

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Dejan PAVLIN

**POSTOPEK PRIPRAVE CELIC BAKTERIJ
RHODOCOCCUS SP. Z VISOKO ZMOŽNOSTJO
KETOREDUKCIJE INTERMEDIATOV EZETIMIBA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Dejan PAVLIN

**POSTOPEK PRIPRAVE CELIC BAKTERIJ *RHODOCOCCUS SP.* Z
VISOKO ZMOŽNOSTJO KETOREDUKCIJE INTERMEDIATOV
EZETIMIBA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION OF *RHODOCOCCUS SP.* CELLS WITH HIGH
KETOREDUCTION POTENTIAL OF EZETIMIBE
INTERMEDIATES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo v tovarni zdravil Krka d.d., Novo mesto, Sektor za razvoj in raziskave, Oddelek za biokemijo, pod delovnim mentorstvom dr. Aleša Gaspariča.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 12.7.2010 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar in za somentorja dr. Aleša Gaspariča. Za recenzenta je študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije izbrala prof. dr. Toma Turka.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Aleš GASPARIČ
 Tovarna zdravil Krka d.d., Novo mesto

Član: prof. dr. Tom TURK
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Dejan PAVLIN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579(043.2)=163.6
KG mikrobiologija/bakterije/*Rhodococcus* sp./celice/priprava/ketoredukcija/ezetimib
AV PAVLIN, Dejan
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/GASPARIČ, Aleš (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2010
IN POSTOPEK PRIPRAVE CELIC BAKTERIJ *RHODOCOCCUS* SP. Z VISOKO
ZMOŽNOSTJO KETOREDUKCIJE INTERMEDIATOV EZETIMIBA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 53 str., 12 pregl., 17 sl., 41 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Mikroorganizme, ki izražajo ketoreduktazno delovanje lahko uporabimo v industriji za sintezo optično aktivnih alkoholov iz ustreznega ketona ali s stereospecifično redukcijo aldehidnega racemata. V našem primeru smo izboljšali postopek redukcije EBK1 v EBZ2 ter poiskali nov, patentno neodvisen mikroorganizem, ki je reduciral keto-skupino intermediata ezetimiba EBK1 v EBZ2. Glede na rezultate poskusov redukcije EBK1, navedene v patentnih prijavi WO 2009/032264 A1, smo stopnjo redukcije izboljšali osemkrat ter poleg znane bakterije *Rhodococcus fascians* (DSM 20669), našli drug mikroorganizem, ki reducira EBK1 v EBZ2 - bakterijo *Rhodococcus rhodochrous* (DSM 43302). Le-ta reducira EBK1 v EBZ2 z visokim izkoristkom (82,5%). Uporabili smo rastoče in mirujoče celice. Konverzija je bila sicer boljša pri rastočih celicah, vendar smo se v nadaljevanju raziskave osredotočili predvsem v izboljšanje konverzije EBK1 v EBZ2 z mirujočimi celicami. Uporaba mirujočih celic ima veliko prednosti, kot je na primer manjša zahtevnost dela, zmanjšanje možnosti kontaminacij med procesom biotransformacije, možnost natančnega doziranja svežih mirujočih celic z znano aktivnostjo v reakcijsko zmes. Celice obeh vrst *Rhodococcus* smo obdelali na različne načine, da bi povečali permeabilnost ter s tem omogočili lažji prehod substrata skozi celično membrano. Obdelali smo jih s toluenom, s tritonom X-100 ter z ultrazvokom. S povečanjem prehodnosti membrane pa nismo izboljšali redukcije, saj smo z obdelavo celic žal tudi uničili njihov sistem za regeneracijo kofaktorjev NADH in NADPH, potrebnih za delovanje ketoreduktaz.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579(043.2)=163.6
CX microbiology/bacteria/*Rhodococcus* sp./cells/preparation/keto reduction/ezetimibe
AU PAVLIN, Dejan
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/GASPARIČ, Aleš (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2010
TI PREPARATION OF *RHODOCOCCUS* SP. CELLS WITH HIGH KETOREDUCTION POTENTIAL OF EZETIMIBE INTERMEDIATES
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 53 p., 12 tab., 17 fig., 41 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Microorganisms with ketoreductive activity can be used in industry for synthesis of optically active alcohols from the corresponding ketone or by stereospecific reduction of corresponding racemic aldehyde substrate. In our experiment, we improved reduction and found, patent independent microorganism with high ketoreductive activity on the ezetimibe intermediate EBK1. According to patent WO 2009/032264 A1, we improved reduction 8-times and found, beside known *Rhodococcus fascians* (DSM 20669), bacteria *Rhodococcus rhodochrous* (DSM 43302) which reduces EBK1 into EBK2 with high efficiency (82,5%). We applied growing and resting cells in our experiments. Conversion with growing cells was better, but we focused to improve conversion on resting cells, because resting cells have many advantages, like less difficult work, reduction of contamination during biotransformation process, possibility of adding fresh resting cells into reaction mixture, etc. Both *Rhodococcus* cells were treated with toluene, triton X-100 and ultrasonic device, for easier passage of substrate through cell membrane. In our experiment, we were not able to improve conversion with mechanical and chemical treatment, because we disabled cell system for regeneration of cofactors NADH and NADPH, necessary for active keto reductase.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KETOREDUKTAZE	3
2.2 NADH TER NADPH	4
2.2.1 Funkcija NAD⁺ ter NADP⁺	4
2.3 REGENERACIJA KOFAKTORJEV	5
2.3.1 Encimski načini regeneracije reduciranih nikotinamidnih kofaktorjev	7
2.3.1.1 Format dehidrogenaza (FDH)	7
2.3.1.2 Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-P-DH)	7
2.3.1.3 Glukozna dehidrogenaza (GDH)	8
2.3.1.4 Alkohol dehidrogenaza (ADH)	8
2.3.1.5 Hidrogenaza	8
2.3.1.6 Fosfonat dehidrogenaza (PTDH)	8
2.3.1.7 Laktat dehidrogenaza (LDH)	9
2.3.2 Encimski načini regeneracije oksidiranih nikotinamidnih kofaktorjev	9
2.3.2.1 Glutamat dehidrogenaza (GluDH)	9
2.3.2.2 L-laktat dehidrogenaza (L-LDH)	10
2.3.2.3 Alkohol dehidrogenaza (ADH)	10
2.4 MIKROBNE CELICE KOT KATALIZATORJI ZA REDOKS REAKCIJE	10
2.4.1 Splošni pregled	10
2.4.1.1 Odkritje novih biokatalizatorjev, optimizacija in razvoj celih celic za redoks reakcije	11
2.4.1.2 Odkritje biokatalizatorjev	11
2.4.1.3 Encimska ekspresija v organizmu divjega tipa – mikrobnna fermentacija	11
2.5 TOKSIČNOSTI TOPIL ZA PROIZVODNE CELICE	12
2.6 CELICE V ORGANSKEM MEDIJU	12
2.6.1 Encimi in organska topila	13
2.6.2 Inaktivacija encima z organskimi topili	14
2.6.2.1 Sprememba konformacije encima	14

