih ploščah. Določali smo količino nevezanega encima in to vrednost odsteli od znane količine encima, ki smo jo dali k nosilcu.

Metoda po Lowryju

Metoda po Lowryju je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za določevanje koncentracije proteinov. V prvem koraku poteče biuretska reakcija, ko proteine izpostavimo bakrovim ionom v alkalni raztopini, kjer se formira tetradante-bakov kompleks iz štirih peptidnih vezi in enim atomom bakra. V drugem koraku dodamo Folin-fenolov reagent, ki se reducira in tvori modro barvo (Lowry in sod., 1951).

Raztopina za izvedbo Lowryjeve metode mora biti dnevno sveža. Vnaprej lahko pripravimo posamezne raztopine, ki jih nato na dan izvedbe poskusa združimo. Pripravljeni raztopini združimo v razmerju raztopina A : raztopina B : raztopina C = 100:1:1. Sestava posameznih raztopin je navedena v preglednici 11. Količino proteinov smo določili po prirejenem Lowryjevem postopku – Dulekgurgen, 2004. V 1,5 mL mikrocentrifugirko smo k 0,5 mL vzorca ali standarda dodali 0,7 mL Lowryjeve raztopine (A+B+C), jo zaprli in premešali. Nato smo mikrocentrifugirke inkubirali 20 minut v temi pri sobni temperaturi. Medtem smo v zadnjih petih minutah inkubacije pripravili redčitev Folin in Ciocalteu's Phenol 2N reagent. Pripravili smo ga tako, da smo k 1 mL Folin in Ciocalteu's Phenol 2N reagentu dodali 1,2 mL dH₂O. Po končani dvajsetminutni inkubaciji v temi smo k vzorcem dodali 100 µL razredčenega Folin in Ciocalteu's Phenol reagenta. Reagente smo premešali z vrtinčnim mešalnikom in jih ponovno dali inkubirat v temo za 30 minut. Po končani inkubaciji smo na mikrotitrsko ploščo nanesli po 300 µL po Lowryju pripravljenega vzorca. Vzorcem smo pomerili absorbanco pri 750 nm (Dulekgurgen, 2004).

3.3.3.1 Določitev količine vezanega CaLB na nosilcu sepabeads EC-HA pripravljenega v točki 3.3.1 (vezava preko oksidacije encima)

Priprava umeritvene krivulje

Encim CaLB, ki smo ga oborili v koraku 3.3.1, smo uporabili tudi za postavitev umeritvene krivulje. Najprej smo pripravili redčitveno vrsto oksidiranega encima CaLB, koncentracijo oksidiranega encima 3,45 mg/mL. Pripravili smo sedem redčitev oksidiranega encima, tako da smo prenesli določen alikvot encima v točno določeno količino dH₂O. Redčitve, ki smo jih pripravili, so bile: 1,7 mg/mL; 1,035 mg/mL; 690 µg/mL; 400 µg/mL; 345 µg/mL; 50 µg/mL. Za slepi vzorec smo uporabili dH₂O. Nato smo nadaljevali s postopkom po Lowryju opisanem v točki 3.3.3.

Določitev koncentracije CaLB v supernatantu

Supernatant, ki smo ga shranili v zamrzovalniku (točka 3.3.1), smo odtalili in ga redčili 2×, 5× in 10× z destilirano vodo. Redčitvam supernatantov smo določili koncentracijo vsebnosti oksidiranih nevezanih encimov po metodi opisani v točki 3.3.3. Dobljenim vrednostim absorbanc smo odšteli vrednost absorbance negativne kontrole. Upoštevali smo tudi redčitev vzorca, ter nato s pomočjo umeritvene krivulje določili koncentracijo nevezanih encimov.

3.3.3.2 Določitev količine vezanega CaLB na nosilcu Sepabeads EC-HA pripravljenega v točki 3.3.2 (vezava preko aktivacije nosilca)

Priprava umeritvene krivulje

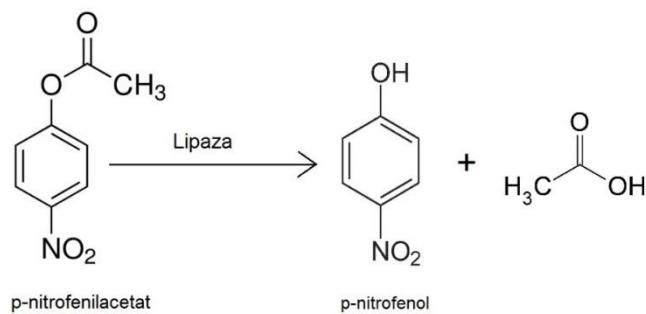
Pri vezavi encima na nosilec smo vezali nativen (ne oksidiran) encim CaLB. Umeritveno krivuljo smo pripravili iz sveže pripravljenega nativnega CaLB. Najprej smo pripravili raztopino encima s konc. 12,4 mg/mL. Nato smo redčili to raztopino, dokler nismo pripravili pet redčitev: 3 mg/mL; 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL, ter za slepi vzorec uporabili dH₂O. Nato smo nadaljevali s postopkom po Lowryju opisanem v točki 3.3.3.

Določitev koncentracije CaLB v supernatantu

Supernatante, ki smo jih shranili v zamrzovalniku (točka 3.3.2), smo odtalili in jih redčili 2×, ter 4× z destilirano vodo. Redčenim supernatantom smo določili koncentracijo vsebnosti nevezanih encimov po metodi opisani v točki 3.3.3. Dobljenim vrednostim absorbanc smo odsteli vrednost absorbance slepega vzorca. Upoštevali smo tudi redčitve vzorcev, ter nato s pomočjo umeritvene krivulje določili koncentracijo nevezanih encimov.

3.3.4 Določitev kinetike na nosilec vezanih CaLB

Kinetiko encimov smo določali s pretvorbo p-nitrofenilacetata v p-nitrofenol. Pretvorbo smo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance nastalega produkta pri valovni dolžini 348 nm. Substrat smo pripravili po protokolu Sigma, in sicer smo v 1 mL metanola raztoplili 6,3 mg p-nitrofenilacetata (Sigma product information ... ,2015). Nato smo 100 µL v metanolu raztopljenega p-nitrofenilacetata dodali k 10 mL dH₂O



Slika 22: Pretvorba 4-nitrofenilacetata v p-nitrofenol z lipazo

Umeritveno krivuljo za količino nastalega produkta smo dobili z določitvijo vrednosti absorbanc predhodno pripravljenim redčitvam produkta. Raztopino produkta smo pripravili z redčenjem 20 mM 4-nitrofenilacetata, ki smo ga pripravili tako, da smo 26,2 mg p-nitrofenola raztoplili v 9,42 mL dH₂O. 100 µL 20 mM 4-nitrofenilacetata smo nato v destilirani vodi razredčili do koncentracije 2 mM ter to redčitev naprej redčili 1:1 z destilirano vodo. Pripravljene redčitve smo prenesli po 250 µL na mikrotitrsko ploščo in jim izmerili absorbanco pri 348 nm valovni dolžini.

3.3.4.1 Določitev kinetike nativnega CaLB

V 1,5 mL centrifugirko smo zatehtali 16,36 mg encima CaLB ter ga raztopili v 1 mL dH₂O. Nato smo 61 µL [1mg] te raztopine encima prenesli k 10 mL 0,344 mM substrata (p-nitrofenilacetata) v 50 mL centrifugirki. Centrifugirko smo nato zaprli in jo homogeno stresali. Na približno 5 minut smo homogeno vzorčili 250 µL reakcijske mešanice, ter vzorec prenesli na mikrotitrsko ploščo. Količino nastalega produkta p-nitrofenol smo določili z meritvijo absorbance pri valovni dolžini 348 nm.

3.3.4.2 Določitev kinetike v točki 3.3.1 pripravljenega CaLB vezanega na nosilec (vezava preko oksidacije encima)

Predhodno pripravljenim na nosilec vezanim encimom, ki smo jih hranili v hladilniku, smo odpipetirali pufer, tako da so nam v steklenički ostali le mokri nosilci z vezanimi encimi. Reakcijo smo pripravili v 50 mL centrifugirki, v katero smo zatehtali 46,3 mg mokrega nosilca z vezanim encimom CaLB. V drugi 50 mL centrifugirki smo natehtali 24,3 mg praznega aktiviranega nosilca, ki je služil za negativno kontrolo. Nato smo dodali 10 mL 0,344 mM substrata (p-nitrofenilacetata). Centrifugirki smo nato zaprli in ju homogeno stresali. Na 5 do 7 minut smo homogeno v 1,5 mL mikrocentrifugirke vzorčili 400 µL reakcijske mešanice, ter vzorec centrifugirali na 1 minuto pri 10.000 obr/min. Na mikrotitrsko ploščo smo nanesli 250 µL supernatanta. Količino nastalega produkta p-nitrofenol smo določili z meritvijo absorbance pri 348 nm.

3.3.4.3 Določitev kinetike v točki 3.3.2 pripravljenega CaLB vezanega na nosilec (vezava preko aktivacije nosilca)

Predhodno pripravljenim na nosilec vezanim encimom, ki smo jih hranili v hladilniku, smo odpipetirali pufer, tako da so nam v centrifugirki ostali le mokri nosilci z vezanimi encimi. Reakcijo smo pripravili v 50 mL centrifugirki, v katero smo natehtali 25,1 mg mokrega nosilca z vezanim encimom CaLB, ki smo ga pripravili v centrifugirki z oznako B (točka 3.3.2). Nato smo dodali 10 mL 0,344 mM substrata (p-nitrofenilacetata). Vzorčenje in meritve absorbanc smo izvedli enako kot pri točki 3.3.4.2

3.3.4.4 Določitev deleža napake pri vzorčenju

Določitev natančnosti pri homogenem vzorčenju je pomembna za interpretacijo izračuna aktivnosti. 1,5 mL mikrocentrifugirke z vzorci smo ponovno centrifugirali ter odpipetirali ves supernatant. Peletu, ki je predstavljal nosilec z vezanimi encimi, smo dodali 400 µL svežega substrata. Mikrocentrifugirke smo nato zaprli in jih stresali 20 minut. Nato smo jih ponovno centrifugirali 1 minuto pri 10.000 obr/min. Po centrifugiranju smo takoj prenesli po 250 µL supernatanta na mikrotitrsko ploščo in pomerili vrednosti absorbanc pri 348 nm.

3.3.5 Določitev količine encimov v reakciji kinetike.

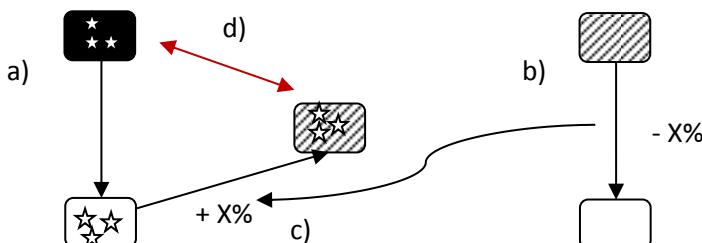
Pri pripravi vezave encima CaLB smo k oksidiranemu encimu CaLB dodali znano maso *navlaženega* nosilca, medtem ko smo v reakcijo kinetike lahko natehtali samo *moker* nosilec z vezanim encimom. V točki 3.3.3.1 smo določili količino vezanega encima na navlažen nosilec. Za izračun aktivnosti vezanih encimov pa smo potrebovali točno količino encima, ki smo ga skupaj z mokrim nosilcem uporabili v reakciji kinetike (točka 3.3.4.2). To vrednost smo izračunali s pomočjo modelov, ki smo jih razvili posebej za ta poskus.

Metoda je zajemala sušenje vzorcev v liofilizatorju.

- a) Poskus smo zastavili tako, da smo v mikrocentrifugirko natehtali znano količino mokrega nosilca z vezanim encimom. V mikrocentrifugirko smo dali tudi vato, s katero smo preprečili izhajanje snovi med sušenjem v liofilizatorju. Z določitvijo mas smo dobili delež izgube vlage, ter posledično maso suhega nosilca z vezanim encimom.
- b) Vendar, ker pri pripravi na nosilec vezanega encima v točki 3.3.1 nismo uporabili suhega nosilca, ampak navlaženega (iz originalne embalaže), smo naredili še en poskus, kjer smo določili izgubo vlage pri sušenju vlažnega nosilca.
- c) Dobljen odstotek smo potrebovali za določitev mase navlaženega nosilca z vezanim encimom. Upoštevali smo ga tako, da smo masi suhega nosilca z encimom prišeli delež vlage in dobili maso navlaženega nosilca z encimom.

Pri meritvah in izračunih smo upoštevali tudi zmanjšanje mase zaradi izgube vlage iz kose vate. Izguba vlage encima, katerega masa je bila v primerjavi s suhim nosilcem zelo nizka, je zanemarljivo majhna, zato smo privzeli, da je masa encima med procesom sušenja ostala nespremenjena.

- d) Na koncu smo dobili maso navlaženega nosilca z vezanim encimom in delež njegove mase izrazili glede na maso mokrega nosilca z vezanim encimom.



Slika 23: Shema določitve deleža mase navlaženega nosilca (pripravljenega v 3.3.1) v primerjavi z mokrim nosilcem (uporabljenim pri kinetiki v točki 3.3.4.2).

S črtami označen pravokotnik predstavlja vlažen nosilec, prazen pravokotnik predstavlja suh nosilec, črn pravokotnik predstavlja moker nosilec. Zvezdica predstavlja CaLB.

S pomočjo tega modela smo dobili povezavo med količino encima vezanega na navlažen nosilec (podatek dobimo v točki 3.3.3.1) ter količino encima, ki smo ga skupaj z mokrim nosilcem uporabili v reakciji kinetike (podatek dobimo v točki 3.3.4.2).

Za določitev deleža po shemi na sliki 21 smo pripravili tri 1,5 mL mikrocentrifugirke, ki smo jim v pokrov naredili luknjico. Mikrocentrifugirke smo označili z oznakami A, B in C. V mikrocentrifugirko A smo dali kos vate. V mikrocentrifugirko B smo natehtali 63,03 mg iz embalaže vzetega navlaženega nosilca, ter kos vate. V mikrocentrifugirko C pa smo natehtali 96,82 mg mokrega nosilca z vezanim encimom, ter kos vate. Med dodajanjem posameznih komponent v mikrocentrifugirko smo izmerili mase posameznim komponentam (preglednica 15).

Preglednica 15: Potrebne meritve mas posameznih komponent pred sušenjem in po sušenju v liofilizatorju.

	Mase izmerjene pred sušenjem		Mase izmerjene po sušenju		
A	Prazna mikro-centrifugirka	Mikro-centrifugirka s kosom vate, ki vsebuje vlago iz zraka	Prazna mikro-centrifugirka	Mikro-centrifugirka s suhim kosom vate,	
B	Prazna mikro-centrifugirka	Kos vate, ki vsebuje vlago iz zraka	Mikro-centrifugirka s kosom vate in praznim navlaženim nosilcem	Suh kos vate	Mikro-centrifugirka s suhim kosom vate in suhim praznim nosilcem
C	Prazna mikro-centrifugirka	Kos vate, ki vsebuje vlago iz zraka	Mikro-centrifugirka s kosom vate in mokrim nosilcem, ki ima vezane nosilce	Suh kos vate	Mikro-centrifugirka s suhim kosom vate in suhim nosilcem ki ima vezane encime

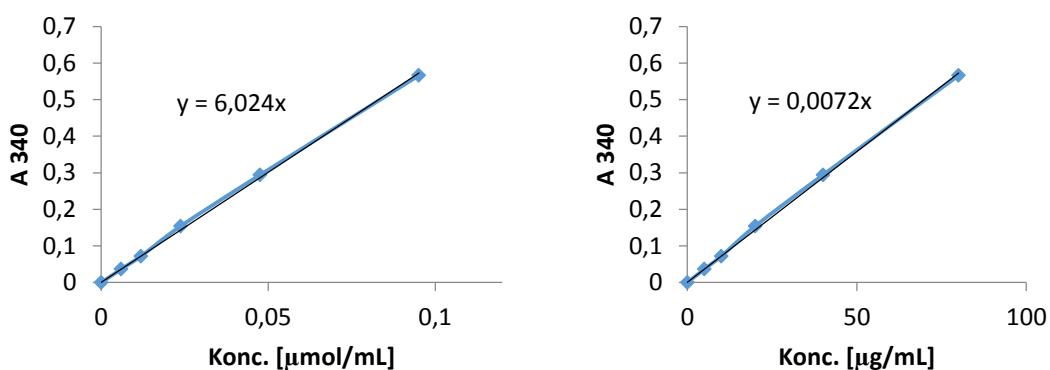
4 REZULTATI

REZULTATI IMOBILIZACIJE TER STABILIZACIJE ENCIMA KRED

4.1. PRIPRAVA IN DOLOČITEV AKTIVNOSTI AGREGATOV KRED

4.1.1 Umeritvena krivulja za določitev NADPH

Vrednosti na osi Y smo dobili z odštetjem slepe vrednosti, ki ni vsebovala NADP.