2.6.2.2 Zmanjšanje konformacijske fleksibilnosti	14
2.6.2.3 Izguba vodnega sloja	15
2.6.2.4 Termodinamska stabilnost substrata	15
2.6.2.5 Medfazna inaktivacija	15
2.7 POVEČANJE REDUKCIJE Z ZMANJŠANJEM PERMEABILNOSTI MEMBRANE	15
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Kemikalije in mikrobne kulture	18
3.1.2 Raztopine	19
3.1.3 Gojišča	19
3.1.3.1 Gojišče GYM <i>Streptomyces</i>	19
3.1.3.2 Universal medium for yeast (YM)	20
3.1.3.3 Industrijsko gojišče 11 (IG11)	20
3.1.3.4 Gojišče YPD	21
3.1.4 Laboratorijske aparature	22
3.2 POTEK DELA	23
3.3 METODE	24
3.3.1 Rehidracija liofiliziranih mikrobnih kultur	24
3.3.2 Revitalizacija mikrobnih sevov	24
3.3.3 Cilji poskusov	25
3.3.3.1 Rastoče celice	25
3.3.3.2 Mirujoče celice	25
3.3.4 Testiranje uspešnosti konverzije EBK1 v BZ2 z mirujočimi celicami	25
3.3.5 Testiranje uspešnosti konverzije z rastočimi celicami v tekočih gojiščih	26
3.3.6 Spremljanje konverzije EBK1 v EBZ2 s TLC	26
3.3.6.1 Priprava vzorca za TLC	27
3.3.6.2 Mobilna in stacionarna faza	27
3.3.6.3 Priprava standardnih raztopin	27
3.3.7 Nacepitev <i>R. rhodochrous</i> (43302) ter <i>R. fascians</i> (20669) na trdo YM gojišče	27
3.3.8 Priprava inokuluma <i>R. rhodochrous</i> (43302) ter <i>R. fascians</i> (20669) za bioreaktor	28
3.3.9 Postavitev reaktorja za namnožitev celic	28
3.3.10 Prekinitev rasti celic <i>R. rhodochrous</i> (43302) in <i>R. fascians</i> (20669) ter priprava mirujočih celic	29
3.3.10.1 Priprava substrata EBK1 v DMSO	31
3.3.11 Spremljanje ketoredukcije s TLC	31
3.3.12 Vzorčenje za HPLC intermediatov ezetimiba ter dodatek celic	31
3.3.13 Priprava odvzetih vzorcev za HPLC intermediatov ezetimiba	32

3.3.14 Izračun odstotka konverzije EBK1 v EBZ2 glede na rezultate analize HPLC	33
4 REZULTATI	34
4.1 RAST <i>R. RHODOCHROUS</i> (43302) IN <i>R. FASCIANS</i> (20669) NA TRDNEM GOJIŠČU	34
4.2 REZULTATI TESTA Z MIRUJOČIMI CELICAMI PRI RAZLIČNIH MIKROBNIH KULTURAH	34
4.2.1 Pozitivna ketoredukcija EBK1 v EBZ2 pri mirujočih celicah iz gojišča IG11	35
4.2.2 Pozitivna ketoredukcija EBK1 v EBZ2 pri mirujočih celicah iz gojišča YPD	35
4.3 REZULTATI TESTA NA RASTOČIH CELICAH PRI RAZLIČNIH MIKROBNIH KULTURAH	35
4.4 KONVERZIJA EBK1 V EBZ2 PRI MIRUJOČIH CELICAH NAMNOŽENIH V BIOREAKTORJU	37
4.4.1 Rezultati TLC konverzije EBK1 v EBZ2 pri različno obdelanih mirujočih celicah	37
4.4.2 Rezultati analize HPLC	39
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1 RAZPRAVA	43
5.2 SKLEPI	48
6 POVZETEK	49
7 VIRI	51
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Glavne prednosti ter slabosti uporabe encimov v organskih topilih	14
Preglednica 2: Sestava gojišča GYM <i>Streptomyces</i>	19
Preglednica 3: Sestava gojišča YM	20
Preglednica 4: Sestava gojišča IG11	20
Preglednica 5: Sestava gojišča YPD	21
Preglednica 6: Uporaba gojišč za posamezni sev	24
Preglednica 7: Oznaka stekleničk ter shema odvzemanja vzorcev za HPLC analizo intermediatov ezetimiba	32
Preglednica 8: Pozitivna ketoredukcija EBK1 v EBZ2 v dveh različnih gojiščih pri testu na mirujočih celicah	35
Preglednica 9: Pozitivna ketoredukcija EBK1 v EBZ2 z <i>R. rhodochrous</i> (43302) v različnih gojiščih	36
Preglednica 10: Količina EBZ2 glede na standardno raztopino EBZ2 (10 g/l) pri vzorcih mirujočih in rastočih celic po 95 urah stresanja	37
Preglednica 11: Količina EBZ2 glede na standardno raztopino EBZ2 (10 g/l) pri vzorcih mirujočih in rastočih celic po 119 urah stresanja	38
Preglednica 12: Pregled ketoredukcije EBK1 v EBZ2 na HPLC pri dveh različnih sevih ter različnem času	40

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Primer uporabe KRED; primer redukcije 2-,6-dikloro-3-fluoroacetofenona v (S)-1-[2,6-dikloro-3-fluorofenil]-etanol	3
Slika 2: Rossmannova struktura v delu laktakt dehidrogenaze iz <i>Cryptosporidium parvum</i>	5
Slika 3: Redukcija NAD(P) ⁺ v aktivno obliko 1,4-dihidropiridin	6
Slika 4: Dva glavna načina encimske regeneracije nikotinamidnih kofaktorjev	7
Slika 5: Producija 12-ketokenodeoksiholične kisline iz holične kisline, katalizirano z 12 α -hidroksisteroid dehidrogenazo z uporabo GluDH kot regenerator kofaktorjev	9
Slika 6: Membrana po Gramu negativnih bakterij (a); lipopolisaharidna struktura (b)	17
Slika 7: Shema poteka praktičnega dela diplomske naloge	23
Slika 8: Prikaz uporabe TLC-plošče v kadički s topilom	26
Slika 9: Laboratorijska reaktorja Biostat B-DCU (prostornina 2000 ml)	29
Slika 10: <i>R. rhodochrous</i> (43302) (levo) ter <i>R. fascians</i> (20669) (desno) slikana po 7 dneh inkubacije pri 28°C, redčitev 10 ⁻⁴	34
Slika 11: Konverzije EBK1 v EBZ2 pri <i>R. rhodochrous</i> (43302) v gojišču YPD ter IG11	36
Slika 12: Rezultati TLC vzorcev <i>R. rhodochrous</i> (43302) in <i>R. fascians</i> (20669) z dodanim EBK1 kot substratom (1g/l) po 95 urah na stresalniku	38
Slika 13: Rezultati TLC vzorcev <i>R. rhodochrous</i> (43302) in <i>R. fascians</i> (20669) z dodanim EBK1 kot substratom (1g/l) po 119 urah na stresalniku	39
Slika 14: Konverzija EBK1 v EBZ2 z mirujočimi in rastočimi celicami <i>R. rhodochrous</i> (43302) po 96 in 120 urah stresanja	40
Slika 15: Konverzija EBK1 v EBZ2 z mirujočimi in rastočimi celicami <i>R. fascians</i> (20669) pri različnih obdelovah po 96 in 120 urah stresanja	41
Slika 16: Konverzija EBK1 v EBZ2 z mirujočimi in rastočimi celicami obeh sevov <i>Rhodoccocus</i> pri različnih obdelovah in po 96 urah stresanja	41
Slika 17: Konverzija EBK1 v EBZ2 z mirujočimi in rastočimi celicami obeh sevov <i>Rhodoccocus</i> pri različnih obdelovah in po 120 urah stresanja	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADH	alkohol dehidrogenaza
dH ₂ O	destilirana voda
ddH ₂ O	destilirana in demineralizirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DSMZ	Nemška zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur
EBK1	(3r,4s)-4-(4-(benziloksi)fenil)-1-(4-fluorofenil)-3-(3-(4-fluorofenil)-3-oksopropil)azetidin-2-on
EBZ2	(3r,4s)-4-(4-(benziloksi)fenil)-1-(4-fluorofenil)-3-((s)-3-(4-fluorofenill)-3-hidroksopropill)azetidin-2-on
EDTA	eten diamin tetraacetna kislina
FADH ₂	flavin adenin dinukleotid
FDH	format dehidrogenaza
FMN	flavin mononukleotid
G-6-P-DH	glukoza -6- fosfat dehidrogenaza
GDH	glukoza dehidrogenaza
GluDH	glutamat dehidrogenaza
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
IG	industrijsko gojišče
LDH	laktat dehidrogenaza
L-LDH	L-laktat dehidrogenaza
MC	mirujoče celice
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NAD+	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADP+	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
PON	čas v urah po inokulaciji
PTDH	fosfit dehidrogenaza
rpm	obrati na minuto
TBADH	alkohol dehidrogenaza iz <i>Thermoanaerobacter brockii</i>
TLC	tankoplastna kromatografija
Tris	hidroksimetil aminoetan
UV	ultra-vijolična svetloba
YPD	gojišče sestavljeni iz kvasnega ekstrakta, peptona ter glukoze

1 UVOD

Biokemiki ter mikrobiologi že dolgo vidijo biokatalizo kot zelo pomembno vejo kemijske sinteze, vendar se ta še ni dobro zakoreninila v industriji.

Delo v zadnjih desetletjih je pokazalo, da je zelo malo ovir v uporabi encimov ali celih celic kot biokatalizatorjev v organski kemiji. Izolirani encimi se po navadi uporablajo za hidrolizne ali izomerizacijske reakcije. Celice pa se po navadi uporABLJajo za sintezne reakcije, ki potrebujejo regeneracijo kofaktorjev, saj je le to cenejše in lažje kot *in vitro* regeneracija.

Encimi so zanimivi katalizatorji. Za substrat lahko sprejmejo veliko različnih kompleksnih molekul ter jih specifično katalizirajo s kiralno (enantio-) in pozicijsko (regio-) selektivnostjo. Biokatalizatorji se lahko uporABLJajo v preprostih in kompleksnih transformacijah brez dolgotrajnih korakov, ki so prisotni v enantio- ter regio-selektivni organski sintezi. Taka visoka selektivnost tudi ponuja reakcije z visokim izkoristkom brez stranskih produktov, zato so encimi naravi prijazna alternativa običajnim kemijskim katalizam.

V večini današnjih encimskih procesov dosegamo visoke izkoristke in produktivnost, ni neželenih stranskih produktov, pri tem pa uporABLJamo cenene kofaktorje in koencime. V prihodnosti ne bo omejitev v tehnologiji ali naravi substrata ter produkta. Potrebujemo pa nove biokatalitske procese ter čim več različnih, novih encimov. Uporaba encimov za industrijske biotransformacije bo rasla zelo hitro.

Vse encimske reakcije, za katere potrebujemo kofaktorje, kot sta npr. NADH ali NADPH, so praviloma zelo drage, ker potrebujejo sistem za regeneracijo kofaktorjev. Neprimerno cenejša je uporaba živih - rastočih ali mirujočih celic. Žive celice imajo samostojne sisteme za regeneracijo kofaktorjev, zato ne potrebujemo dragih sistemov za njihovo regeneracijo.

Z znanjem mikrobioloških tehnik in poznavanjem principov delovanja encimskih sistemov lahko izboljšamo specifičen potencial mikrobnih celic, in sicer z:

- indukcijo specifičnih encimskih sistemov (s substratom ali homologi),
- izboljšano rastjo – kondicijo celične populacije (z reguliranjem fizikalno-kemijskih razmer, sestavo gojišča, načinom vodenja) in s tem višji potencial za nujno regeneracijo kofaktorjev,
- kontinuirnem dohranjevanjem rastočih celic, oziroma dodajanje svežih mirujočih celic v reakcijsko zmes,
- višanjem odpornosti celic proti reagentom in/ali produktom (mutacije, rekombinacije, selekcije).

1.1 NAMEN DELA

1. Izboljšati pretvorbo substrata v proizvod z višjimi izkoristki, kot jih navajajo avtorji patentne prijave WO 2009/032264 A1.
2. Najti patentno neodvisen organizem za pretvorbo substrata EBK1 ((3r,4s)-4-(4-(benziloksi)fenil)-1-(4-fluorofenil)-3-(3-(4-fluorofenil)-3-oksopropil)azetidin-2-on) v EBZ2 ((3r,4s)-4-(4-(benziloksi)fenil)-1-(4-fluorofenil)-3-((s)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksopropil)azetidin-2-on).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Biotransformacija EBK1 v EBZ2 je mogoča tudi z drugimi mikroorganizmi, kot so našteti v patentu WO 2009/032264 A1,
- Biotransformacija je mogoča v tekočem gojišču in z mirujočimi celicami,
- Mirujoče celice lahko obdelamo tako, da so zmožne boljše konverzije EBK1 v EBZ2.

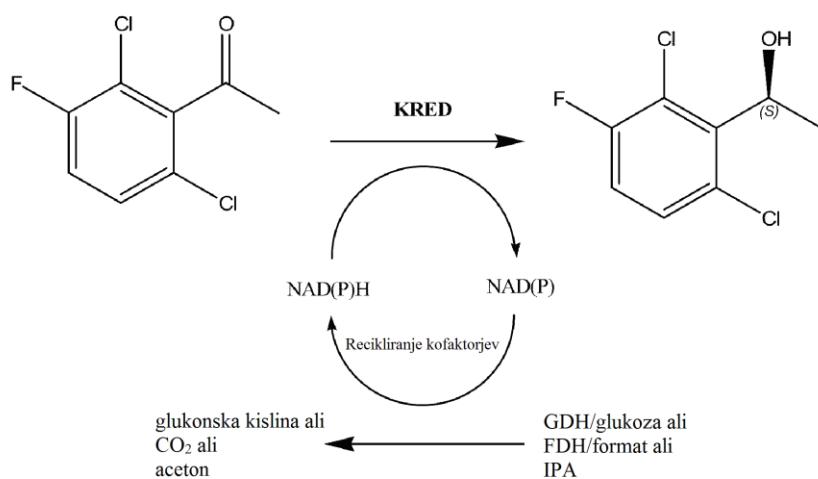
2 PREGLED OBJAV

2.1 KETOREDUKTAZE

Encimi, ki ustrezajo skupini ketoreduktaz (KRED) ali skupini karbonilnih reduktaz (EC 1.1.1.184) so uporabni za sintezo optično aktivnih alkoholov iz ustreznega prostereoizomernega ketona ali s stereospecifično redukcijo aldehidnega racemata (Liang in sod., 2009).

Ketoreduktaze tipično pretvorijo ketone in aldehyde v ustrezen alkohol, vendar so zmožni tudi obratne pretvorbe, oksidacije alkohola v ustrezen keton ali aldehid. Pri redukciji ketonov in aldehidov ter oksidaciji alkoholov s ketoreduktazami so potrebni kofaktorji. Najpogosteje so za redukcijo potreben reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), za oksidacijo pa nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) ter nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP^+) (Liang in sod., 2009).

NADH ter NADPH se rabita kot donorja elektronov, medtem ko NAD^+ ter NADP^+ kot akceptorja elektronov. Znano je, da uporabljajo ketoreduktaze ter alkohol dehidrogenaze za kofaktor bodisi fosforiliran bodisi nefosforiliran kofaktor (v oksidiranem ali reduciranim stanju), vendar nikoli obe. Ketoreduktaze so bile odkrite v številnih bakterijah in kvasovkah (Drauz in Waldmann, 1995).



Slika 1: Primer uporabe KRED; primer redukcije 2,6-dikloro-3-fluoroacetofenona v (S)-1-[2,6-dikloro-3-fluorofenil]-etanol (Liang in sod., 2009)

Da bi se izognili mnogim kemijskim sintetičnim postopkom za proizvodnjo uporabnih substratov, se je uporaba ketoreduktaz močno povečala pri encimski konverziji različnih ketonov in aldehidov v kiralne alkohole (Liang in sod., 2009).