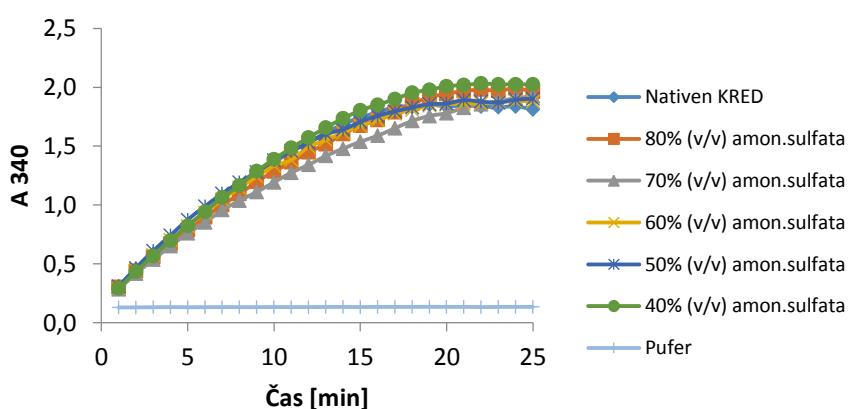


Slika 24: Umeritvena krivulja NADPH (levo: v $\mu\text{mol}/\text{mL}$, desno: v $\mu\text{g}/\text{mL}$)

4.1.2 Optimizacija obarjanja encima KRED z nasičeno raztopino amonsulfata

4.1.2.1 Kinetika z amonsulfatom oborjenega KRED

Z meritvijo kinetike pripravljenih oblik KRED smo dobili niz naraščajočih vrednosti absorbanc, ki predstavljajo količino nastalega NADPH. Reakcijo smo po 25 minutah prekinili, saj smo za izračun aktivnosti potrebovali le naklon linearne dela krivulje. Iz naklona smo dobili hitrost reakcije pretvorbe NADP v NADPH. Ker je pomemben le naklon, ni potrebno odšteti vrednosti kontrolnega vzorca.



Slika 25: Kinetika z amonsulfatom oborjenim KRED

Vrednosti naklonov krivulj so:

Nativen KRED = 0,1163

80 % (v/v) amon. sulfat = 0,1086

70 % (v/v) amon. sulfat = 0,1002

60 % (v/v) amon. sulfat = 0,1139

50 % (v/v) amon. sulfat = 0,1177

40 % (v/v) amon. sulfat = 0,1215

4.1.2.2 Količina encima KRED v reakciji za kinetiko

Med pripravo redčitev za reakcijo kinetike so se lahko pojavile napake pri pipetiranju, zato smo z NaDS-PAGE elektroforezo določili dejansko količino encima v reakciji. Na gel smo nanesli tudi tri vzorce z znanimi koncentracijami, ki so služili kot standard. Dobljene vrednosti koncentracije smo primerjali s teoretičnimi ter izrazili delež odstopanja. To odstopanje smo tudi upoštevali pri izračunu aktivnosti encima.

Preglednica 16: Delež ujemanja vrednosti koncentracij raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo reakcij kinetike z amonsulfatom oborjenimi KRED

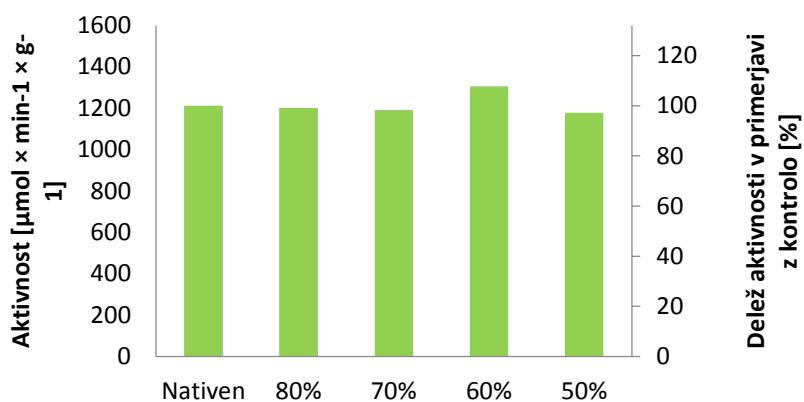
Vzorec	Teoretična količina v analiziranem vzorcu	z elektroforezo določena količina	Odstopanje
Nativen KRED	55,2 µg/mL	55,2 µg/mL	1
80 % (v/v) amon. sulfat	55,2 µg/mL	52,03 µg/mL	0,9426
70 % (v/v) amon. sulfat	55,2 µg/mL	48,41 µg/mL	0,8770
60 % (v/v) amon. sulfat	55,2 µg/mL	50,24 µg/mL	0,9101
50 % (v/v) amon. sulfat	55,2 µg/mL	57,46 µg/mL	1,0410
40 % (v/v) amon. sulfat	55,2 µg/mL	47,86 µg/mL	0,8670

4.1.2.3 Aktivnost z nasičeno raztopino oborjenimi encimi KRED

Za aktivnost neoborjenega KRED in z nasičeno raztopino amonsulfata oborjenega KRED smo potrebovali naslednje podatke. Naklon krivulje kinetike, ki je predstavljal, za koliko se je vrednost A 340 povečala v eni minutri. Naslednji podatek je bil točna masa encima v reakciji kinetike. Sledila je količina nastalega NADPH, ki jo podamo v množini. Aktivnost smo dobili s kvocientom množine in maso encima.

Preglednica 17: Izračun aktivnosti z amonsulfatom pripravljenimi agregati

	Nativen KRED	80 %	70 %	60 %	50 %
Naklon	0,1163	0,1086	0,1002	0,1139	0,1177
Količina KRED [µg]	5	4,71	4,39	4,55	5,21
Količina NADPH [µg]	5,10	4,76	4,39	5,00	5,16
Množina NADPH [µmol]	$6,06 \times 10^{-3}$	$5,65 \times 10^{-3}$	$5,22 \times 10^{-3}$	$5,93 \times 10^{-3}$	$6,13 \times 10^{-3}$
AKTIVNOST [µmol × min ⁻¹ × g ⁻¹]	1211	1200	1190	1303	1177
Delež [%]	100	99,1	98,2	107,6	97,2

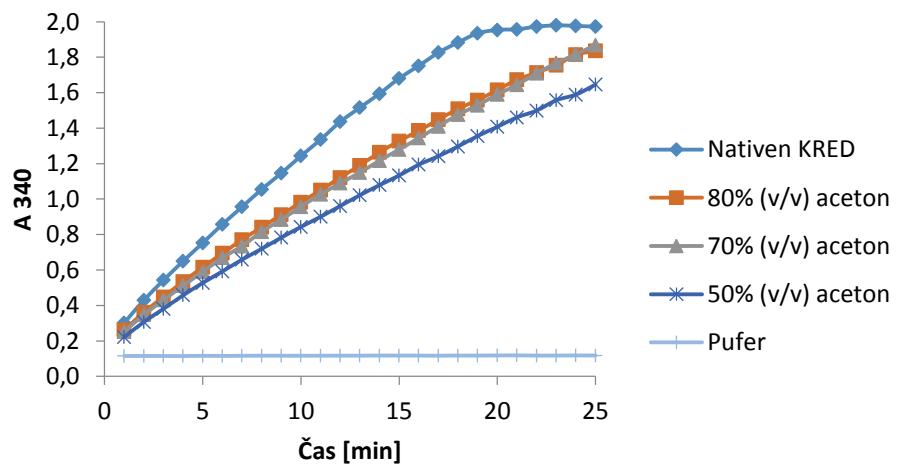


Slika 26: Aktivnost neoborjenega KRED in z nasičeno raztopino amonsulfata oborjenega KRED

4.1.3 Optimizacijaobarjanja encima KRED z acetonom

4.1.3.1 Kinetika z acetonom oborjenega KRED

Z določitvijo vrednosti absorbanc pri valovni dolžini 340 nm smo dobili niz naraščajočih vrednosti, ki prikazujejo naraščaje količine nastalega NADPH.



Slika 27: Kinetika z acetonom oborjenim KRED

Nakloni krivulj:

Native KRED: $k = 0,1015$

80 % (v/v) acetona: $k = 0,077$

70 % (v/v) acetona: $k = 0,0755$

50 % (v/v) acetona: $k = 0,0663$

4.1.3.2 Količina encima KRED v reakciji za kinetiko

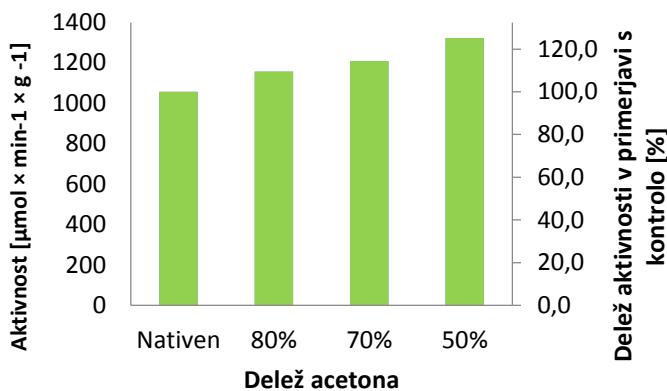
Preglednica 18: Delež ujemanja vrednosti koncentracij raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo reakcij kinetike z acetonom oborjenimi KRED

Vzorec	Teoretična količina v analiziranem vzorecu	z elektroforezo določena količina	Odstopanje
Nativen KRED	55,2 µg/mL	55,2 µg/mL	1,00
80 % (v/v) acetona	55,2 µg/mL	38,26 µg/mL	0,69
70 % (v/v) acetona	55,2 µg/mL	35,90 µg/mL	0,65
50 % (v/v) acetona	55,2 µg/mL	28,82 µg/mL	0,52

4.1.3.3 Aktivnost z nasičeno raztopino oborjenimi encimi KRED

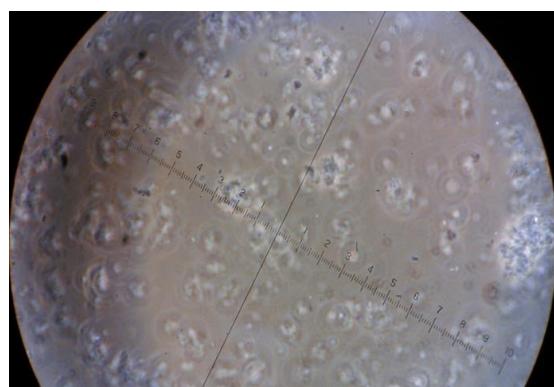
Preglednica 19: Izračun aktivnosti z acetonom pripravljenimi agregati

	Nativen KRED	80 %	70 %	50 %
Naklon	0,1163	0,1086	0,1002	0,1177
Količina KRED [µg]	5	3,47	3,25	2,61
Količina [µg]	4,45	3,38	3,31	2,91
NADPH				
Množina [µmol]	$5,28 \times 10^{-3}$	$4,01 \times 10^{-3}$	$3,931 \times 10^{-3}$	$3,45 \times 10^{-3}$
NADPH				
AKTIVNOST [µmol × min ⁻¹ × g ⁻¹]	1057	1157	1209	1322
Delež [%]	100,0	109,5	114,4	125,1



Slika 28: Aktivnost neoborjenega KRED in z nasičeno raztopino amonsulfata oborjenega KRED

Rezultat: Pri pripravi agregatov smo opazili, da so agregati, pripravljeni z obarjanjem v acetonu, bolj povezani skupaj in tudi po večkratnem spiranju ostanejo v obliki agregatov, medtem ko se agregati, pripravljeni z nasičeno raztopino amonsulfata, raztopijo, če jih spiramo v pufru ali destilirani vodi. Odločili smo se, da bomo pri nadalnjem delu obarjali v raztopini, ki bo imela 50 % (v/v), saj smo ugotovili, da ti pogoji obarjanja pripravijo strukturo, ki ima najvišjo aktivnost.

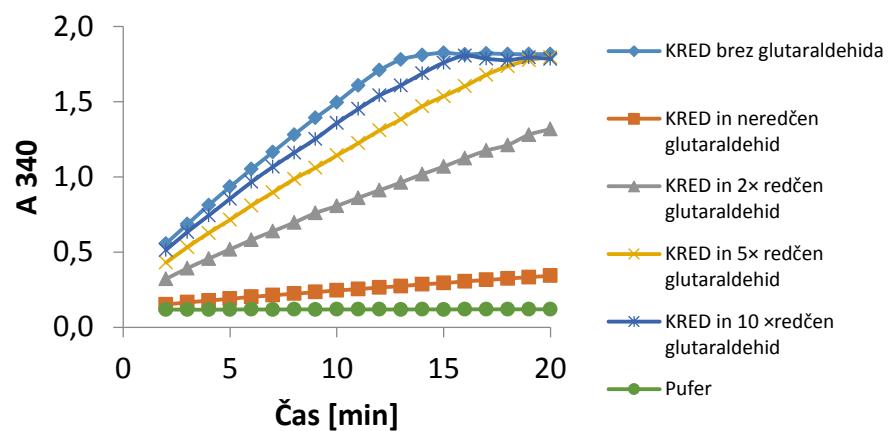


Slika 29: Agregati KRED (oborjeni z 50 % v/v acetonom)

4.2 VPLIV ZAMREŽEVALCA

Priprava zamreženih agregatov zahteva uporabo navzkrižnega zamreževalca, njegova naloga je, da poveže aggregate med seboj v trdno strukturo, v kateri se ohranijo lastnosti encimskih agregatov. Vendar encimska specifičnost in njihove razlike v strukturi lahko predstavljajo izviv pripraviti CLEA, saj lahko zamreževalec poveže aggregate in pri tem zaradi njegove vezave zmanjša aktivnost ali celo inaktivira delovanje encima. Zato smo se odločili, da bomo testirali vpliv na encimsko aktivnost z uporabo dveh različnih zamreževalcev. Najprej smo preverili vpliv glutaraldehyda.

4.2.1 Vpliv glutaraldehyda na nativni encim KRED

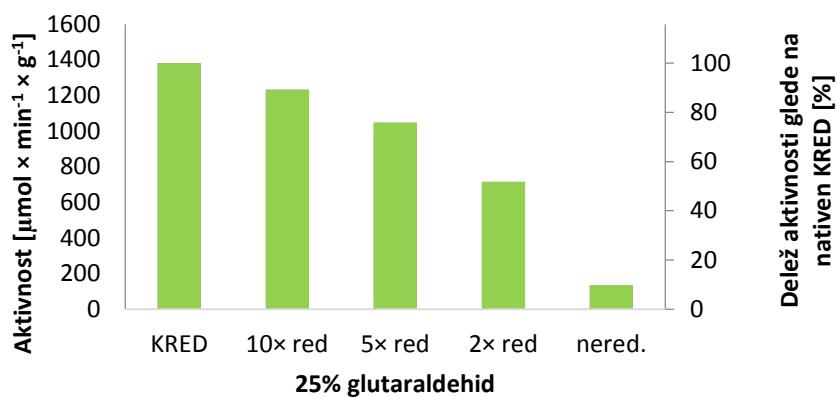


Slika 30: Kinetika oksidacije IPA, ki jo katalizirajo nativni KRED zamreženi z raztopino glutaraldehyda

V tej točki smo testirali vpliv zamreževalca na nativen encim KRED. Ker smo redčili raztopino KRED brez aggregatov, smo predpostavili, da so bile redčitve reprezentativne.

Preglednica 20: Aktivnosti encima KRED ob dodatku razredčenega zamreževalca glutaraldehida

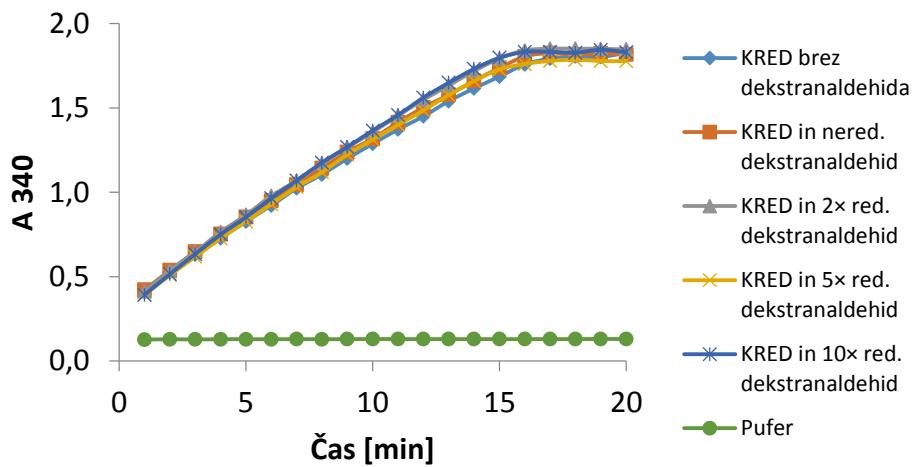
	Nativni KRED	10× redčen	5× redčen	2× redčen	Ne- redčen
Aktivnost [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$]	1382,23	1232,58	1047,57	715,27	135,51
Delež [%]	100	89,2	75,8	51,7	9,8



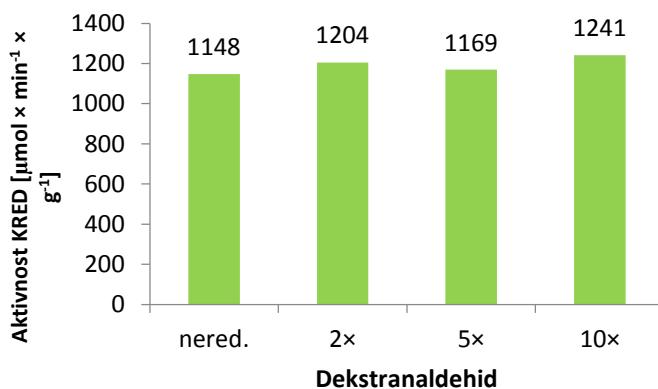
Slika 31: Vpliv glutaraldehida na aktivnost KRED

Zaključek: Na podlagi rezultatov smo zaključili, da glutaraldehid negativno vpliva na aktivnost encima KRED, zato ga pri pripravi KRED CLEA ne bomo uporabili.

4.2.2 Vpliv dekstranaldehida na aktivnost KRED



Slika 32: Kinetika oksidacije IPA, ki jo katalizirajo nativni KRED zamreženi z raztopino glutaraldehida

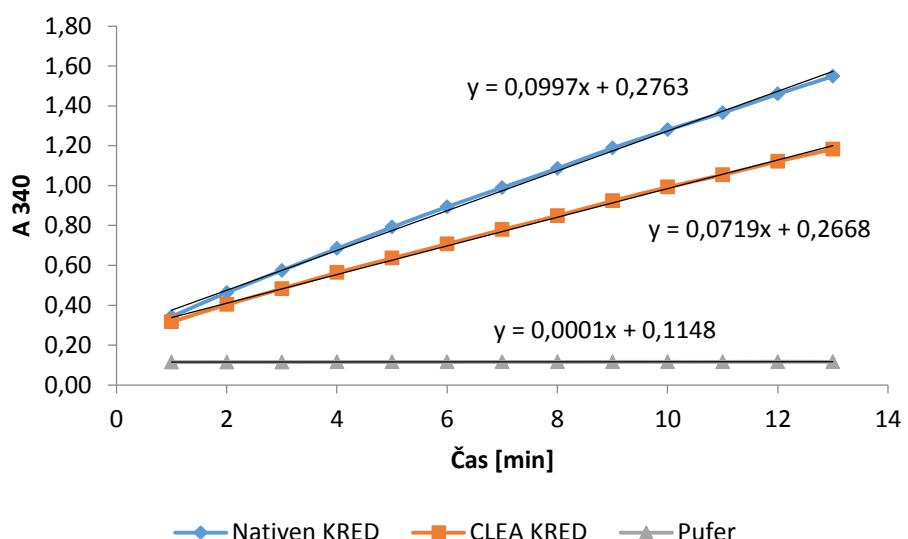


Slika 33: Vpliv dekstranaldehida na aktivnost KRED

Zaključek: Dekstranaldehid ne vpliva na aktivnost katoreduktaze KRED, zato je primeren zamreževalec za pripravo KRED CLEA.

4.3 PRIPRAVA IN DOLOČITEV AKTIVNOSTI CLEA KRED

4.3.1 Določitev kinetike in naklona reakcije.



Slika 34: Kinetika nativnega KRED in CLEA KRED

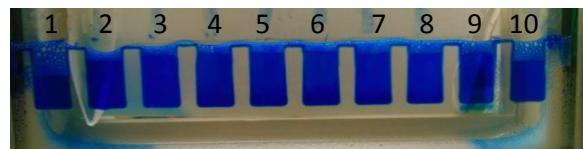
4.3.2. Določitev količine encima v reakciji kinetike.

Količino encima smo določali na enak način kot pri agregatih encimov, torej z metodo NaDS-PAGE elektroforeze.

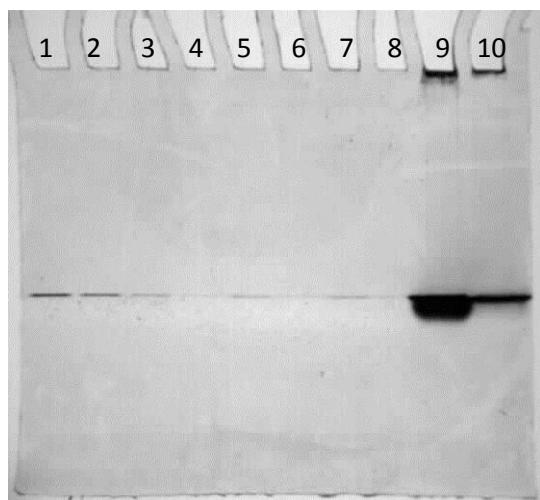
Med barvanjem gela smo v nekaterih žepkih opazili koščke, ki so se obarvali. Na podlagi tega smo se odločili, da preverimo, koliko odstotkov CLEA se med kuhanjem in denaturacijo ne razgradi.

4.3.2.1 Določitev deleža CLEA KRED, ki se med pripravo za nanos na gel ne razgradi

Neupoštevanja deleža encimov, ki ne vstopijo v gel, lahko privede do napačne določitve koncentracije proteinov v raztopini kinetike. To posledično privede do napačnih izračunanih vrednosti aktivnosti. Pripravili smo raztopine z različnimi koncentracijami nerazgrajenih CLEA KRED in s proteinazo razgrajenih CLEA KRED. S tem smo pokrili vsa območja detekcije lis na gelu. Od zelo intenzivnih lis do šibkih, lise v linearinem območju smo uporabili za določitev deleža CLEA, ki ne vstopijo v gel.



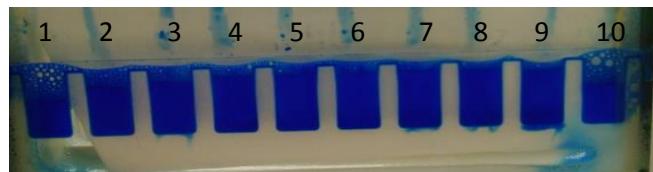
Slika 35: Obarvani žepki 1. gela



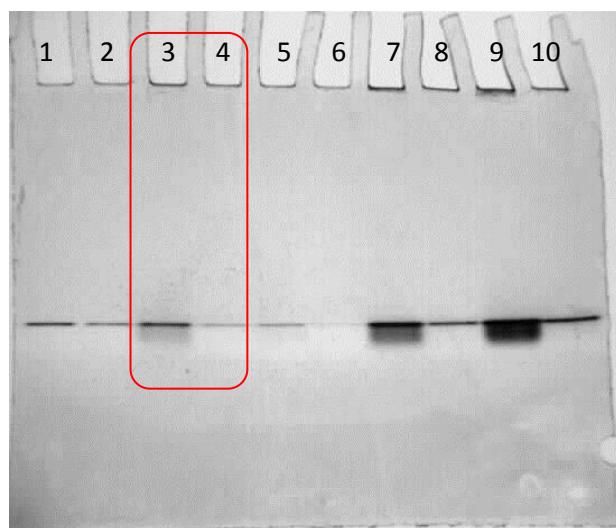
Slika 36: Slika 1. gela s programom SynGene

Na prvem gelu predstavljata žepka 1 in 2 standard s koncentracijama 56 in 32 µg/mL. Slike prvega gela lahko zaključimo, da smo vzorce CLEA preveč redčili in zato je bilo v njih premalo proteinov, ki bi jih lahko detektirali. V luknjo 9 in 10 smo namemoma dali neredčen vzorec, s katerim smo hoteli potrditi hipotezo o nerazgradnji CLEA med pripravo za nanos na gel. V luknji 9 je nerazgrajen CLEA vzorec, ki ga nismo tretirali s proteinazo.

Preveliki delci CLEA KRED niso mogli, kljub močnemu toku, vstopiti v gel, ker so pore gela manjše kot nekateri delci CLEA. Zaradi privlaka negativno nabitih delcev k pozitivni elektrodi na dnu gela so CLEA poškodovali gel in se zažrli vanj (Slika 33).



Slika 37: Obarvani žepki 2. gela



Slika 38: Slika 2. gela s programom SynGene

Na drugi gel smo nanesli vzorce z višjimi koncentracijami proteinov (CLEA KRED). Slike gela je lepo razvidna razlika med s proteinazo razgrajenimi vzorci in vzorci, ki jih nismo tretirali s proteinazo. Pri vzorcih, ki jih nismo dodatno razgradili z encimom proteinazo, lahko vidimo, da je določen delež encimov ostal v žepku. Za določitev smo izbrali vzorec v linearinem delu detekcije, saj pre malo ali preveč vzorca v žepku ne odraža realne zveze med količino proteina, ki je vstopila v gel, in količino, ki je ostala v žepku. Na podlagi podrobne analize slike smo za izračun deleža uporabili žepka 3 in 4. V žepku 3 smo nanesli vzorec CLEA KRED, ki ga nismo razgradili s proteinazo, medtem ko je v žepku 4 CLEA KRED razgrajena s proteinazo.

Preglednica 21: S programom SynGene določene koncentracije proteinov

Luknja na 2. gelu		Količina [µg/mL]	Količina z odštetom slepo [µg/mL]
1	1	15,608	-0,252
	2	56	
2	1	16,12	0,26
	2	32	
3	1	45,88	30,02
	2	122,2	
4	1	19,608	3,748
	2	45,64	
5	1	23,536	7,676
	2	27,328	
6	1	18,448	2,588
	2	8,12	
7	1	55,432	39,572
	2	407,712	
8	1	36,736	20,876
	2	91,44	
9	1	97,288	81,428
	2	556,312	
10	1	29,264	13,404
	2	140,008	

Pri izračunu deleža smo tudi upoštevali ter odšteli intenziteto prehoda iz žepka v gel. To vrednost smo dobili iz vrednosti intenzitete prvega in drugega žepka, ki sta bila prazna, saj smo v njih nanesli raztopino nativnega KRED, za katerega smo vedeli, da ves vstopi v gel. Povprečna vrednost praznih žepkov je bila 19,83. To vrednost smo nato odšteli od vrednosti, ki smo jih dobili pri drugih žepkih (preglednica 21).

Delež ostanka CLEA KRED v žepku

Količino encima v žepku smo delili s seštevkom vrednosti v žepku in količino, ki je vstopila v gel. $30,02 / (30,02+122,2) \times 100 = 19,72\%$

Po enakem postopku smo izračunali tudi delež ostanka CLEA KRED v žepku pri s proteinazo K razgrajenim CLEA KRED. $3,748 / (3,748+45,64) \times 100 = 7,58\%$

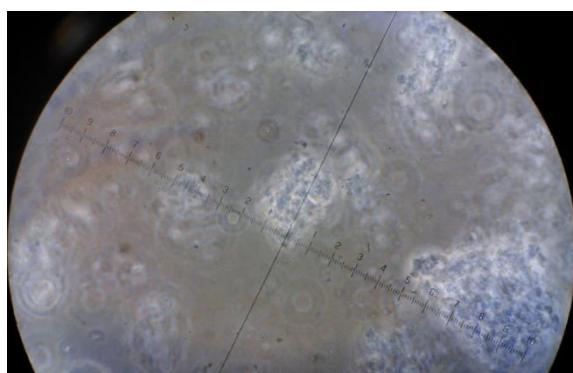
Delež proteinov v žepku, v katerega smo nanesli vzorec CLEA KRED predhodno tretiranega s proteinazo K, nam podaja dejstvo, da so CLEA KRED zelo trdne strukture in jih tudi s proteinazo K nismo razgradili. Pri rezultatih elektroforeze, s katero smo določali količino CLEA v reakciji kinetike, smo upoštevali dejstvo, da približno 20 % encimov ne vstopi v gel.

4.3.3 Priprava KRED CLEA – z dekstranaldehidom

Redčitvam CLEA KRED, ki smo jih uporabili v reakciji kinetike (točka 4.3.1), smo s pomočjo NaDS-PAGE elektroforeze določili koncentracijo in s tem posledično tudi količino proteinov, ki smo jih imeli v reakciji kinetike. Pri določitvi količine smo upoštevali tudi delež CLEA (točka 4.3.2), ki se ni razgradil in ni vstopil v gel.

Preglednica 22: Aktivnost CLEA KRED v primerjavi z nativnim KRED

	Nativen KRED	KRED CLEA
Aktivnost [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$]	1221,1	1483,8
Delež [%]	100	121,51



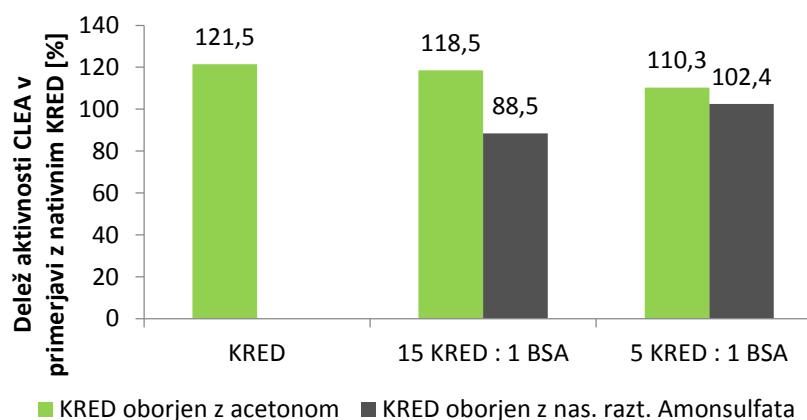
Slika 39: CLEA KRED pod mikroskopom (1000× povečava)

Zaključek: Specifična aktivnost KRED-CLEA je sicer višja od specifične aktivnosti nativnega encima, vendar so izgube encima v postopku priprave CLEA višje od 30 %. Ocenujemo, da bi izgube lahko znižali na približno 15 %. Kljub temu ostaja KRED, oborjen z acetonom, s stališča morebitne aplikacije ter stroškov veliko boljša opcija.

4.3.4 Priprava KRED CLEA s pomožnim proteinom BSA

Preglednica 23: Aktivnosti CLEA KRED z različnim deležem pomožnega proteina BSA

		Z acetonom pripravljeni CLEA		Z nasičeno raztopino amonsulfata pripravljeni CLEA	
Sestava CLEA		Aktivnost [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$]	Delež [%]	Aktivnost [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$]	Delež [%]
Samo KRED	Nativen KRED	1221,12	100		
	CLEA	1483,80	121,51		
15 KRED : 1BSA	Nativen KRED	1571,19	100	1515,40	100
	CLEA	1861,73	118,49	1341,37	88,52
5 KRED : 1BSA	Nativen KRED	1273,40	100	1309,32	100
	CLEA	1404,59	110,30	1341,37	102,45

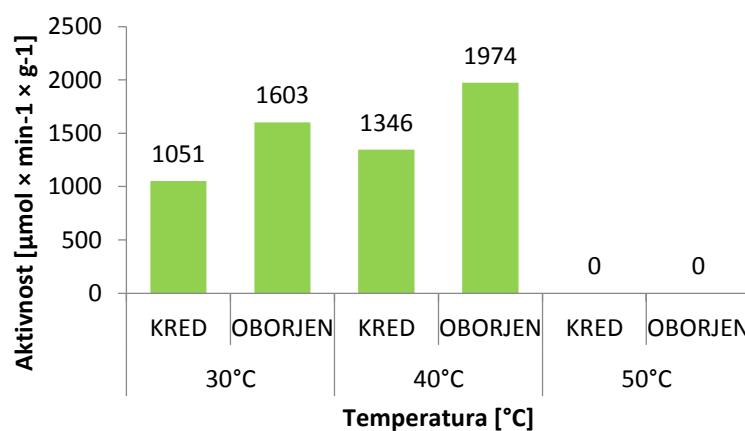


Slika 40: Aktivnosti CLEA KRED z različnim deležem pomožnega proteina BSA

Zaključek: Dodatek pomožnega proteina v KRED CLEA ne zviša aktivnosti KRED, zato ga ni smiselno uporabiti pri pripravi KRED CLEA. S posrednim poskusom smo ugotovili, da CLEA med denaturacijo ne razpadajo popolnoma, zato so možna odstopanja pri izračunu koncentracije proteina in posledično tudi njegove aktivnosti.