Tako lahko uporabljam celice, ki izražajo ketoreduktaze za konverzijo ketonov ter aldehidov, ali pa uporabljam izolirane čiste encime v primerih, ko bi lahko različne ketoreduktaze v celicah spremenile potek redukcije tako, da bi se zmanjšala izkoristek in sterična čistost želenega produkta (Liang in sod., 2009).

2.2 NADH TER NADPH

Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) je aktivna biokemična oblika vitamina B3. Najdemo ga v vsaki živi celici in je ključen za produkcijo energije. Glavna sestavina je dinukleotid, ki je sestavljen iz dveh nukleotidov, združenih s fosfatnima skupinama. En nukleotid vsebuje adenin, drugi pa nikotinamid (NADH, 2004-2008).

Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) in nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP^+) sta pomembna koencima v celicah. NADH je reducirana oblika in NAD^+ oksidirana oblika NAD^+ . NAD je koencim pridobljen iz vitamina niacina. Pomemben je kot prenašalec vodika in niha med oksidiranim in reduciranim stanjem. Sorodna spojina, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirana oblika je NADP^+), ima dodatno fosfatno skupino in je pomemben pri fotosintezi. Prenašanja elektronov in protonov je glavna funkcija NAD^+ . Poleg tega pa se uporablja tudi v drugih celičnih procesih kot substrat encimov, ki dodajo ali odvzamejo kemijske skupine (dodatek funkcionalnih skupin ali odstranitev aminokislin) proteinom v post-translacijskih modifikacijah. Zaradi pomembnosti teh funkcij so encimi, ki sodelujejo v metabolizmu NAD^+ , tarča za nova zdravila (NADH, 2004-2008).

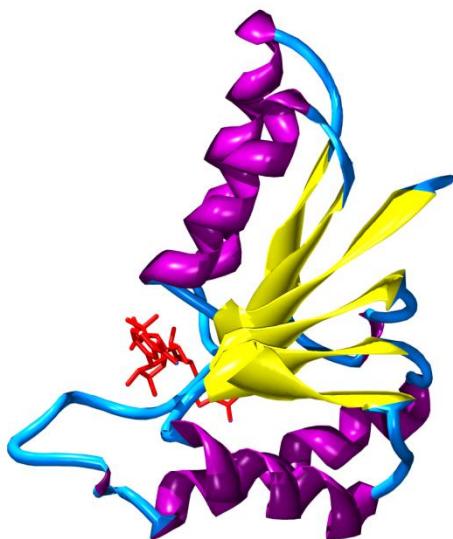
2.2.1 Funkcija NAD^+ ter NADP^+

NAD^+ ima več pomembnih nalog v metabolizmu. Deluje kot koencim v redoks reakcijah, kot donor ATP-riboze v ATP ribozilaciji, kot prekurzor sekundarne sporočevalne molekule ciklične ADP-riboze, ter tudi kot substrat za bakterijsko DNA ligazo (NADH, 2004-2008).

Glavna vloga NAD^+ v metabolizmu je prenos elektronov iz ene molekule na drugo. Reakcije takega tipa katalizirajo oksidoreduktaze. Ko je NAD^+ ali NADH pripel na protein

ga z njim povezuje Rossmannova strukturo (slika 2). Ker vsaka Rossmannova struktura veže le en nukleotid, so vezavne domene za dinukleotid NAD⁺ sestavljene iz dveh Rossmannovih struktur (NADH, 2004-2008).

V splošnem, NADP⁺ sprejema elektrone iz kataboličnih reakcij, da tvori NADPH. Je končni produkt svetlobne reakcije fotosinteze v fotosistemu I. NADPH ima rahlo drugačno vlogo kot NADH, in sicer ne odda elektrona elektronski transportni verigi. NADPH reducira intermediate v anaboličnih poteh, na primer pri sintezi maščobnih kislin (NADH, 2004-2008).



Slika 2: Rossmannova struktura v delu laktakt dehidrogenaze iz *Cryptosporidium parvum*. NAD⁺ je obarvan rdeče, beta ravnine rumeno ter alfa heliksa vijolično (Senkovich in sod., 2005)

2.3 REGENERACIJA KOFAKTORJEV

Število industrijsko uporabnih encimov hitro raste. Encimska sinteza lahko poteka v milih reakcijskih razmerah, tako da se mnogi problemi kemijske sinteze, kot so izomerizacija in racemacija, zmanjšajo. Encimi so tudi visoko specifični in selektivni, predvsem za enantio-ali regijsko-selektivno vstavljanje funkcionalnih skupin (Weckbecker in sod., 2009).

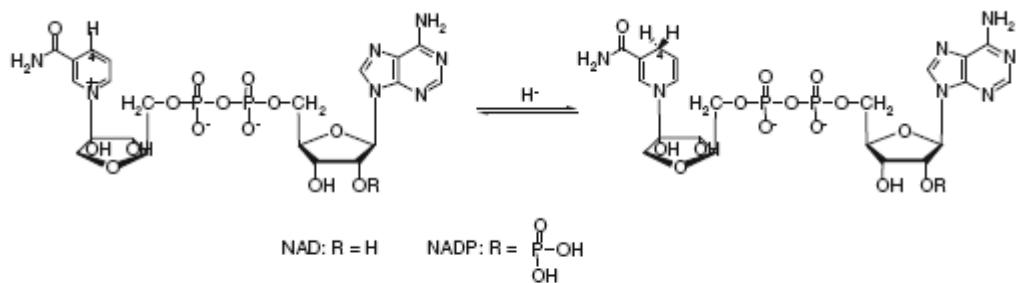
Veliko uporabnih encimov je odvisnih od kofaktorjev. Kofaktorji so nizkomolekularne spojine, ki so odgovorne, na primer, za prenos vodika, elektronov ali funkcionalnih skupin v encimsko kataliziranih reakcijah. Primeri kofaktorjev so FAD, koencim A ali nikotinamidna kofaktorja NAD⁺ in NADP⁺. Z razliko od FAD in FMN nista niti NAD⁺ niti NADP⁺ kovalentno vezana na encim. Koencimi so modificirani med reakcijo in so

spremenjeni stehiometrično. Predvsem NAD(P)⁺ odvisne oksidoreduktaze, ki katalizirajo redoks reakcije, so zelo zanimive za industrijske procese. Zanimive so za sintezo gradbenih elementov za fine kemikalije in farmacevtske učinkovine (Weckbecker in sod., 2009).

Dehidrogenaze so uporabne pri kiralni sintezi. Ti encimi, ki ustrezajo razredu oksidoreduktaz, katalizirajo prenos vodika iz ene spojine na drugo, predvsem na NAD(P)⁺ (Weckbecker in sod., 2009).

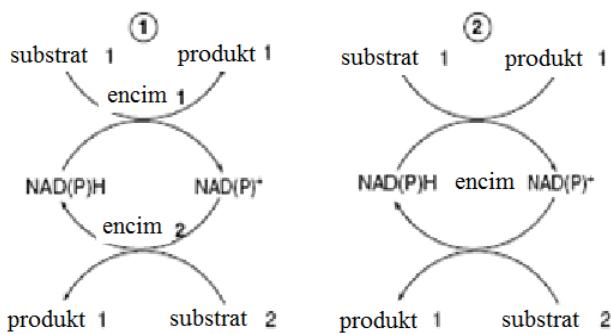
Zaradi visoke cene koencimov je njihova uporaba neprimerna. Za industrijsko uporabo je potrebna regeneracija kofaktorjev *in situ*. Zato je veliko raziskav usmerjenih prav na to področje (Weckbecker in sod., 2009).