4.4 DOLOČITEV AKTIVOSTI NATIVNEGA IN OBORJENEGA ENCIMA KRED PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH, VREDNOSTIH PH TER PONOVNI UPORABI

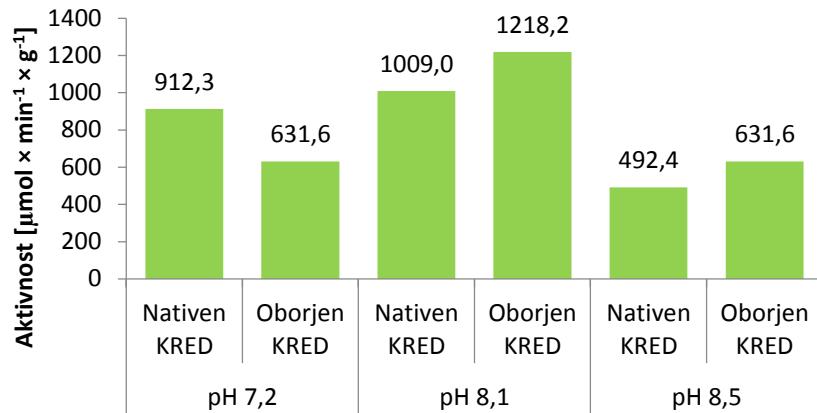
4.4.1 Vpliv temperature na aktivnost encima KRED



Slika 41: Vpliv različnih temperatur na aktivnost nativnega KRED in oborjenega KRED

Zaključek: Pri višji temperaturi se aktivnost obeh oblik encima poviša. Pri temperaturi 30 °C je aktivnost primerljiva z aktivnostjo pri sobni temperaturi. Medtem ko se pri temperaturi 40 °C aktivnost obeh oblik poviša za 28 %. Pri nadaljnjem povišanju temperature pride do inaktivacije, tako nativnega encima kot tudi encimskih agregatov.

4.4.2 Vpliv pH na aktivnost encima KRED

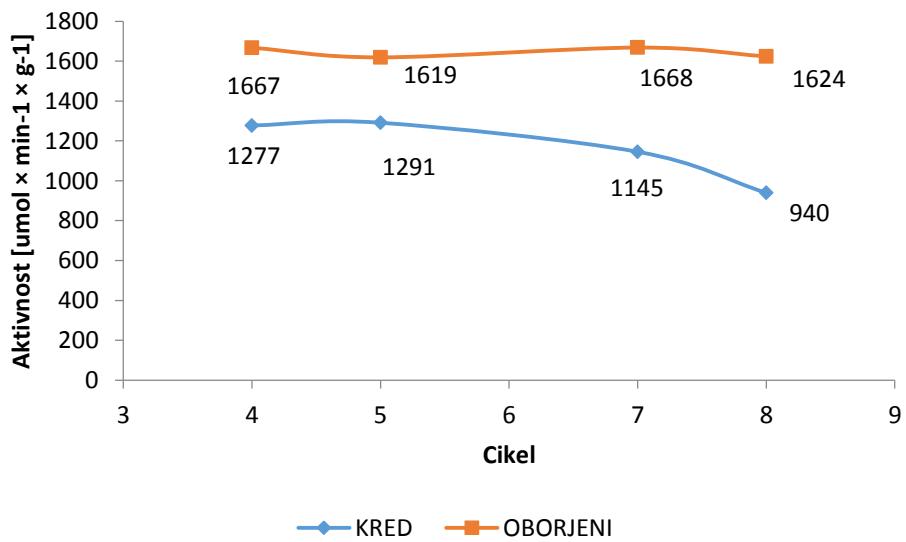


Slika 42: Vpliv pH vrednosti reakcijske mešanice na aktivnost nativnega in oborjenega KRED

Zaključek: Encim KRED, oborjen z acetonom, ima pri pH > 8,5 višjo specifično aktivnost od nativnega .

4.4.3 Stabilnost KRED po več ciklih delovanja

Testirali smo stabilnost ketoreduktaze po več ciklih delovanja. Uporabili smo sveže pripravljeno KRED in oborjene KRED.



Slika 43: Prikaz aktivnosti nativnega KRED in oborjenega KRED po osmih ciklih delovanja

Zaključek: Oborjeni encim KRED je v primerjavi z nativnim bolj stabilen, saj je po več ciklih delovanja ohranil svojo aktivnost, medtem ko je pri nativnem encimu KRED aktivnost po osmih ciklih padla na približno 73 % začetne vrednosti.

4.5 TESTIRANJE DELOVANJA OBORJENEGA ENCIMA KRED V SIMULIRANEM INDUSTRJSKEM OKOLJU OZIROMA REAKCIJI

4.5.1 Test v 30 mL serumskih stekleničkah (V = 15 mL)

Pri simulaciji je šlo za posnemanje realnih, industrijskih pogojev, na katere naletimo v različnih reakcijskih mešanicah. Le-te so relativno goste in viskozne ter izrazito drugačne od laboratorijskih, testnih mešanic za študij osnovnih lastnosti encimov.

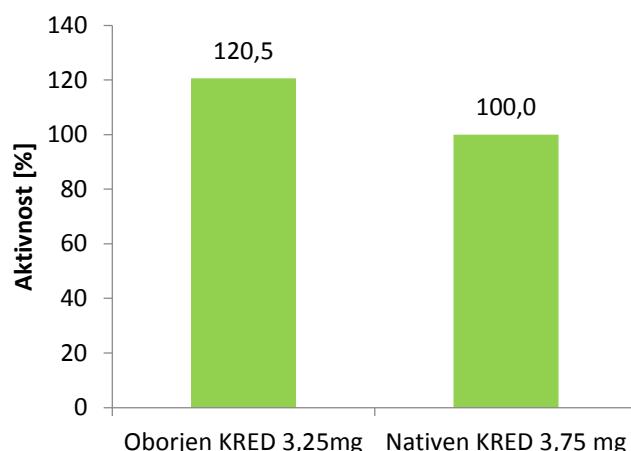
Substrat ter produkti pripravljene reakcije v kontekstu študija učinkovitosti KRED agregatov proti nativnemu encimu KRED niso relevantni. Relevantni so samo v smislu nižanja učinkovitosti izmenjave snovi v reakcijski mešanici ter predvsem zaradi lažjega spremljanja učinkovitosti redukcije NADP v NADPH oziroma »dostave« le-tega drugi oksidoreduktazi. Nastanek produkta, ki je bil pogojen z učinkovitostjo regeneracije ter dostave NADPH, smo spremljali s pomočjo TLC ter analiz HPLC in iz hitrosti pretvorbe določili učinkovitost obeh oblik KRED: agregatov in nativnega encima.

4.5.1.1 Test v 30 mL serumskih stekleničkah s 3,25 mg oborjenega KRED

Med procesom smo s TLC testom kvalitativno spremljali porabo intermediata, ter nastanek produkta. Na podlagi rezultatov, ki smo jih pridobili z metodo TLC, smo lahko zaključili, kdaj je reakcija prišla do konca in smo lahko zaključili proces. Vzorce smo nato kvalitativno analizirali z metodo HPLC.

Preglednica 24: Delež produkta v prvih šestih urah (3,25 mg KRED)

Vzorec Čas [h]	OBORJEN KRED (3,25 mg)			NATIVEN KRED (3,75 mg)		
	1	2	povprečje	3	4	povprečje
0	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
2	20,9 %	21,3 %	21,1 %	20,9 %	18,48 %	19,7 %
4	42,4 %	44 %	43,2 %	43,1 %	38,2 %	40,65 %
6	64,2 %	67,3 %	65,75 %	65,9 %	60 %	63 %



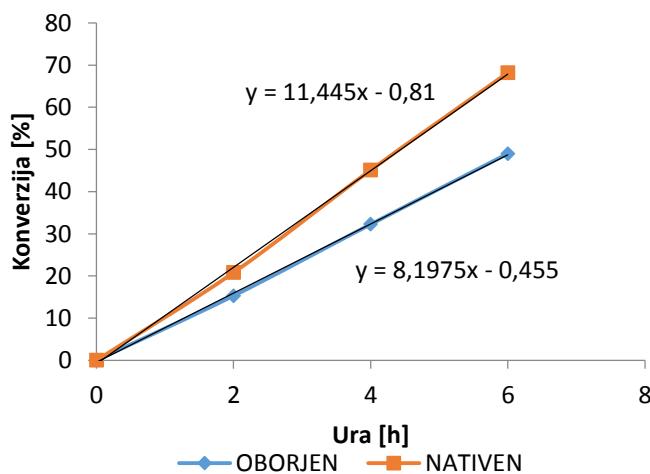
Slika 44: Primerjava aktivnosti oborjenega KRED in nativnega KRED (3,25 mg KRED)

4.5.1.2 Test v 30 mL serumskih stekleničkah z 2 mg oborjenega KRED

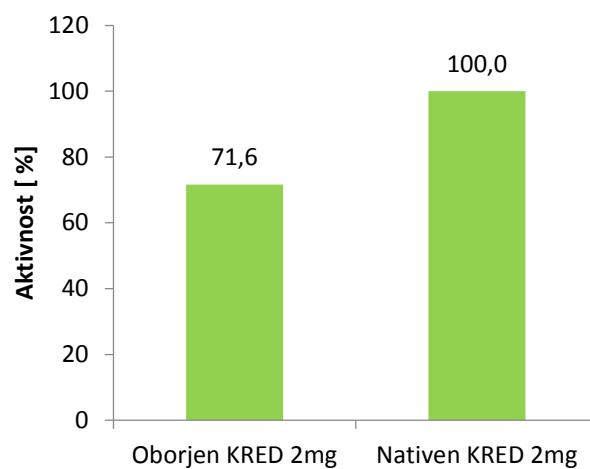
Med procesom smo s TLC testom kvalitativno spremljali porabo intermediata ter nastanek produkta. Na podlagi rezultatov, ki smo jih pridobili z metodo TLC, smo lahko zaključili, kdaj je reakcija prišla do konca in smo lahko zaključili proces. Vzorce smo nato kvalitativno analizirali z metodo HPLC.

Preglednica 25: Delež produkta v prvih šestih urah (drugi poskus – 2 mg)

Vzorec Čas [h]	OBORJEN KRED (2 mg)			NATIVEN KRED (2 mg)		
	1	2	povprečje	3	4	povprečje
0	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
2	15,3 %	15,3 %	15,3 %	21,7 %	19,9 %	20,8 %
4	32,6 %	31,9 %	32,25 %	46,8 %	43,45 %	45,1 %
6	49,2 %	48,8 %	49 %	69,8 %	66,6 %	68,2 %



Slika 45: Kinetika nastalega produkta v prvih šestih urah (2 mg KRED)



Slika 46: Primerjava aktivnosti oborjenega KRED in nativnega KRED (2 mg KRED)

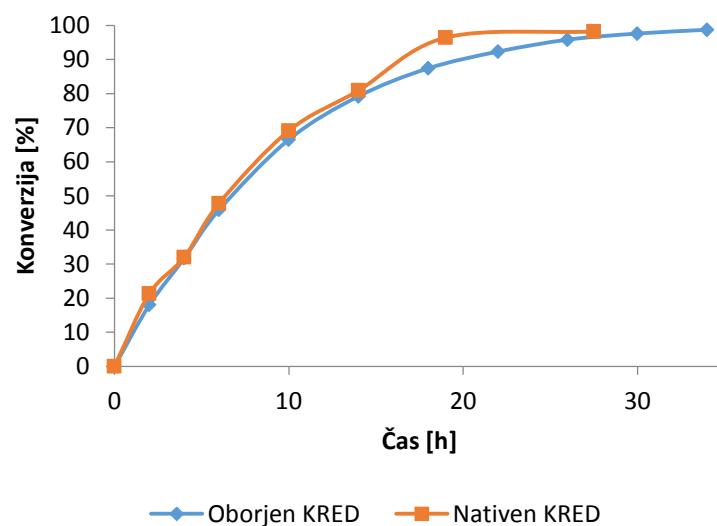
4.5.2 Test v reaktorju ($V = 2L$)

Preglednica 26: Konverzija substrata v simuliranem industrijskem okolju, z agregati KRED ($V = 2L$)

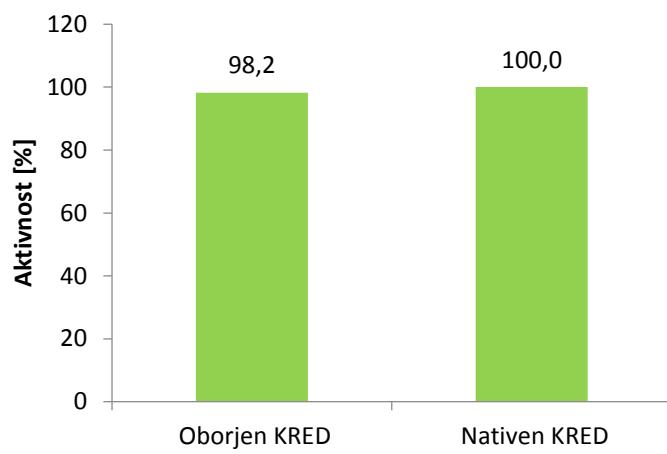
Čas [h]	Konverzija [%]
0	0
2	18
4	31,7
6	45,9
10	66,5
14	79,2
18	87,4
22	92,3
26	95,8

Preglednica 27: Konverzija substrata v simuliranem industrijskem okolju, z nativnim KRED ($V = 2L$)

Čas [h]	Konverzija [%]
0	0
2	21,3
4	32
6	47,8
10	69,1
14	80,9
19	96,4
27,5	98,2



Slika 47: Hitrost nastajanja proizvoda – primerjava učinkovitosti oborjenega in nativnega encima v simuliranem industrijskem okolju oziroma reakciji ($V = 2L$)



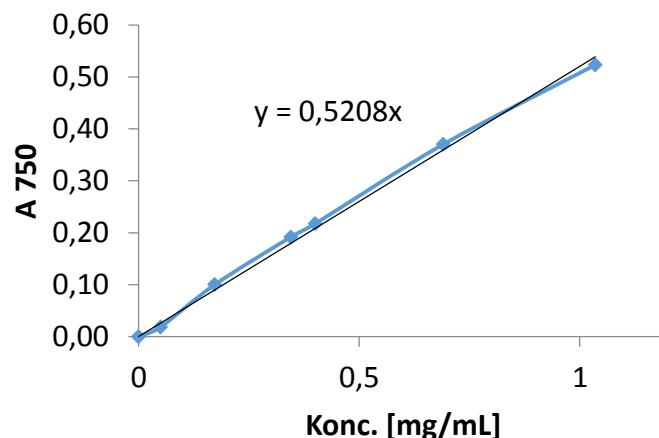
Slika 48: Primerjava aktivnosti oborjenega KRED in nativnega KRED ($V = 2L$)

REZULTATI IMOBILIZACIJE TER STABILIZACIJE ENCIMA CaLB

4.6 USPEŠNOST VEZANJA ENCIMA CaLB NA NOSILEC

4.6.1 CaLB vezan na nosilec (vezava preko oksidacije encima)

4.6.1.1 Umeritvena krivulja za oksidiran CaLB



Slika 49: Umeritvena krivulja za oksidiran CaLB

4.6.1.2 Določitev količine vezanega encima na nosilec

Preglednica 28: Izmerjene koncentracije proteinov v različnih redčitvah supernatantov ter delež odstopanja

	A 750	A 750 - A negativne kontrole	Konc. [mg/mL]	Konc. (upoštevane redčitve)	Delež odstopanja od povprečne vrednosti [%]
10 × redčen	0,1620	0,1098	0,211	2,108	4,19
5 × redčen	0,3044	0,2522	0,484	2,421	10,03
2 × redčen	0,5918	0,5396	1,036	2,072	5,83

Povprečna vrednost: 2,2 mg/mL

Največje odstopanje: 10 %

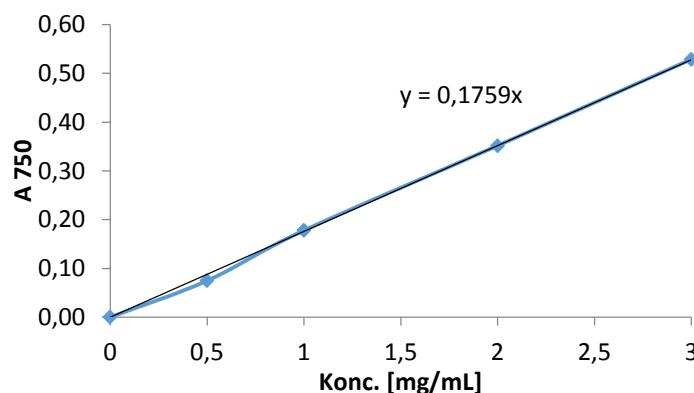
Preglednica 29: Izračun vezanega CaLB na 1 g vlažnega nosilca

Vlažen nosilec	1,84 g	1 g
Količina CaLB dana v reakcijo	276 mg	150 mg
Nevezan CaLB	176 mg	95,65 mg
Vezan CaLB	100 mg	54,35 mg

Na en gram navlaženega nosilca iz embalaže je vezanega 54,35 mg CaLB.