Regeneracija nikotinamidnih kofaktorjev se lahko izvrši na več načinov, predvsem encimsko pa tudi kemično, fotokemično ali elektrokemično. Da bi se to zgodilo, mora biti izpolnjenih več pogojev. Metoda regeneracije mora biti praktična, poceni in stabilna dolgo časa. Produkti se morajo ločiti brez velikega napora. Encimi in reagenti morajo biti na zalogi ali komercialno dostopni. Zahtevana oprema mora biti na voljo. Ne sme priti do neželenih reakcij s produktom. Nastajanje produkta mora biti termodinamično, kakor tudi kinetično zadostno. Redukcija kofaktorja NAD(P)⁺ mora biti regioselektivna, drugače pride do deloma inaktivne oblike kofaktorja. Redukcija NAD(P)⁺ lahko vodi do nastanka 1,4-dihidropiridina in do 1,6-dihidropiridina. Samo 1,4-dihidropiridin pa je aktiva oblika (Slika 3) (Weckbecker in sod., 2009).



Slika 3: Redukcija NAD(P)⁺ v aktivno obliko 1,4-dihidropiridin (Weckbecker in sod., 2009)

Encimski načini regeneracije nikotinamidnih kofaktorjev so najbolj raziskani. Kažejo visoko selektivnost za produkcijo aktivne oblike kofaktorja. Druge prednosti encimskega načina regeneracije so visoka kompatibilnost z drugimi reagenti in možnost, da lahko encimsko delovanje zlahka spremljamo. Poznamo dva glavna načina encimske regeneracije nikotinamidnih kofaktorjev (Slika 4) (Weckbecker in sod., 2009).



Slika 4: Dva glavna načina encimske regeneracije nikotinamidnih kofaktorjev (Weckbecker in sod., 2009)

Pri prvem načinu je za regeneracijo potreben sekundarni encim kakor tudi sekundarni substrat. Pri drugi metodi, pa je za formacijo želenega produkta ter tudi za regeneracijo kofaktorja potreben samo en encim (Weckbecker in sod., 2009).

2.3.1 Encimski načini regeneracije reduciranih nikotinamidnih kofaktorjev

2.3.1.1 Format dehidrogenaza (FDH)

Format dehidrogenaza (FDH, EC 1.2.1.2) katalizira oksidacijo formata do ogljikovega dioksida, pri tem pa se NAD^+ reducira v NADH. Glavna prednost je ireverzibilnost reakcije. Sproščeni ogljikov dioksid je kemijsko inerten in se ga zlahka odstrani. Poleg tega je format zelo poceni substrat in neškodljiv za večino encimov. Format dehidrogenaza je tudi komercialno dostopna. V večini primerov je uporabljena FDH za regeneracijo NADH izražena iz *Candida boidinii*. Kljub nekaterim dobrim lastnostim, pa je nizka aktivnost tega encima (4-6 U/mg) velika slabost. Encim ima pH optimum delovanja med 7.5 in 8.5, medtem ko je optimalna temperatura delovanja 55°C (Weckbecker in sod., 2009).

2.3.1.2 Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-P-DH)

Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-P-DH) katalizira oksidacijo d-glukoze-6-fosfata v d-gluko-1,5-lakton-6-fosfat s simultano redukcijo NAD(P)^+ . Do sedaj so encim izolirali iz velikega števila živali, rastlin in mikrobov. Ena skupina encimov je NADP^+ specifična, druga je NAD^+ specifična, tretja skupina ni specifična. Zaradi hitre hidrolize formiranega glukono-1,5-lakton-6-fosfata v 6-fosfoglukonat reakcija poteka ireverzibilno (Weckbecker in sod., 2009).

Slaba lastnost reakcije je, da je mnoge substrate težko ločiti od 6-fosfoglukonata in tudi glukoza-6-fosfat kot substrat je dokaj draga. Zato je zaradi lažje dostopnosti glukoza-6-sulfat alternativa glukozi-6-fosfatu (Weckbecker in sod., 2009).

2.3.1.3 Glukozna dehidrogenaza (GDH)

Glukozna dehidrogenaza (GDH) je uporaben encim za konverzijo β -d-glukoze v d-glukono-1,5-lakton. Formiran lakton se hitro pretvori v ustrezeno kislino. GDH-ji iz *Bacillus subtilis* in *Bacillus megaterium* so dobro opisani. Biokemijske lastnosti so zelo podobne in primerjava primarne strukture kaže 85% ujemanje. GDH se uporablja tudi za regeneracijo NADH (Weckbecker in sod., 2009).

2.3.1.4 Alkohol dehidrogenaza (ADH)

Alkohol dehidrogenaza (ADH) katalizira oksidacijo alkohola v keton s simultano redukcijo NAD(P)^+ . Zaradi reverzibilnosti te reakcije se lahko reakcije, ki jih katalizira ADH, uporablajo tudi za sintezo (kiralnih) spojin, ali za regeneracijo koencima (Weckbecker in sod., 2009).

2.3.1.5 Hidrogenaza

Encim hidrogenaza (EC 1.12.1.2) lahko reducira akceptorje elektronov z molekularnim vodikom. Ko se hidrogenazo uporablja za regeneracijo kofaktorjev, se lahko NADH regenerira direktno z molekularnim vodikom (enačba 1). Hidrogenaze so izolirali iz različnih mikrobov. Zaradi visokega reduksijskega potenciala, poceni substrata H_2 in lahke izolacije produkta so hidrogenaze primerni encimi za uporabo pri regeneraciji (Weckbecker in sod., 2009).



2.3.1.6 Fosfonat dehidrogenaza (PTDH)

Fosfonat dehidrogenaza (PTDH) predstavlja še eno metodo za regeneracijo reduciranih nikotinamidnih koencimov. Ta encim so izolirali iz bakterije *Pseudomonas stutzeri*. Encim katalizira irreverzibilno oksidacijo fosfonata v fosfat s sočasno redukcijo NAD^+ v NADH

(enačba 2). Prednosti te metode so uporaba poceni substrata fosfita, formacija fosfata kot produkta ter ugodna ravnovesna konstanta (Weckbecker in sod., 2009).



2.3.1.7 Laktat dehidrogenaza (LDH)

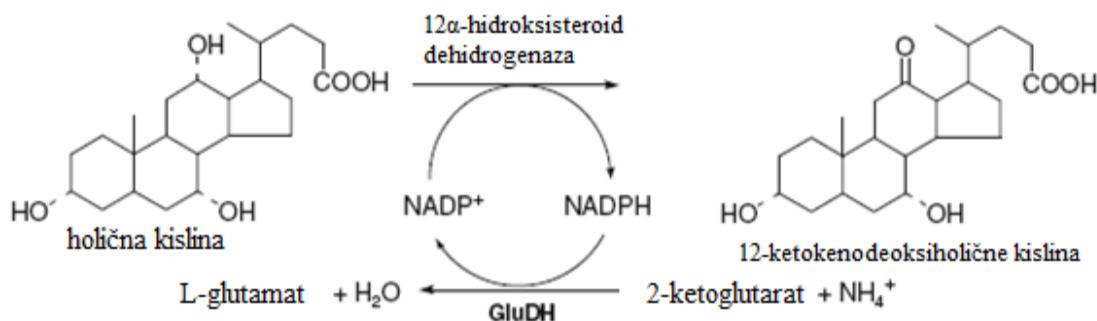
Za regeneracijo nikotinamidnih koencimov se lahko uporablja tudi laktat dehidrogenaza (LDH). Čeprav ravnovesje reakcije sili v formacijo laktata ali NAD⁺, pa se lahko izvrši tudi regeneracija NADH ob presežku laktata (Weckbecker in sod., 2009).

2.3.2 Encimski načini regeneracije oksidiranih nikotinamidnih kofaktorjev

Do sedaj ni bilo odkritih veliko metod za regeneracijo oksidiranih nikotinamidnih kofaktorjev. Poznane metode bodo predstavljene v nadaljevanju (Weckbecker in sod., 2009).

2.3.2.1 Glutamat dehidrogenaza (GluDH)

Sintezo L-glutamata iz amonija in α -ketoglutarata katalizira glutamat dehidrogenaza (GluDH). Komercialno dostopne GluDH so uporabili za regeneracijo NADP⁺ med pripravo 12-ketokenodeoksiholične kisline iz holične kisline z 12 α -hidroksisteroid dehidrogenazo (Slika 5) (Weckbecker in sod., 2009).