4.6.2 CaLB vezan na nosilec (vezava preko aktivacije nosilca)

4.6.2.1 Umeritvena krivulja za nativen CaLB



Slika 50: Umeritvena krivulja za nativen CaLB

4.6.2.2 Določitev količine vezanega encima na nosilec

Vrednosti smo določili enako kot pri točki 4.6.1.2. Izmerjenim vrednostim absorbanc pri valovni dolžini 750 nm smo odšteli slepo vrednost. Nato smo z iz naklona umeritvene krivulje izračunali koncentracijo ter še upoštevali redčitev vzorca.

Preglednica 30: Določene koncentracije nevezanih encimov v supernatantih

	A (20 mg)	B (50 mg)	C (100 mg)
Neredčen	1,505 mg/mL	1,9789 mg/mL	3,0239 mg/mL
2× redčen	1,453 mg/mL	2,1705 mg/mL	3,5099 mg/mL
4× redčen	1,351 mg/mL	2,4377 mg/mL	3,8840 mg/mL
povprečje	1,436 mg/mL	2,196 mg/mL	3,473 mg/mL
odstopanje	6 %	11 %	13 %

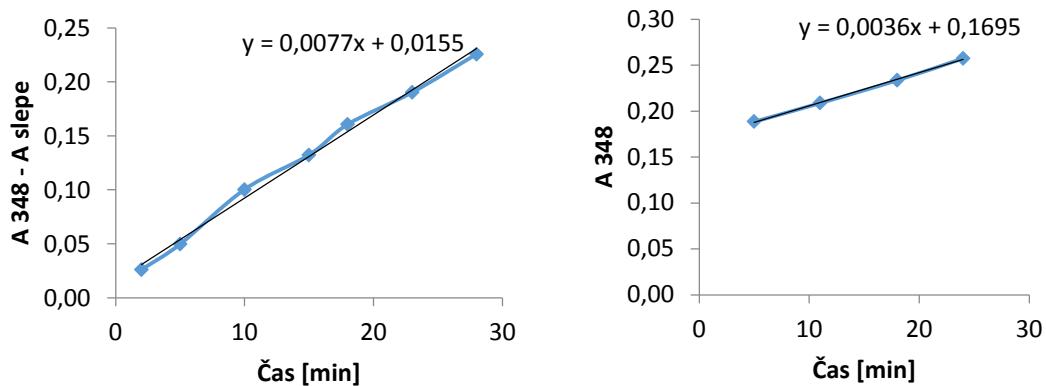
Preglednica 31: Izračun vezanega CaLB na 1 g mokrega nosilca

	A	B	C
Masa mokrega nosilca	1 g	1 g	1 g
CaLB na voljo za vezavo	20 mg	50 mg	100 mg
Nevezan CaLB	5,76 mg	8,8 mg	13,88 mg
Vezan CaLB	14,25 mg	41,2 mg	86,12 mg
Odstotek [%]	71,2 %	82,4 %	86,12 %

Na podlagi rezultatov sklepamo, da z encimi nismo zasedli vseh mest na nosilcu. Naš namen je bil ugotoviti učinek imobilizacije na aktivnost oz. stabilnost encima, zato podatek o maksimalni kapaciteti vezave encima na aktiviran nosilec ne igra ključne vloge pri določitvi aktivnosti. Za določanje aktivnosti smo uporabili vezane encime iz točke B, kjer se je na 1 gram mokrega nosilca vezalo 41,2 mg encima CaLB.

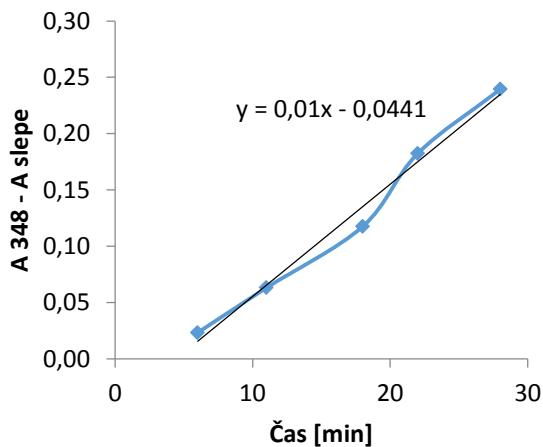
4.7 DOLOČITEV AKTIVNOSTI NA NOSILEC VEZANIH CaLB

4.7.1 Kinetika na nosilec vezanih CaLB



Slika 51: Kinetika nativnega CaLB brez nosilca (levo)

Slika 52: Kinetika CaLB preko oksidacije encima vezanega na nosilec (desno)



Slika 53: Kinetika CaLB vezanega na z glutaraldehidom aktiviran nosilec

4.7.2 Določitev napak pri vzorčenju za kinetiko

Preglednica 32: Deleži odstopanj nastalih pri vzorčenju med reakcijo kinetike

	1	2	3	4	5
Absorbanca pri 348 nm	0,3583	0,3502	0,3730	0,4293	0,4005
Delež odstopanja od povprečja [%]	-6,2680	-8,3870	-2,4224	12,3058	4,7716

4.7.3 Določitev količine CaLB v reakciji kinetike

4.7.3.1 Reakcija kinetike pripravljena z na nosilec preko oksidacije encima vezanim CaLB

Izmerjene mase posameznih komponent:

A) določitev zmanjšanja mase na račun izgube vode iz kosa vate

$$m (\text{kos vlažne vate}) = 85,96 \text{ mg}$$

$$\underline{m (\text{kos suhe vate}) = 81,9 \text{ mg}}$$

izguba mase zaradi zračne vlage je 4,7 %

B) določitev deleža vode v nosilcu vztem iz originalne embalaže

$$m (\text{prazen vlažen nosilec vzet iz originalne embalaže}) = 63,03 \text{ mg}$$

$$\underline{m (\text{prazen suh nosilec}) = 27,74 \text{ mg}}$$

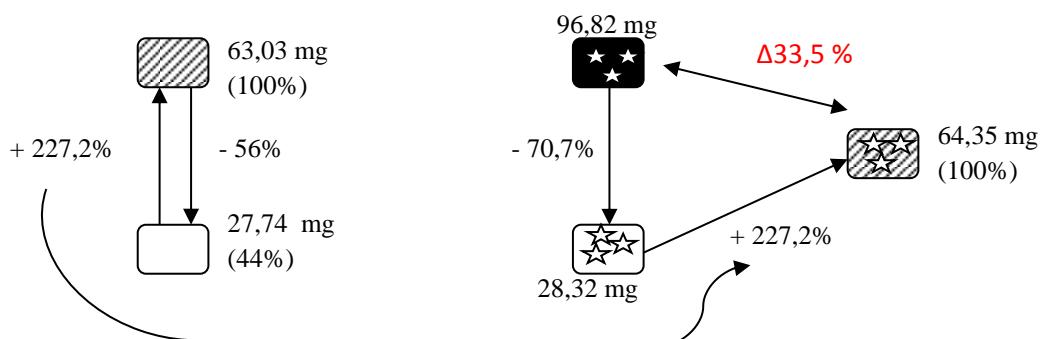
56 % mase praznega nosilca predstavlja maso vode.

C) Določitev deleža vode v mokrem nosilcu z vezanim encimom

$$m (\text{moker nosilec z vezanim encimom}) = 96,82 \text{ mg}$$

$$\underline{m (\text{suh nosilec z vezanim encimom}) = 28,32 \text{ mg}}$$

70,7 % mase mokrega nosilca z vezanim encimom predstavlja maso vode.



Slika 54: Shema določitve deleža mase navlaženega nosilca v primerjavi z mokrim nosilcem z vezanim encimom.

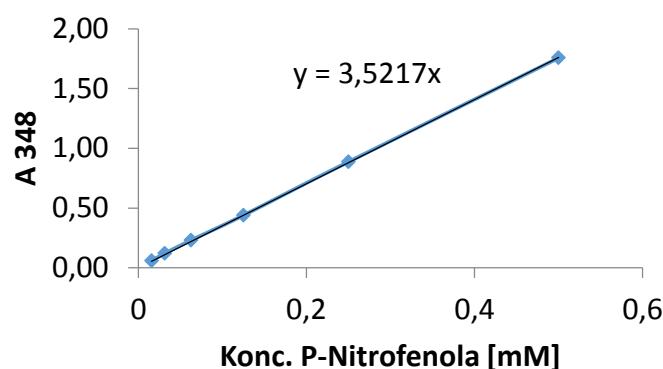
V reakcijo kinetike smo natehtali 46,3 mg mokrega nosilca z vezanim encimom. Ker masa navlaženega nosilca z vezanim encimom predstavlja 66,5 % mase mokrega nosilca, je bilo v reakciji kinetike 30,77 mg navlaženega nosilca z vezanim encimom. Podatek smo določili z upoštevanjem 33,5 % razlike med masama. Izguba vode pri vezanem encimu je zanemarljivo majhna, saj predstavlja masa vezanega encima le 5 % celotne mase.

Od skupne mase 1054,35 mg vlažnega nosilca z vezanim encimom predstavlja 54,35 mg maso encima. Ker smo v reakcijo kinetike dali 30,77 mg vlažnega nosilca z vezanim encimom, sledi, da je bilo v reakciji 1,586 mg encima CaLB.

4.7.3.2 Reakcija kinetike pripravljenega z encimom CaLB vezanega na aktiviran nosilec

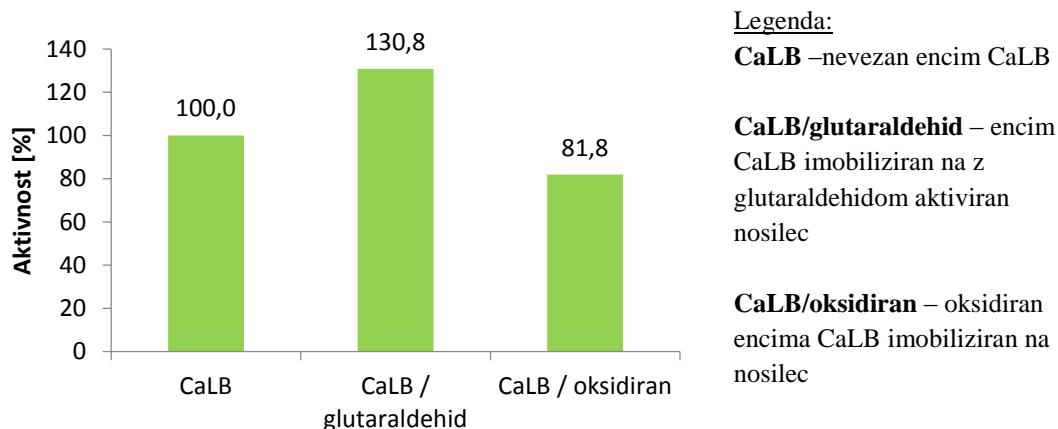
Pri pripravi vezave encima na nosilec smo ugotovili, da od skupne mase nosilca in encima 1041,2 mg predstavlja masa encima 41,2 mg. V reakciji kinetike vezanega encima na oksidiran nosilec smo natehtali 25,1 mg mokrega nosilca z vezanim encimom CaLB. Na podlagi prejšnje ugotovitve sledi, da je bilo v reakciji kinetike 0,9932 mg encima CaLB.

4.7.4 Umeritvena krivulja za p-nitrofenol



Slika 55: Umeritvena krivulja za p-nitrofenol

4.7.5 Aktivnost



Slika 56: Aktivnost različno pripravljenih vezanih CaLB v primerjavi z nevezanim CaLB

5 RAZPRAVA

Stabilizacija KRED

Glede na relativno skope podatke iz literature o stabilizaciji ketoreduktaz in alkoholnih dehidrogenaz ter zaradi zelo omejenih podatkov o encimu KRED, ki je bil predmet naših raziskav možnosti stabilizacije encimskega delovanja, smo večji del razpoložljivega časa namenili določitvi pogojevobarjanja encima ter preverjanja vplivov fizikalno kemijskih dejavnikov postopka priprave novih oblik KRED na aktivnost encima.

Oksidoreduktaze so praviloma manj robustne od hidrolaz, poleg tega za svoje delovanje potrebujejo kofaktorje, v našem primeru NADP. S stališča aplikacij je njihova uporaba bolj omejena in pogosto izrazito specifična, čemur ustreza tudi njihova proizvodnja, ki je v večini primerov zahtevnejša in veliko dražja od proizvodnje vrste hidrolaz. Slednje so se namreč z razvojem industrijskih pralnih sredstev ter predvsem detergenov za pranje perila in posode izdatno pocenile.

Pri razvoju novih oblik KRED smo izhajali iz splošnih znanj oobarjanju encimov za pripravo njihovih aktivnih (aktivnejših) oblik ter tehnik obarjanja, priprave agregatov, povezave agregatov med seboj s pomožnimi proteini ali brez njih, vezave encimov na trdne nosilce in podobno.

Pripravili smo postopek za razvoj stabilnejše oblike encima KRED. Ugotovili smo, da imajo oborjeni encimi KRED višjo aktivnost v primerjavi z nativnimi. Rezultati obarjanja KRED so pokazali razlike pri obarjanju z različnimi obarjalnimi sredstvi. Uporabili smo sol (nasičena raztopina amonsulfata) ter organsko topilo (aceton). Gre za dva principa obarjanja, ki temeljita na različnih interakcijah med topilom in obarjalnim sredstvom. Topnost beljakovin je odvisna od več dejavnikov. Predpostavljam, da so razlike med rezultati obarjanja KRED z različnimi obarjalnimi sredstvi posledica različnih interakcij med proteinom in obarjalnim sredstvom. Ugotovljeno je bilo, da se pri nizki koncentraciji soli, topnost proteinov običajno nekoliko poveča, medtem ko se pri visokih koncentracijah soli topnost proteinov močno zmanjša. Slednji pojav imenujemo izsoljevanje.

KRED smo obarjali tudi z acetonom, ki je organsko topilo. Dodatek organskih topil zniža dielektrično konstanto topila, kar povzroči, da pride do večjih elektrostatskih interakcij med nabitimi deli proteina. Izpostavljanje hidrofobnih površin topilu privede do obarjanja proteinov, saj dodatek organskih topil povzroči zmanjšanje razprtiteve molekul encima v mediju.

Pri spiranju agregatov smo opazili, da se agregati, pripravljeni z nasičeno raztopino amonsulfata, med spiranjem v pufru raztopijo. Agregate smo pripravili v ionskem okolju, kjer je bila s pomočjo amonsulfata odvzeta vsa voda, ki je bila na voljo proteinu. Predpostavljam, da je tak način obarjanja reverzibilen in ob spremembji okolja (pufer je imel nizko ionsko jakost) smo dosegli, da so molekule proteina ponovno raztopljene. Pri

obarjanju z acetonom so strukture trdnejše, kar je lahko posledica spremembe strukture pri obarjanju zaradi vzpostavite številnih elektrostatskih interakcij. Da je prišlo do sprememb v strukturi proteinov, kaže tudi dejstvo, da smo z encimskimi agregati, pripravljenimi z acetonom, dosegli višjo aktivnost, kot pa je le-ta bila pri nativnih, neoborjenih oblikah encima. Najverjetnejša razlaga je v manjših spremembah v strukturi predelov encimov z aktivnim mestom, kjer so lahko nastale za substrat dostopnejše oblike. Pri procesu obarjanja se prekinejo številne vodikove vezi, kar privede do premika celotnih predelov proteinov (alfa-vijačnice, beta-plošče). Pri teh strukturnih spremembah se prej v notranjost skriti hidrofobni predeli proteina prerazporedijo in nekateri se umestijo tudi na površino proteina, kar vpliva na topnost proteinov.

Pripravili smo tudi zamrežene aggregate KRED imenovane CLEA KRED. Prednost te oblike je, da so predhodno pripravljeni agregati encimov povezani v skupke, s katerimi je lažje operirati v proizvodnem procesu. Ugotovili smo, da zamreževalec glutaraldehid ni primeren, saj močno zmanjša aktivnost encimov KRED. Glutaraldehid za zamreženje potrebuje aminske skupine, ki pa se nahajajo tudi v aktivnem mestu našega encima KRED. Aminska skupina v aktivnem mestu ketoreduktaz skupaj z aspartatom zmanjšata pKa tirozina, ter tako omogoči nastanek protonskega donorja za NADP. V študiji so Jez in sod., 1997, analizirali ter primerjali ohranjene regije ter ugotovil, da je lizin vedno prisoten v aktivnem mestu različnih aldo-ketoreduktaz, ter da mutacija lizina povzroči izgubo aktivnosti encima. Z vezavo glutaraldehyda na lizinske ostanke povzroči tako sterično oviranje za NADP kot tudi izgubo funkcije encima, saj lizinski ostanki niso na voljo.

Kot alternativo glutaraldehidu smo uporabili dekstranaldehid, ki je večja molekula in ne vstopi v aktivno mesto encima. Tako pripravljeni CLEA KRED so imeli aktivnost višjo za 21,5 % v primerjavi z nativnim KRED, vendar so bile izgube encima v postopku priprave CLEA z dekstranaldehydi višje od 30 %.

V okviru zastavljenih ciljev smo želeli najti čim boljšo rešitev za stabilizacijo KRED, zato smo preverili tudi druge možnosti. Pri pripravi CLEA je zamreženje kritični korak. Nekateri encimi, ki imajo na površini zelo malo lizinskih ostankov, ne morejo biti pravilno zamreženi. Encim KRED ima še dodatno težavo, saj ima lizin v aktivnem mestu encima. V takšnih primerih se poslužujemo dodatka polimerov oz. proteinov, ki imajo na površini proste aminske skupine. Z dodatkom BSA h KRED smo želeli povečati učinkovitost zamreženja, ne da bi aldehydni ostanki reagirali z lizinskimi ostanki encima KRED, ter s tem posledično povečati aktivnost zamreženih encimov. Na podlagi rezultatov smo zaključili, da dodatek BSA ni pripomogel k višji aktivnosti, zato ga po našem mnenju ni smiselnou uporabiti pri pripravi CLEA KRED.

Specifična aktivnost CLEA KRED je sicer višja od specifične aktivnosti nativnega encima, vendar so izgube encima v postopku priprave CLEA višje od 30 %. Ocenjujemo, da bi izgube lahko znižali na približno 15 %. Kljub temu ostaja KRED, oborjen z acetonom. s

stališča morebitne trenutne aplikacije ter stroškov veliko boljša opcija. V primeru, da izgub pri pripravi CLEA oblik ne bi imeli, bi bilo smotrno uporabiti CLEA KRED oblike, saj so robustnejše za uporabo ter hkrati stabilnejše proti raztplavljanju v vodnih medijih.

Koncentracijo proteinov v vzorcih smo določevali z elektroforezo, in sicer z NaDS-PAGE elektroforezo. Menimo, da koncentracije nevezanih proteinov v supernatantu pri pripravi agregiranih oblik ni primerno določiti s spektrofotometrično metodo, saj med centrifugiranjem ostane nekaj agregatov v supernatantu. Spektrofotometrično določanje proteinov v raztopini s skupki ni pravilno. Raztopina mora biti bistra (ne le na videz). Centrifugiranje pri višjih obratih, s katerimi bi posedli vse encimske skupke v pelet, ne pride v poštev, saj se pelet, ki vsebuje oborjene encime, preveč sprime in ga kasneje težko resuspendiramo za pripravo redčitev. Drugi razlog, zakaj smo koncentracijo določevali z elektroforezo, je tudi povezan z encimskimi skupki. Zaradi agregatov v raztopini težko zagotovimo homogeno suspenzijo in pri pripravi redčitev, kjer večkrat zaporedno prenašamo določen alikvit raztopine, privede do odstopanj. Metoda določevanja proteinov z elektroforezo se je zato izkazala za najprimernejšo.

Pri pripravljenih CLEA KRED se je izkazalo, da so te po pričakovanjih zelo trdne z kovalentnimi vezmi povezane strukture, ki med pripravo za nanos na gel (kuhanje v pufru z NaDS in merkaptoetanolom) ne razpadejo popolnoma, zato so možna odstopanja pri izračunu koncentracije proteina in posledično tudi aktivnosti le-tega. S posrednim poskusom smo določili delež CLEA KRED, ki ostane v žepku gela (približno 20 %), in to vrednost upoštevali pri izračunu koncentracije proteinov v vzorcih.

Stabilnost encimov KRED, oborjenenih z acetonom, smo testirali pri višji temperaturi, alkalnih pogojih in v zaporednih reakcijah testirali sposobnost ohranjanja ustrezne aktivnosti tudi po večkratni uporabi. Encimi KRED, oborjeni z acetonom, so aktivnejši v alkalnih pogojih (pH 8–8,5). Ugotovili smo tudi, da so oborjeni encimi KRED v primerjavi z nativnimi bolj stabilni, saj so po osmih ciklih ohranili začetno aktivnost, medtem ko je pri nativnih encimih KRED aktivnost po osmih ciklih padla na približno 73 % začetne vrednosti.

Na podlagi prej omenjenih ugotovitev o oborjenemu KRED smo se odločili, da njegove lastnosti testiramo v simuliranem industrijskem okolju oziroma reakciji. V konkretnem sistemu smo KRED uporabili samo kot pomožne encime, za regeneracijo/redukcijo NADP v NADPH. Najprej smo testirali delovanje v 15 mL sistemu in določili dozo KRED tako, da je bila edini oziroma ključni limitni dejavnik. Nato smo poskus izvedli še v 2 L merilu. Reakcija je potekala v gosti suspenziji mešanice reagentov, ki je postajala sčasoma viskoznejša. Zato je bila po pričakovanjih v začetku reakcije hitrost reakcije primerljiva med obema oblikama/vzorcema KRED, kasneje pa se pri sistemu z oborjenimi KRED hitrost reakcije zmanjša. Dobljen rezultat pripisujemo spremenjeni reologiji reakcijske mešanice. Ker so v sistemu z nativnimi KRED encimi bolj enakomerno razporejeni po reakcijski mešanici, lahko NADP hitro vstopi v aktivno mesto encima ter nato NADPH

naprej do druge oksidoreduktaze. Pri sistemu z oborjenimi KRED pa so encimi razporejeni v redkejših gručah, zato je povprečen čas redukcije ter »dostave« reducirane NADP do mesta uporabe druge oksidoreduktaze daljši. V obeh primerih je reakcija potekla do konca, vendar je v primeru uporabe oborjenih encimih trajanje pretvorbe podaljšalo za 30 %.

Imobiliziran CaLB

V svojem delu smo uspešno imobilizirali encime CaLB na nosilec sepabeads EC-HA. Vezavo smo izvedli na dva različna načina, preko oksidacije encima in preko aktivacije nosilca. Pri svojem delu smo uporabili protokole za imobilizacijo iz strokovne literature.

Med določitvijo nevezanih encimov v raztopini smo ugotovili, da se oksidiranim encimom struktura spremeni do takšne mere, da sprememba vpliva na rezultat pridobljen z spektrofotometričnimi metodami. To dejstvo smo upoštevali pri zasnovanju metode za določanje koncentracije nevezanih encimov. Pri metodi z vezavo oksidiranega encima na nosilec smo za določevanje deleža nevezanih encimov pripravili umeritveno krivuljo oksidiranega CaLB. V tem koraku se naša metoda razlikuje od metode uporabljene v literaturi, saj v članku ni bilo poudarjeno, da so pri pripravi umeritvene krivulje uporabili oksidiran encim.

V reakciji kinetike smo upoštevali tudi fizikalne lastnosti nosilcev. Zelo pomembno je, ali smo natehtali suh, navlažen ali moker nosilec. Te razlike v masi smo upoštevali pri izračunu aktivnosti na nosilec vezanih encimov. Ugotovili smo, da ima na nosilec vezan encim s postopkom aktivacije nosilca encim aktivnost za 30 % višjo v primerjavi z nevezanim encimom. Metoda se je po pričakovanjih izkazala za zelo učinkovito in se sklada z znanimi podatki iz literature.

Med oksidacijo encima se zaradi oksidacije hidroksilnih skupin, nekaterih aldehidnih skupin porušijo in na novo izoblikujejo predvsem vodikove vezi. Proteini so izredno fleksibilni in nativna konformacija ni statična oz. toga, to pa omogoča številne različne konformacije v dani proteinski strukturi. Ker je omogočena precejšna fleksibilnost, majhne spremembe v konformaciji pogosto ne privedejo do popolne izgube aktivnosti encima. Ohranjeni encimski aktivnosti po oksidaciji smo določili tudi v svojem delu. Pri vezavi oksidiranih encimov CaLB na nosilec je bila aktivnost encimov za 18,2 % nižja kot pri nevezanih encimih. Z oksidacijo smo povzročili neselektivne spremembe, ki so znižale aktivnost encimske doze. Ne vemo, ali je prišlo do popolne inaktivacije dela encimskih molekul, preostanek pa je ohranil enako specifično aktivnost, ali je prišlo do manjših sprememb strukture pri večini encimskih molekul ter posledično do nižje specifične aktivnosti ali pa dejansko do mešanice vplivov. Vsekakor pa menimo, da je oksidacija encimskih molekul – priprave aldehidnih ostankov za vezavo na aminske skupine nosilca pri obeh testiranih encimih najslabša ter najmanj ustrezna varianta.

6 SKLEPI

- Priprava agregatov je enostaven postopek s katerim encimom KRED povišamo aktivnost za 25 %.
- Pri postopku priprave CLEA KRED se pojavijo 30 % izgube proteina, kar z vidika ekonomike procesa v industrijskem merilu praviloma ni ugodno.
- Izboljšana stabilnost ketoreduktaze v alkalnih pogojih reakcije.
- V gostih, viskoznih reakcijskih mešanicah so agregati manj učinkoviti. Prednost pred nativnim encimom bi imeli le v primeru, če bi aggregate KRED lahko iz reakcijske mešanice reizolirali in ponovno uporabili, kar pride v poštev pri bistrih raztopinah. V gostih suspenzijah ali emulzijah pa je separacija aktivnih encimskih agregatov zelo težko izvedljiva in je verjetno neekonomična.
- V nalogi smo uspešno pripravili lastno imobilizirano lipazo CaLB. Vezali smo jo na nosilec Sepabeads EC-HA ter ugotovili, da je po svojih ključnih lastnostih primerljiva s komercialnimi različicami imobiliziranih CaLB.

NADALJNJE POTI RAZISKOVANJA

- Preveriti tudi druge vrste imobilizacije KRED, kot sta na primer nekovalentna vezava ter uporaba poroznih silikatnih delcev.
- Testiranje stabiliziranih oblik KRED v sistemih, kjer je ta tudi ključni encim za pretvorbo ciljnih molekul v proizvode (ketoredukcija).
- Priprava mešanih encimskih agregatov ali imobiliziranih oblik.
- Določiti maksimalno količino encima CaLB, ki ga lahko vežemo na nosilec Sepabeads EC-HA.
- Preizkus novih mutiranih oblik CaLB, ko bodo komercialno dostopne, in sicer predvsem tistih, s spremenjeno enantioselektivnostjo.

7 POVZETEK

Ketoreduktare so zaradi svoje sposobnosti regeneracije kofaktorjev prisotne v številnih procesih. Prav tako so tudi lipaze zaradi svoje visoke selektivnosti zelo pomembni biokatalizatorji v moderni kemijski in farmacevtski industriji. Razgradilo širok spekter substratov in ne potrebujejo kofaktorjev za svoje delovanje. Številni postopki, v katerih se uporablajo encimi, so zastavljeni tako, da po koncu šarže encime zavrzemo. Zaradi težnje po ekonomičnosti procesa smo posegli po imobilizaciji encimov. Imobilizirani encimi ponujajo nekatere operativne prednosti v primerjavi z raztopljenimi encimi. V preteklosti so razvili številne postopke imobilizacije encimov, vendar je potrebno za vsak tip encima postopek imobilizacije optimizirati. V nalogi smo se odločili uporabiti tudi imobilizacijo encimov brez uporabe nosilca, ki se je uveljavila v zadnjem času.

Encim KRED smo imobilizirali brez uporabe nosilcev, in sicer s pripravo encimskih agregatov. Pripravili pa smo tudi zamrežene encimske agregate imenovane CLEA KRED. Ugotovili smo, da ima imobilizirana oblika KRED v obliki encimskih agregatov za 25 % višjo aktivnost v primerjavi z neoborjenimi KRED. Tudi karakteristike encima pri spremenjenih pogojih so potrdile, da so oborjeni encimi dalj časa stabilni, saj so po več ciklih delovanja ohranili svojo prvotno aktivnost, medtem ko je pri neimobiliziranih encimih aktivnost padla po osmem ciklu delovanja na 73 % začetne aktivnosti. Določili pa smo tudi pH območje, v katerem imajo imobilizirani encimi najvišjo aktivnost. Delovanje agregiranega encima KRED smo tudi testirali v simuliranem industrijskem okolju oziroma reakciji, kjer je hkrati prisotnih več med seboj odvisnih encimov. Izkazalo se je, da je hitrost kinetike reakcije primerljiva, vendar se proti koncu procesa pri oborjenih KRED hitrost zmanjša, kar je posledica spremembe reologije reakcijske mešanice.

Encime lipaze B smo na dva različna načina uspešno imobilizirali na trden nosilec imenovan Sepabeads EC-HA. Z vezavo preko aktivacije nosilca smo pripravili imobilizirane CaLB, katerih aktivnost je bila v primerjavi z aktivnostjo nevezanih encimov 130,8 %. Z vezavo preko oksidacije encimov pa smo pripravili vezane encime, ki so imeli 81,8 % aktivnost v primerjavi z aktivnostjo nevezanega encima.