Slika 5: Producija 12-ketokenodeoksiholične kisline iz holične kisline, katalizirano z 12 α -hidroksisteroid dehidrogenazo z uporabo GluDH kot regenerator kofaktorjev (Weckbecker in sod., 2009)

2.3.2.2 L-laktat dehidrogenaza (L-LDH)

L-laktat dehidrogenaza (L-LDH, EC 1.1.1.27) katalizira redukcijo piruvata v (S)-laktat s sočasno oksidacijo NADH (enačba 3). L-LDH je prisotna v vseh višjih organizmih. Obstajajo dve vrsti L-LDH: prvi encimi so aktivirani s fruktozo 1,6-difosfatom, medtem ko je druga skupina neodvisna od aktivatorja (Weckbecker in sod., 2009).



2.3.2.3 Alkohol dehidrogenaza (ADH)

Sistem acetaldehid/ADH se pogosto uporablja za oksidacijo NADH. Večinoma se za to uporablja ADH iz konjskih jeter. Ta encim katalizira reverzno oksidacijo primarnih in sekundarnih alkoholov (Weckbecker in sod., 2009).

2.4 MIKROBNE CELICE KOT KATALIZATORJI ZA REDOKS REAKCIJE

2.4.1 Splošni pregled

Biotransformacije z uporabo prostih encimov kot biokatalizatorjev so popolnoma sprejeta in preverjena metodologija za pripravo homokiralnih spojin, ki se uporabljajo v farmacevtski, živilski, kozmetični ali agrokemični industriji. Kljub temu, da so možnosti uporabe celic kot biokatalizatorjev dobro poznane, pa je komercialna uporaba omejena na posebne primere, to je, ko mikroorganizem vsebuje ali encim pomemben za določen korak v sintezi ali ko je celica naravni proizvajalec koristne spojine. Kljub temu, napredek v presejalnih testih, metaboličnem inženiringu, genomiki, metabolomiki, proteomiki in usmerjeni evoluciji dajejo možnosti za izdelavo mikroorganizmov za industrijsko uporabo. Ta napredek favorizira uporabo celic kot biokatalizatorjev v industriji, oziroma tako imenovano belo biotehnologijo (Carballeira in sod., 2009).

Kakor je definirano v Evropski zvezi za bioindustrijo (Europabio), je bela biotehnologija napredna smer, ki pomaga moderni biotehnologiji. Uporablja žive celice kot so plesni, kvasovke ali bakterije in tudi encime za proizvodnjo dobrin. Žive celice lahko uporabljamo takšne kot so, ali izboljšane, da delajo kot mikrobne tovarne za proizvodnjo encimov ali

drugih produktov. Bela biotehnologija lahko omogoča napredok v industriji in izboljša kvaliteto življenja porabnikom (Carballeira in sod., 2009).

2.4.1.1 Odkritje novih biokatalizatorjev, optimizacija in razvoj celih celic za redoks reakcije

Nabor biokatalizatorjev, sinteznega orodja za biokemike, se je v zadnjem desetletju zelo razširil. Razlog za to je, da pri biotransformacijah ni uporabe nevarnih spojin, oziroma je le-ta zelo majhna v primerjavi s tradicionalno kemično sintezo. Torej se lahko z uporabo encimov, mikroorganizmov divjega tipa ter rekombinantnih celic izognemo ne samo kemikalijam nevarnim za okolje, pač pa tudi nezaželenim stranskim reakcijam in produktom (Carballeira in sod., 2009).

2.4.1.2 Odkritje biokatalizatorjev

Pri iskanju boljših biokatalizatorjev se lahko raziskovalci obrnejo na različne vire: pregled mikrobnih zbirk ali naravnih vzorcev, klonske banke in geni, ki jih je odkrila metagenomika (Carballeira in sod., 2009).

V zadnjem letu so opisali okrog 150 z metagenomiko odkritih encimov, nekateri od njih so potencialni biokatalizatorji. Glede na literaturo (Beloqui in sod., 2008) so bile iz negojljivih mikroorganizmov (klonirani – izraženi geni) v industrijskem merilu na novo uporabljene samo esteraze (Michels in sod., 2007).

2.4.1.3 Encimska ekspresija v organizmu divjega tipa – mikrobnna fermentacija

Celice so zelo zanimive za katalizo reakcij z encimi, ki potrebujejo kofaktorje. Pretvarjajo lahko veliko različnih sintetičnih - nendaravnih substratov, vendar so pri tem odvisne skoraj izključno od svojih naravnih kofaktorjev, ki se rabijo kot prenašalci redoks ekvivalentov, NAD(P)H, FADH₂ in podobnih. Večina teh kofaktorjev je nestabilnih in zelo dragih za uporabo v večjih količinah (Faber, 2004). Prav tako *in vitro* regeneracija kofaktorjev za veliko proizvodnjo še ni dodelan proces, kljub že obstoječim metodam regeneracije, kot so elektrokemijske (Hollmann in sod., 2001), fotokemične (Taglieber in sod., 2008), encimske metode (Wykes in sod., 2004) in tudi organokovinske metode ter uporaba elektronskih mediatorjev, npr. direkten vir elektronov iz elektrod.

V nasprotju z naštetim, celice same skrbijo za naravno proizvodnjo in regeneracijo kofaktorjev. Dostopnost kofaktorjev vpliva na biotransformacijo (Bühler in sod., 2008).

Mikrobne celice lahko delajo kot rastoče celice, mirujoče celice kot liofilizirane celice ali kot imobilizirane celice, odvisno od zahtev določene reakcije. V glavnem uporabljamo mirujoče celice, saj je izolacija produkta lažja ter število stranskih produktov manjše kakor pri rastočih celicah. Imobilizirane celice lahko uporabimo večkrat, oziroma kontinuirano, pogosto tudi v kombinaciji z organskimi topili (Carballeira in sod., 2009).

2.5 TOKSIČNOSTI TOPIL ZA PROIZVODNE CELICE

Mehanizmi toksičnosti topil so slabo poznani, vendar na splošno velja, da se topilo vrine med membranske lipide, kar povzroči razpad esencialnih membranskih funkcij, inaktivacijo ali denaturacijo encimov vezanih na membrano, razpad transportnih mehanizmov in pri visoki koncentraciji topila, razpad celice (Doukyu in Ogino, 2010).

Topilo spremeni hidratacijo encima ter povzroči reverzibilno ali irreverzibilno denaturacijo encima ter s tem pogosto tudi inaktivacijo encimskega delovanja (Doukyu in Ogino, 2010).

Čeprav so mehanizmi tolerance živih celic na topila slabo poznani, pa veliko avtorjev opisuje različne prilagoditve membrane, predvsem spremembe v sestavi maščobnih kislin membranskih lipidov. Na splošno velja, da akumulacija lipofilne molekule v lipidni dvosloj povzroči spremembo v membranski fluidnosti. Mikroorganizmi reagirajo na prisotnost takih snovi tako, da poskušajo povrniti fluidnost membrane v prvotno stanje. Ta mehanizem se imenuje homeoviskozna adaptacija (Doukyu in Ogino, 2010).

2.6 CELICE V ORGANSKEM MEDIJU

Biotransformacije so poznane že iz časov Pasteurja, vendar so bile prve mikrobne transformacije, pomembne za industrijo, razvite za pretvorbe steroidov šele leta 1950. Od tistih časov smo kar nekaj klasičnih kemijskih procesov nadomestili z biokatalizo (León in sod., 1998).