8 VIRI

- Adriano W.S., Costa Filho E.H., Silva J.A., Gonçalves L.R.B. 2005. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22, 4: 529–38
- Amotz S. 1987. Method for production of an immobilized enzyme preparation by means of a crosslinking agent. Novo Industri A/S US 4,665,028: 13 str.
- Anderson E.M., Larsson K.M., Kirk O. 1998. One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16, 3: 181–204
- Avnir D., Braun S., Lev O., Ottolenghi M. 1994. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chemistry of Materials*, 6: 1605–1614
- Bornscheuer U. T. 2003. Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. *Angewandte Chemie International Edition*, 42: 3336–3337
- Boyer R.F. 2008. Temelji biokemije. Ljubljana: Študentska založba: 634 str.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254
- Bradford, BT 0413 – Bioseparation Technology Laboratory, 2. Estimation of proteins by bradford method, Department of Biotechnology, SRM University
- Bruce N.C., Willey D.L., Coulson A.F.W. Jeffrey J. 1994. Bacterial morphine dehydrogenase further defines a distinct superfamily of oxidoreductases with diverse functional activities. *Biochemical Journal*, 299: 805–811
- Buxbaum E. 2011. Electrophoresis. V: *Biophysical Chemistry of Proteins - An Introduction to Laboratory Methods*. Buxbaum E. (ed.). Springer: 61–95
- Caballero Valdés E., Wilson Soto L., Aroca Arcaya G. 2011. Influence of the pH of glutaraldehyde and the use of dextran aldehyde on the preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Burkholderia cepacia*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14, 3: 1–7
- Cao L. 2006. Chapter 1. Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects. V: *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. Linqiu Cao (ed.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 1–52
- Cao L., Van Langen L.M., Van Rantwijk F. Sheldon R.A. 2001. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: Robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 665–670
- Cao L., Van Langen L., Sheldon R.A. 2003. Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free?. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 387–394
- Cao L., Van Rantwijk F., Sheldon R.A. 2000. Cross linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilisation of penicillin acylase. *Organic Letters*, 2: 1361–1364
- Celem E.B., Onal S. 2009. Immobilization of phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP for the hydrolysis of soymilk phytate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61: 150–156
- Cruz J., Barbosa O., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R., Torres R., Ortiz C. 2012. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 80: 7–14

- Cyglar M., Schrag J.D., Sussman J.L., Harel M., Silman I., Gentry M.K., Doctor B.P. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Science*, 2: 366–382
- Dalko P.I. 2007. Asymmetric Organocatalysis: A New Stream in Organic Synthesis. V: Enantioselective Organocatalysis: Reactions and Experimental Procedures, Dalko P.I. (ed.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 1–17
- Dulekgurgen E. 2004. Proteins (Lowry) protocol. Istanbul Technical University, Faculty of Civil Engineering, Environmental Engineering Department
- El-Kabbani O., Judge K., Ginell S.L., Myles D.A.A., DeLucas L.J., Flynn T.G. 1995. Structure of porcine aldehyde reductase holoenzyme. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2: 687–692
- Fernandez V.G., Brieva R., Gotor V. 2006. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40: 111–120
- Ghanem A. 2007. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, 63: 1721–1754
- Ghanem A., Aboul-Enein H.Y. 2005. Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates. *Chirality*, 17: 1–15
- Ghosh R. 2006. Precipitation. V: Principles of Bioseparations Engineering. Ghosh R. (ed.). World Scientific Pub Co Inc: 65–74
- Gilham D., Lehner R. 2005. Techniques to Measure Lipase and Esterase Activity in Vitro. *Methods*, 36: 139–147
- Gsponer J., Vendruscolo M. 2006. Theoretical Approaches to Protein Aggregation. Bentham Science Publishers Ltd. *Protein & Peptide Letters*, 13: 287–293
- Guauque Torres M.P., Foresti M.L., Ferreira M.L. 2013. Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Biochemical Engineering Journal*, 72: 18–23
- Gustafsson H. 2012. Enzyme Immobilization in Mesoporous Silica. Thesis for the degree of licentiate of engineering. Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University Of Technology, Göteborg, Sweden, 45 str.
- Hanefeld U., Gardossi L., Magner E. 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38: 453–468
- Hilterhaus L., Minow B., Müller J., Berheide M., Quitmann H., Katzer M., Thum O., Antranikian G., Zeng A. P., Liese A. 2008. Practical application of different enzymes immobilized on seapabeads. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31: 163–171
- Holmquist M. 2000. Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, 1, 2: 209–235
- Idris A., Bukhari A. 2012. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances*, 30: 550–563
- Jez J.M., Bennett M.J., Schlegel B.P., Lewis M., Penning T.M. 1997. Comparative anatomy of the aldo–keto reductase superfamily *Biochemical Journal*. 326: 625–636
- Kempka A.P., Lipke N.R., Pinheiro T.L.F., Menoncin S., Treichel H., Freire D.M.G. 2008. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31: 119–125

- Lopes D.B., Fraga L.P., Fleuri L.F., Macedo G.A. 2011. Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately?. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 31, 3: 608–613
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A.L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265–275
- Mahmod S.S., Yusof F., Jami M.S. 2014. Production of Cross-Linked Enzyme Aggregate-Lipase from Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*) Viscera. International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences, June 14–15, 2014 Penang (Malaysia)
- Marek M., Valentova O., Kas J. 1984. Invertase immobilization via its carbohydrate moiety. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 10: 1223–1226
- Mateo C., Chmura A., Rustler S., Van Rantwijk F., Stoltz A., Sheldon R.A. 2006. Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase–nitrilase bienzymatic cascade: a nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17: 320–323
- Menter P. 2000. Acrylamide Polymerization - A Practical Approach. Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 USA (tech note 1156)
- Munishwar N., Raghava S., Raghava G. 2011. Enzyme Stabilization via Cross-Linked Enzyme Aggregates. V: Enzyme Stabilization and Immobilization. Methods and Protocols. Shelley D. Minteer (ed.). New York, Humana press/Springer: 133–145
- Prabhavathi D.B.L.A. Guo Z., Xu X. 2009. Characterization of Cross-Linked Lipase Aggregates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86: 637–642
- Prlainović N.Ž., Knežević-Jugović Z.D., Mijin D.Ž., Bezbradica D.I. 2011. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads: The effect of lipase oxidation by periodates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34: 803–810
- Prodanović R., Jovanović S., Vujičić Z., 2001. Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate. *Biotechnology Letters*, 23, 14: 1171–1174
- Prošek M., Pukl M. 1991. Kvantitativna planarna kromatografija. Ljubljana, Kemijski inštitut Boris Kidrič: 184 str.
- Quiocho F.A., Richards F.M. 1964. Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 52: 833–839
- Resolution AP (97)1. On ion exchange and adsorbent resins used in the processing of foodstuffs (adopted by the EU Committee of ministers on September 30, 1997) <https://wcd.coe.int/ViewDoc.jsp?id=595983&Site=CM> (28.8.2014)
- Schmid A., Dordick S.J., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409: 258–268.
- Schoevaart R., Wolbers M.W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom A.P.G., Van Rantwijk F., Van der Wielen L.A.M., Sheldon R.A. 2004. Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Biotechnology and bioengineering*, 87, 6: 754–762
- SEPABEADS® EC-HA, Porous hydrophilic enzyme carriers Via Roma, 55 – 20082 Binasco (MI) Italy
<http://www.resindion.com> (14.10.2014)

- Shah S., Sharma A., Gupta M. N. 2006. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Analytical Biochemistry*, 351: 207–213
- Sheldon R.A, Schoevaart R., Van Langen L.M. 2006. Cross-Linked Enzyme Aggregates. V: Immobilization of Enzymes and Cells. Guisán J.M. (ed.). Totowa, Humana press Inc: 31-45
- Sheldon R.A. 2007. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349: 1289–1307
- Sheldon R.A. 2011. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92: 467–477
- Sigma product information. 4-Nitrophenyl acetate. GCY/RXR 12/03.
http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n8130pis.pdf (29.10.2014)
- Silverman R.B., Holladay M.W. 2014. Enzymes. V: The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. Silverman R.B., Holladay M.W. (eds.) Third Edition. San Diego, Elsevier Inc.: 165–205
- Sivasankar B. 2005. Precipitation. V: Bioseparations: Principles and techniques. Sivasankar B (ed.). PHI Learning Pvt. Ltd.- Technology & Engineering: 119–142
- St. Clair N.L., Navia M.A. 1992. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *Journal of the American Chemical Society*, 114: 7314–7316
- Šulek F., Perez Fernandez D., Knez Ž., Habulina M., Sheldon R.A. 2011. Immobilization of horseradish peroxidase as crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Process Biochemistry* 46: 765–769
- Torres R., Mateo C., Fernandez-Lorente G., Ortiz C., Fuentes M., Palomo J.M., Guisan J.M., Fernández-Lafuente R. 2003. A Novel Heterofunctional Epoxy-Amino Sepabeads for a New Enzyme Immobilization Protocol: Immobilization-Stabilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology progress*, 19: 1056–1060
- Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar S., Jones T.A. 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 2: 293–308
- Uppenberg J., Ohrner N., Norin M., Hult K., Kleywelt G.J., Patkar S., Waagen V., Anthonsen T., Jones T.A. 1995. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*, 34: 16838–16851
- Weber K., Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Jornal of Biological Chemistry*, 244, 16: 4406–4412
- Wilson, D.K., Nakano, T., Petrash, J.M. and Quiocho, F.A. 1995. 1.7 Structure of FR-1, a Fibroblast Growth Factor-Induced Member of the Aldo-Keto Reductase Family, Complex with Coenzyme and Inhibitory. *Biochemistry*, 34: 14323–14330
- Žuža M., Milosavić N., Knežević-Jugović Z. 2009. Immobilization of modified penicillin G acylase on Sepabeads carriers *Chemical Papers* 63, 2: 117–124

ZAHVALA

Prva zahvala gre mentorju prof. dr. Marinu Beroviču, ki je sprejel mentorstvo in me z znanjem, izkušenostjo in nasveti usmerjal pri pisanju magistrske naloge ter mi odprl vrata do nabiranja izkušenj in znanja v laboratorijih izven fakultete.

Zahvala gre tudi somentorju doc. dr. Alešu Gaspariču, ki si je vedno vzel čas za pomoč in nasvete ter s kritičnim očesom pomagal najti smiselno rešitev. Pod njegovim mentorstvom sem pridobil veliko izkušenj za delo v laboratoriju ter spoznal delo v industriji, za kar sem mu zelo hvaležen.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Gregorju Anderluhu za strokovni pregled magistrske naloge ter za nasvete, ki so pripomogli k izboljšanju naloge.

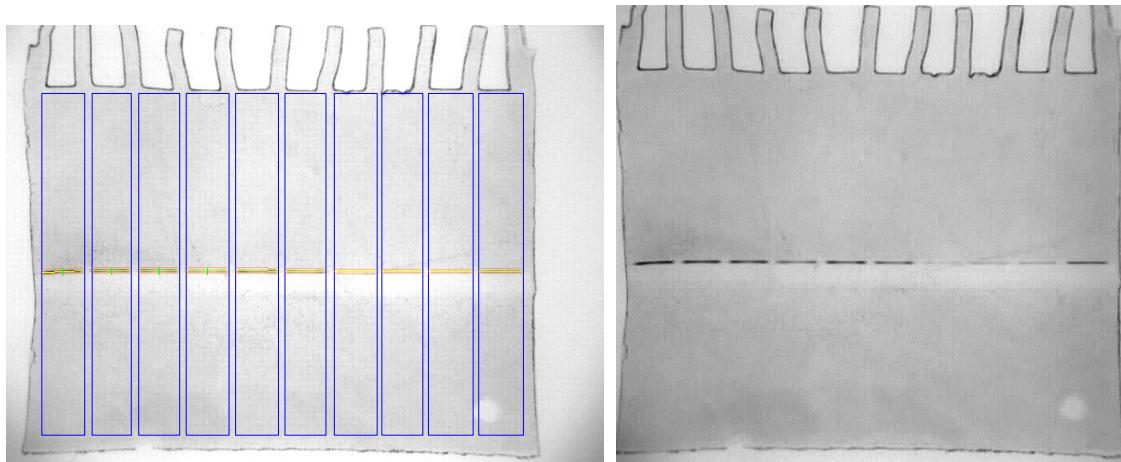
Zahvala tudi tovarni zdravil Krka d.d., ki mi je omogočila, da sem lahko vso raziskovalno delo opravil v njenih laboratorijih.

Poleg tega bi se zahvalil vsem, ki jih nisem omenil in so mi na kakršenkoli način pomagali pri izdelavi moje magistrske naloge.

Posebna zahvala gre tudi staršema, ki sta mi ves čas študija stala ob strani, me vedno podpirala in spodbujala.

PRILOGA A

Primer izpisa podatkov analize gela s programom SYN Gene, ter vrednotenje količine proteina v vzorcu



Capture

Digitizer G:BOX (MOT) - Gel Sample (EDR)

Camera Factory Configuration, EtBr/UV filter, Trans UV, with EDR, motorised lens

Settings GeneSnap version 7.07.01

Exposure Time: 0,040 seconds

Frame accumulation: Off

(Stop on saturation: Off)

Darkroom lighting: Transilluminator

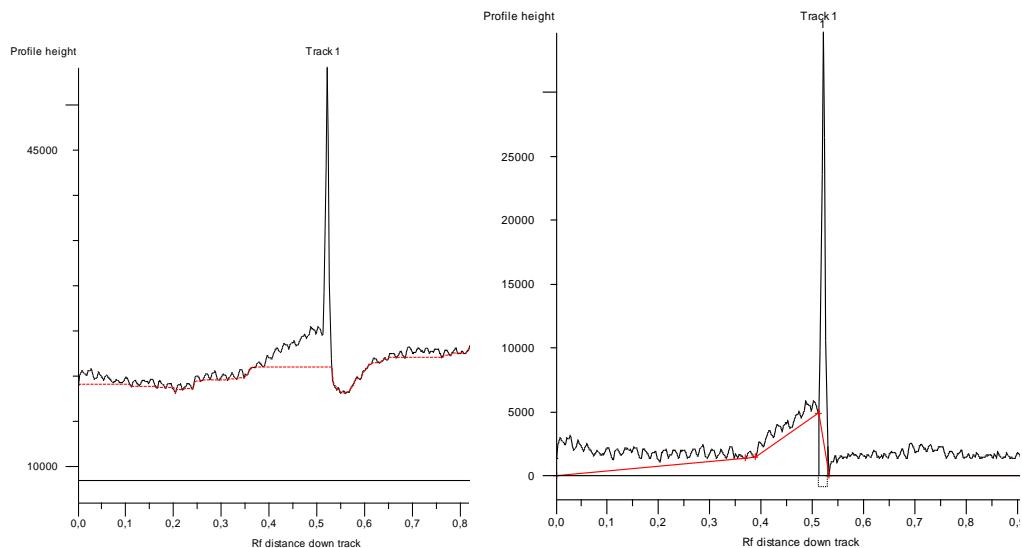
EDR: On

Camera Resolution: 0,29 MPixel (1x1 bin)

Camera Serial ID: 9010090

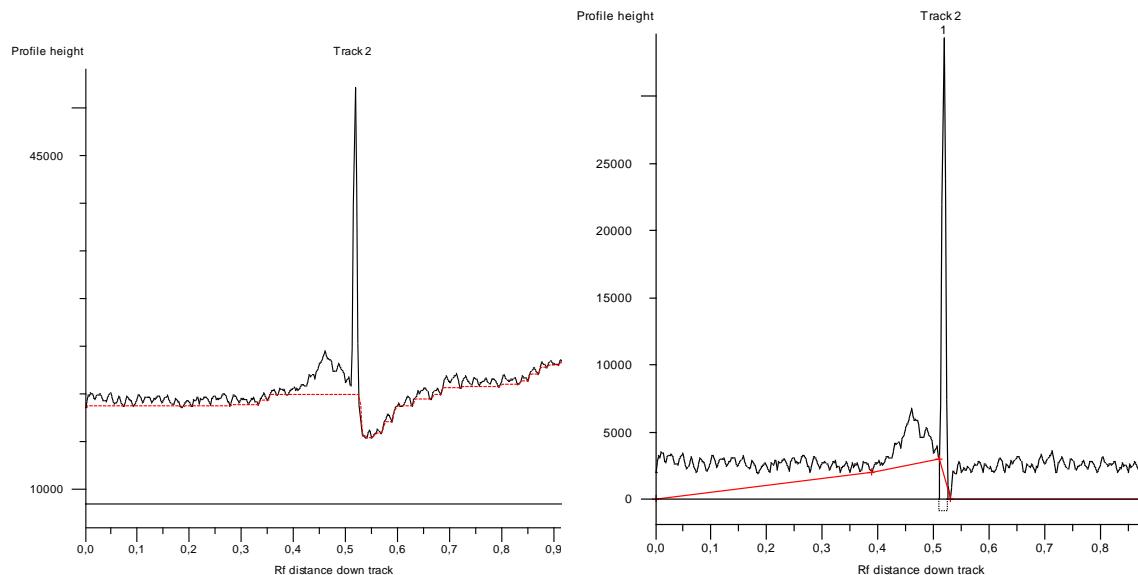
GrabberChain Image resampler

Track 1.



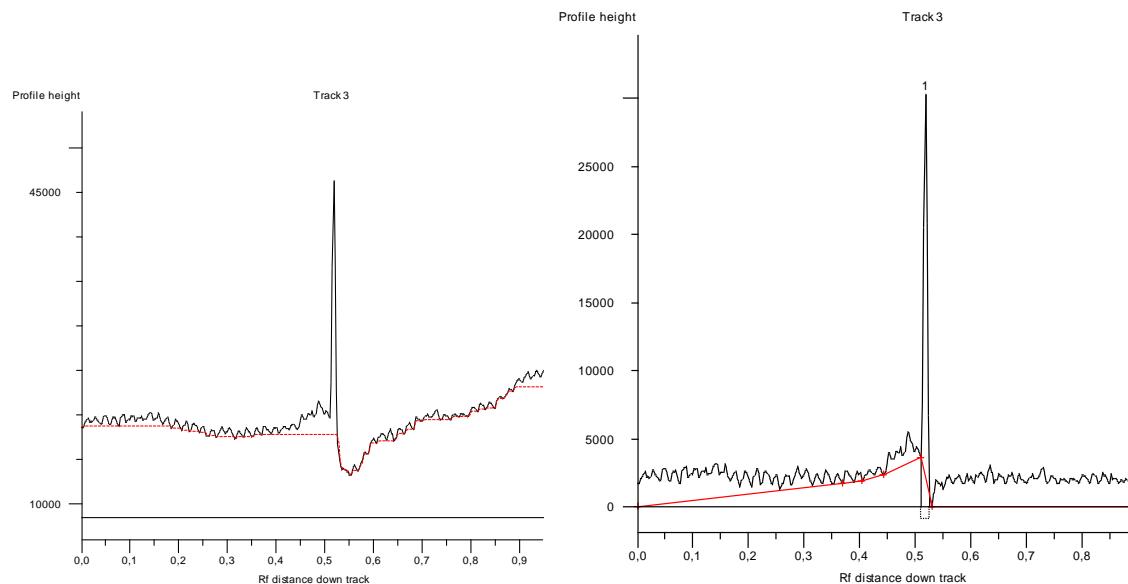
Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	31849,174	4235653,00	80,00

Track 2



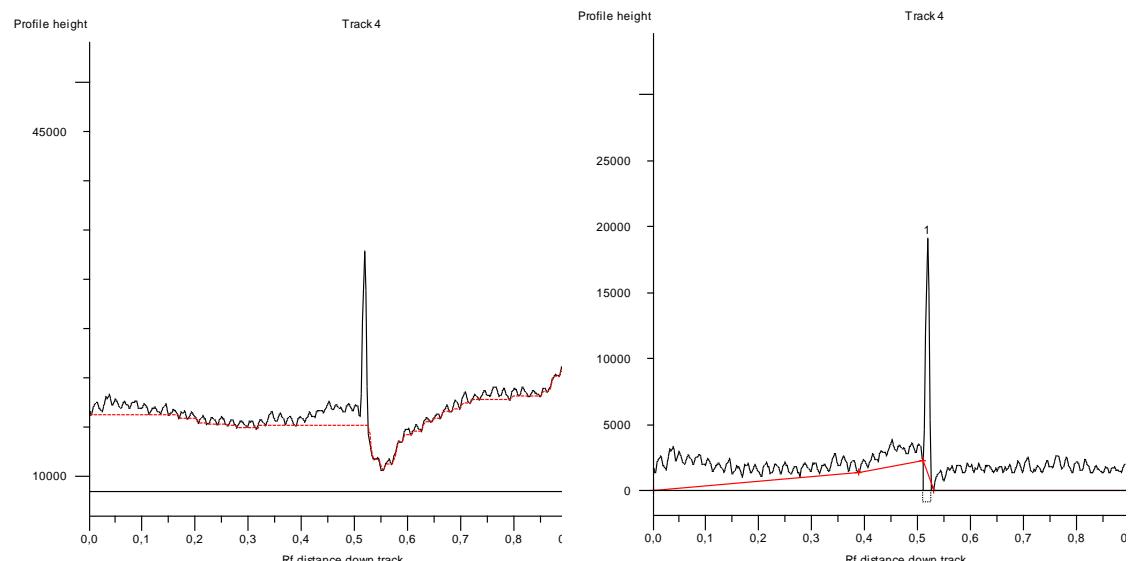
Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	32633,572	3631296,50	70,00

Track 3



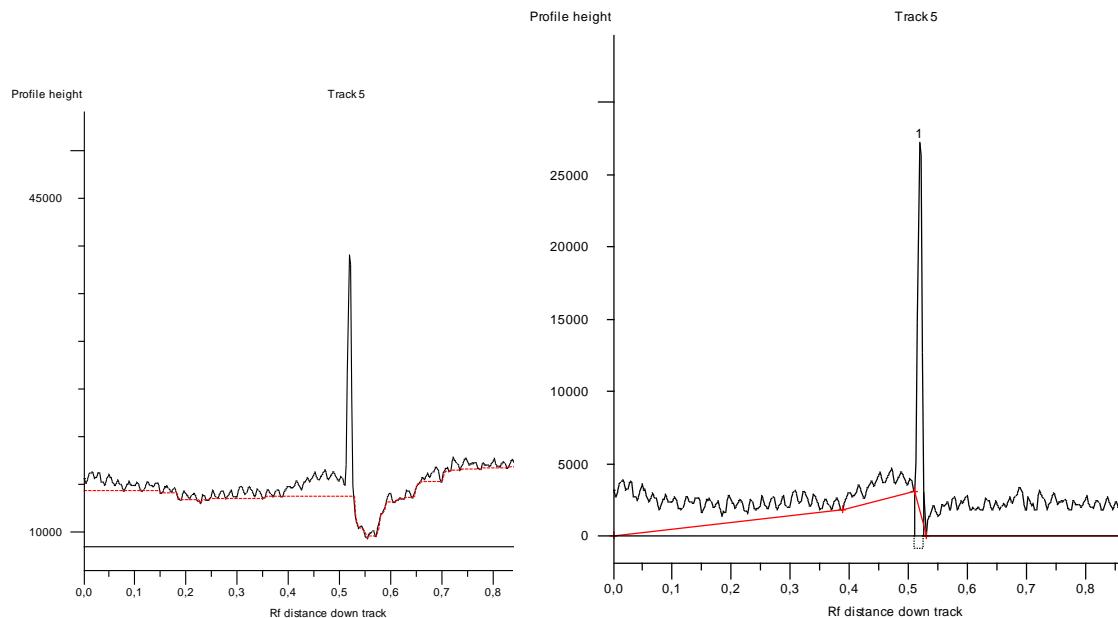
Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	28248,451	3336046,75	60,00

Track 4



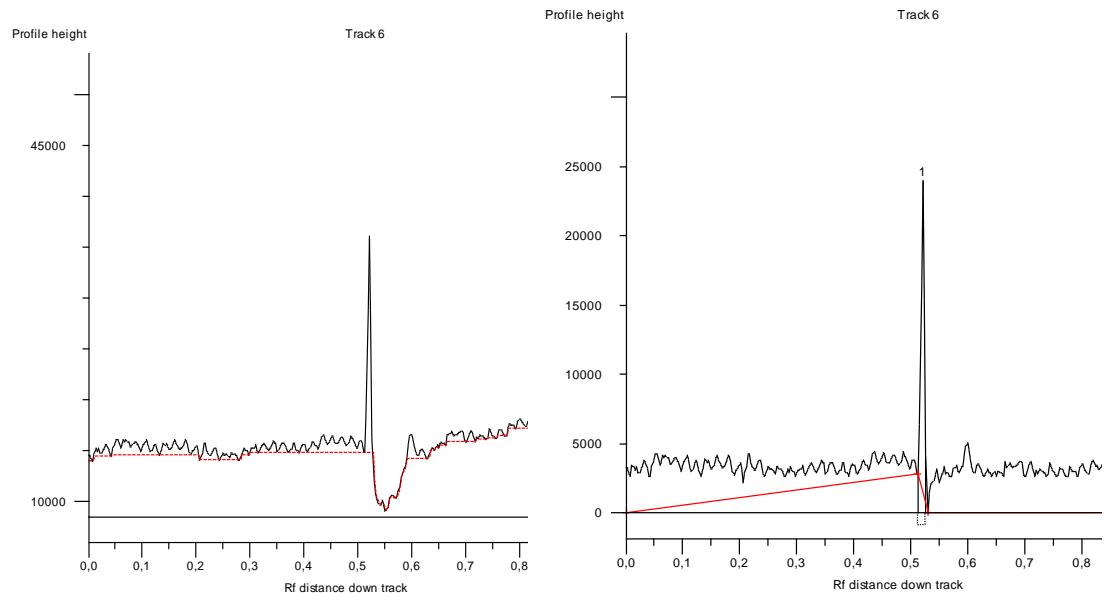
Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	17770,021	2285441,25	40,00

Track 5



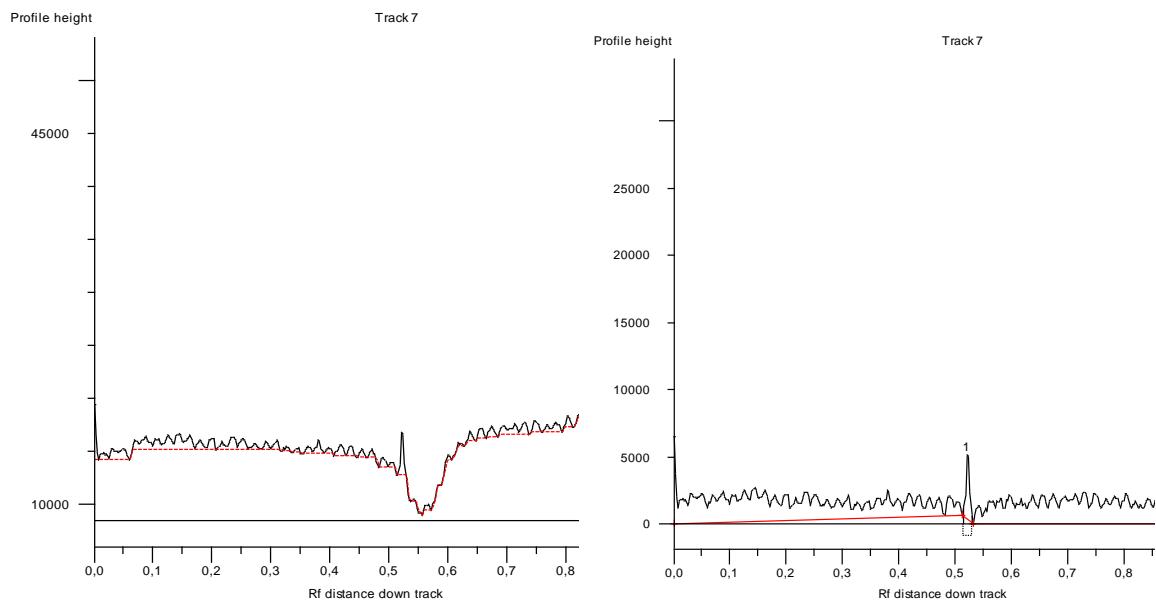
Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	25458,971	3616278,50	67,59

Track 6



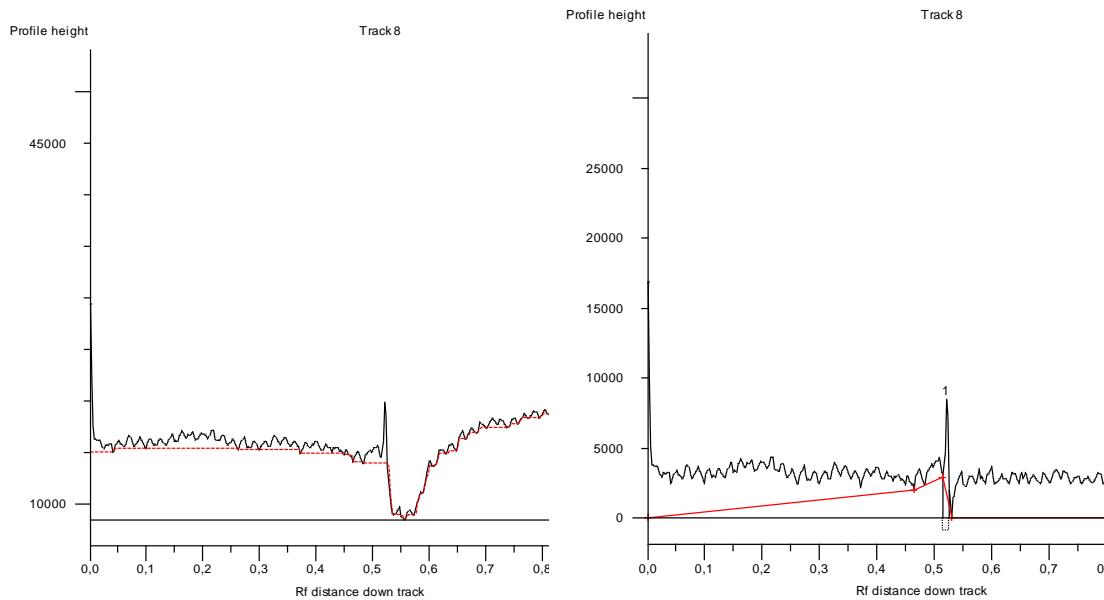
Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	22588,820	2543522,75	45,22

Track 7



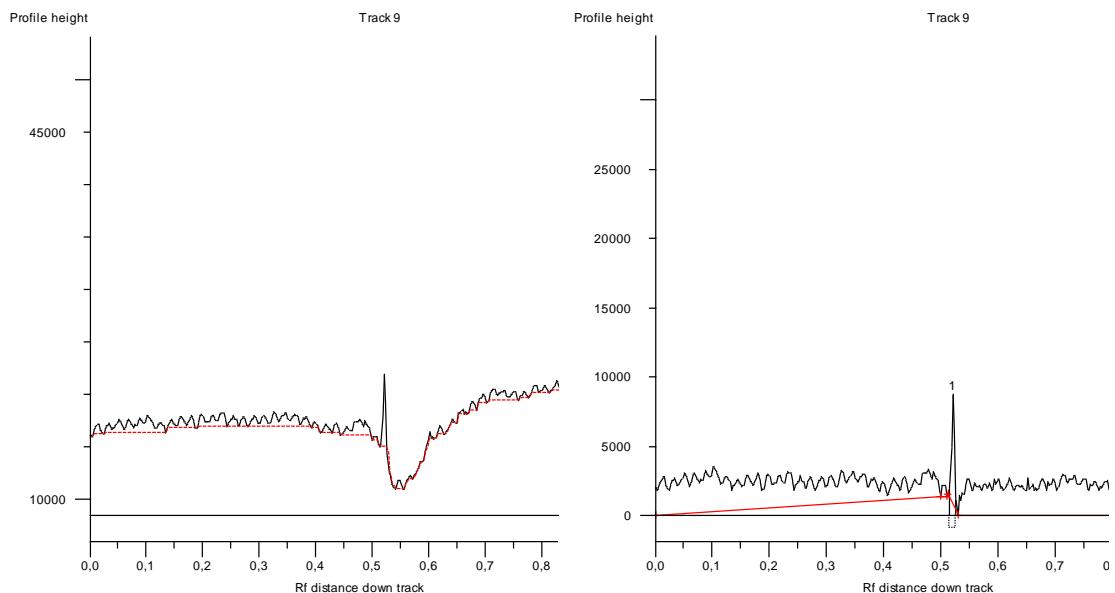
Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	4852,992	660160,00	5,96

Track 8



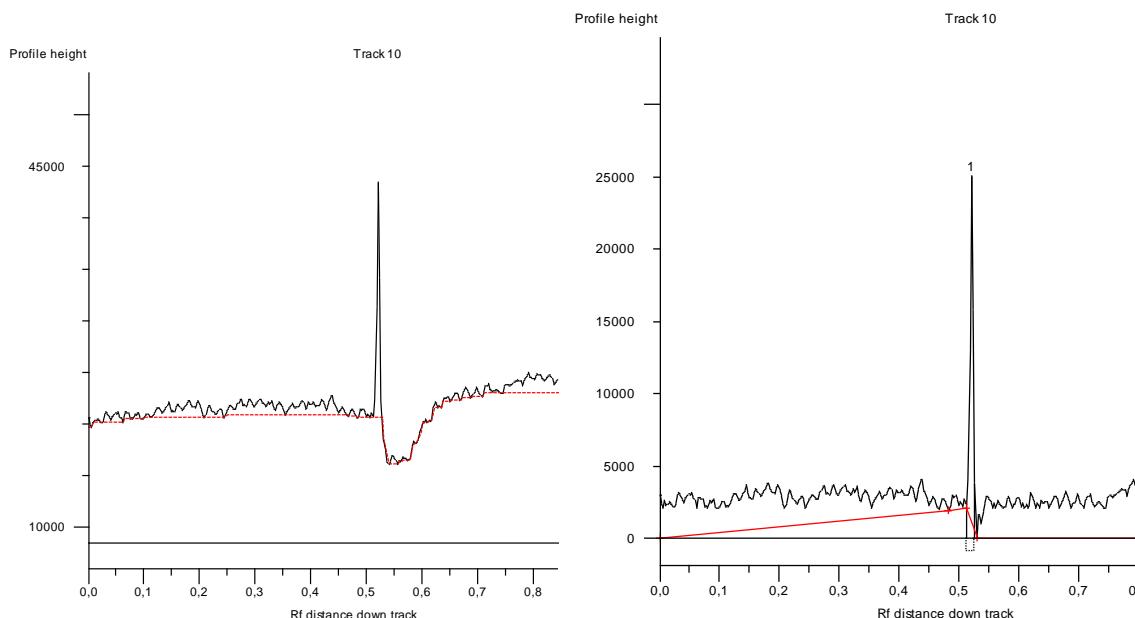
Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	6740,797	712415,25	7,05

Track 9



Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	7947,490	862216,94	10,17

Track 10



Number	Mol. weight	Height	Raw vol.	Quantity
1	0,00	23976,453	2635783,75	47,15

Molecular weight calibration details

Curve type	Log piecewise linear
Distance measurement	From Rf baseline
Propagation method	Interpolate between standards

No molecular weight standards are defined !

Quantity calibration details

Curve type	Linear (multiple standard values)
Calibrate	All tracks to a single curve
Units	