Tehnologije, ki so omogočile razmah biokatalize, so bile obsežna izolacija encimov, imobilizacija encimov ter celic, tehnologije rekombinantne DNA ter razvoj dvofaznih

biokataliznih sistemov. Zadnji so večinoma sestavljeni iz vodne faze, ki vsebuje encime, in iz organske faze. Nekateri sistemi so dvofazni in sicer iz dveh polimernih raztopin, oziroma ene polimerne ter ene vodno-mineralne (León in sod., 1998).

Biokatalizo v organskih medijih so razvili zaradi slabe topnosti velikega števila organskih spojin v vodnih medijih. Če celice ali encimi tako okolje prenesejo, reakcije praviloma potekajo zelo učinkovito. Prednosti dvofaznega sistema voda/nepolarni medij so poleg boljše topnosti, pogosto tudi vzdrževanje majhne koncentracije toksičnih ali inhibitornih spojin v vodnem mediju in *in situ* pridobivanje produkta, kar zmanjša inhibicijo encimske reakcije in nastajanja proizvoda. Odkritje bakterijskega seva (*Pseudomonas putida*), ki raste ob prisotnosti organskega topila, pa je še povečalo razumevanje mehanizmov tolerance na toksičnost organskih topil ter možnosti za razvoj novih sistemov biokatalize (Inoue in Horikoshi, 1989; Lee in sod., 1993).

V dvofaznih sistemih je najpomembnejša izbira organske faze. Najpomembnejša kriterija za izbiro topila sta visok donos in biokompatibilnost. Sledijo pa kemična in termična stabilnost, majhna možnost za tvorbo emulzij z vodnim medijem, biološka stabilnost topila in nizka cena (León in sod., 1998).

2.6.1 Encimi in organska topila

Encimske reakcije v organskih topilih imajo torej svoje prednosti in pomanjkljivosti (Preglednica 1). Prednosti so: povečana topnost nepolarnega substrata, zmanjšan delež od vode odvisnih stranskih reakcij, menjava specifičnosti in enantioselektivnosti encima ter odprava mikrobne kontaminacije. Pomanjkljivosti pa so: večina encimov je manj aktivna ter stabilna v prisotnosti organskih topil (Doukyu in Ogino, 2010).

Zato so razvili številne metode za izboljšanje aktivnosti in/ali stabilnosti encimov v prisotnosti organskih topil: imobilizacijo encimov na netopen podporni matriks, kemijsko modifikacijo encimov, fizično modifikacijo encimov z lipidi ali surfaktanti, sidranje encima v reverzne micele ter spremenjanje encima z metodami molekularnega inženirstva (Doukyu in Ogino, 2010).

Preglednica 1: Glavne prednosti ter slabosti uporabe encimov v organskih topilih (Doukyu in Ogino, 2010)

Prednosti	Povečana topnost hidrofobnih substratov Kataliza mnogih reakcij, ki niso mogoča v vodnem mediju Termodinamski ravnotežja težijo raje k sintezi kakor hidrolizi Supresija stranskih reakcij odvisnih od vode Sprememba substratne-, regio- in stereo-specifičnosti Ponovna uporaba encima tudi brez imobilizacije Sprememba razmerja substrata/produkta: pomoč pri separaciji, izboljšan izkoristek Pogosto izboljšana termostabilnost Ni mikrobnih kontaminacij Potencial uporabe encima direktno v kemijskem procesu
Slabosti	Inaktivacija encima Zahtevna in draga priprava encimov (imobilizacija, spremenjanje, sidranje) Omejen masni transport v primeru heterogenega sistema ali viskoznega topila

2.6.2 Inaktivacija encima z organskimi topili

Povečanje količine organskega topila v reakcijski mešanici pogosto vodi do zmanjšanja encimske aktivnosti (Doukyu in Ogino, 2010).

2.6.2.1 Sprememba konformacije encima

V splošnem se terciarna struktura proteina v vodnem mediju pojavi zaradi tendence polarnih skupin proteina, da so na površini v stiku z vodo, in tendence nepolarnih skupin, da so »zakopane« v notranjosti proteina v hidrofobni sredici. Proteinsko strukturo ohranja zapleteno ravnotežje med hidrofobnimi interakcijami, elektrostatskimi interakcijami, Van der Waalsovimi silami ter vodikovimi vezmi. Do denaturacije proteina pride, ko se ravnovesje med navedenimi dejavniki poruši. V mediju, ki vsebuje organsko topilo, je encimska deaktivacija pogosto posledica porušitve hidrofobne sredice. Na splošno pa lahko polarna topila, če prodrejo v zgradbo proteina, povzročijo večje spremembe v konformaciji kakor nepolarna topila (Doukyu in Ogino, 2010).

2.6.2.2 Zmanjšanje konformacijske fleksibilnosti

Konformacijska fleksibilnost encima je znana kot kritična determinanta funkcije proteina. Encimi potrebujejo na površino vezano vodo, ki vzdržuje konformacijsko fleksibilnost in

encimsko aktivnost. Zato so encimi manj aktivni v brezvodnem mediju. Dodatek vode v brezvodni medij lahko zato močno poveča aktivnost encima (Doukyu in Ogino, 2010).

2.6.2.3 Izguba vodnega sloja

Kot je opisano zgoraj, je nekaj vode pomembne za vzdrževanje proteinske strukture in funkcije. Hidrofobna topila imajo v splošnem manjšo sposobnost odstranitve vodnega sloja okrog encima kakor hidrofilna topila. Zato so ponavadi hidrofobna topila bolj uporabna za spodbujanje encimske aktivnosti v brezvodnem mediju kakor hidrofilna (Doukyu in Ogino, 2010).

2.6.2.4 Termodinamska stabilnost substrata

Energija vezave substrata na encim je glavno vodilo za encimsko aktivnost. Da se substrat veže na encim, mora biti aktivni center encima »izpostavljen« (tudi če je v žlebu, gubi...). Mnogi encimi imajo hidrofobno aktivno mesto, ki energetsko favorizira približevanje in vezavo hidrofobnih substratov, na primer iz dvofaznega sistema. Ko pa vodo zamenja organsko topilo, je osnovno stanje hidrofobnega substrata termodinamsko stabilizirano v organskem topilu. Spremenjena termodinamika reakcijske mešanice povzroči zmanjšanje encimske aktivnosti (Doukyu in Ogino, 2010).

2.6.2.5 Medfazna inaktivacija

V dvofaznem sistemu, voda-organsko topilo, stik encima z organskim topilom lahko povzroči inaktivacijo encima. Dvofazne sisteme je zato potrebno močno mešati, da povečamo masni transfer med stiki. Pri tem pa lahko pride do neželenega učinka, in sicer denaturacije encima (Doukyu in Ogino, 2010).

2.7 POVEČANJE REDUKCIJE Z ZMANJŠANJEM PERMEABILNOSTI MEMBRANE

V primerjavi z izoliranimi encimi imajo celice veliko prednosti, ki so pomembne pri masovni proizvodnji (Duetz in sod., 2001; Faber, 1995). Uporaba celih celic ne zahteva nenehne, drage izolacije ter čiščenja proteinov. Ker encime varuje celična membrana, so encimi v splošnem bolj stabilni v celih celicah. Bolj zahtevne kemijske transformacije

zahtevajo zaporedne in sklopljene reakcije več encimov ali celo več encimatskih poti, kar je možno praviloma le z delajočimi oziroma živimi celicami. Iste reakcije niso možne *in vitro* z izoliranimi encimi. Tudi regeneracija kofaktorjev je veliko lažja v celicah. Biokataliza s celimi celicami ponavadi poteka veliko počasneje, kot z uporabo prostih encimov zaradi omejenega masnega transporta, ki je posledica nizke permeabilnosti celične membrane. Fontanille in Larroche (2003), ki sta v celicah katalizirala sintezo izonovala iz α -pinen oksida, sta poročala, da je difuzija skozi celično membrano omejujoča. Zato sta morala celice *Pseudomonas rhodesiae* permeabilizirati. Celice sta permeabilizirala s kombinacijo različnih organskih topil in terapijo zamrzovanja-odtajanja, kar je povečalo pretvorbo za 60-krat (Ni in Chen, 2004).

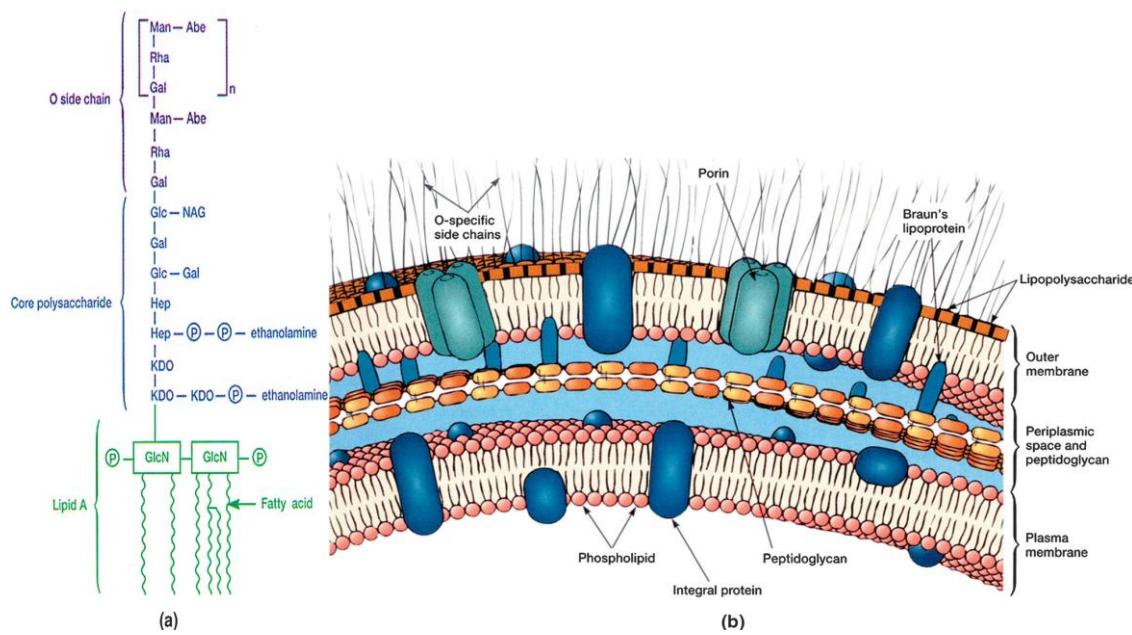
Sedanje metode permeabilizacije so empirične, ponavadi razvite z metodo poskusov in napak. Permeabilizacija celic ni vedno enostaven postopek. Permeabilizacija celic z 1% toluenom, poteka v petih stopnjah (Dupont in Clark, 1991).

Ostanki teh snovi zapletejo procese izolacije, še posebej, če uporabljamo površinsko aktivne snovi (surfaktante). Negativno vplivajo tudi tako, da povzročijo večje poškodbe celic ali celo njihovo lizo. (Fontanille in Larroche, 2003). Poškodbe membrane so usodne za vse sisteme, povezane z vlogo celične membrane. Na primer, škoda na membrani lahko povzroči nezadostno regeneracijo kofaktorjev (Ni in Chen, 2004).

Celična membrana po Gramu-negativnih bakterij (Slika 6, Prescott in sod., 2002) izključuje tudi majhne hidrofobne molekule, dovoljuje pa vstop večim hidrofilnim molekulam (>700 Da). Pasivna difuzija majhnih hidrofilnih molekul poteka preko porinskih kanalov v celični steni. Kljub porinom, pa je difuzija lahko bolj počasna kot si želimo. Lipopolisaharidni monosloj (LPS)(slika 6a,b) je visoko organizirana kvazi-kristalna struktura z majhno fluidnostjo, ki upočasnuje difuzijo molekul. LPS (slika 6b) je sestavljena iz lipofilnega lipida A, oligosaharidne sredice in dolge polisaharidne verige, ki jo sestavlja do 40 sladkorjev (Slika 6; O-specific antigen). Hidrofilni polisaharid je odgovoren za zadrževanje hidrofobnih molekul, hidrofobni lipid A pa omejuje vstop hidrofilnim snovem (Ni in Chen, 2004).

Ker je veliko substratov sintetičnih, se zanje v evoluciji organizmov niso razvili naravnii sistemi presnove. Veliko substratov je hidrofobnih ter relativno velikih, zato je prehod

takih molekul skozi membrano celic poglavitni omejujoči dejavnik za učinkovito biotransformacijo (Ni in Chen, 2004).



Slika 6: Membrana po Gramu negativnih bakterij (a); lipopolisaharidna struktura (b) (Prescott in sod., 2002)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in mikrobne kulture

agar agar	Interpartners, Češka
amonijev sulfat	Sigma-Aldrich, ZDA
diklorometan	Merck, Nemčija
etyl acetat	Merck, Nemčija
glicerol	Sigma-Aldrich, ZDA
glukoza	Carlo Erba Reagents, Italija
HCl	Merck, Nemčija
heksan	Riedel de Haén, Nemčija
kalcijev karbonat	
KRED-NADH Recycle Mix A	Codexis, ZDA
KRED-NADH Recycle Mix B	Codexis, ZDA
krompirjev glukozni agar	Merck, Nemčija
kvasni ekstrakt	BioSpringer, Francija
sladni ekstrakt	Merck, Nemčija
metanol	Merck, Nemčija
NaOH	Merck, Nemčija
Na ₂ HPO ₄	Merc, Nemčija
NaH ₂ PO ₄	Fluka Analytical, ZDA
Pepton iz sojnih semen	Sigma-Aldrich, ZDA
Toluen	J.T.Baker, Nizozemska
Triton X-100	Sigma-Aldrich, ZDA
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSMZ 743, bakterija, Gram+
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	DSMZ 43302, bakterija, Gram+
<i>Pichia methanolica makiguchi</i>	DSMZ 63137, kvasovka
<i>Fennelia nivea</i>	DSMZ 62070, gliva
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DSMZ 18184, kvasovka
<i>Geotrichum candidum</i>	DSMZ 6593, gliva
<i>Curvularia lunata</i>	DSMZ 63137, gliva
<i>Rhodococcus fascians</i>	DSMZ 20669, bakterija, Gram+

3.1.2 Raztopine

20 mM fosfatni pufer pH 7,5

Za pripravo 1000 ml 20mM raztopine uporabimo:

- 2,84 g NaH₂PO₄, za 1M 14,2g/100ml
- 2,76 g Na₂HPO₄ in za 1M 13,8g/100ml
- dodamo dH₂O do 1000 ml.

pH uravnamo z 10% NaOH ali 10% HCl na vrednost 7,5

0,1 M Tris HCl pufer z dodatkom 5 mM EDTA pH 8,0

Za pripravo 1000 ml 0,1 M raztopine uporabimo:

- 12,11 g Tris Base
- 1,86 g EDTA
- Dodamo dH₂O do 1000 ml.

pH uravnamo z 10% HCl na vrednost 8,0.

3.1.3 Gojišča

3.1.3.1 Gojišče GYM *Streptomyces*

Sestava za pripravo gojišča GYM *Streptomyces*

Preglednica 2: Sestava gojišča GYM *Streptomyces*

Sestavina	Količina
Glukoza	4 g
Kvasni ekstrakt	4 g
Sladni ekstrakt	10 g
CaCO ₃	2 g
d H ₂ O	do 1 l

Glukozo smo avtoklavirali posebej in jo dodali šele po avtoklaviranju gojišča.

Navedene kemikalije smo zatehtali v 2-litrsko erlenmajerico in dopolnili z destilirano vodo do 1 l. Raztopino smo mešali, dokler se niso vse sestavine raztopile. Z 10% NaOH ali 10% HCl smo uravnali pH gojišča na vrednost 7,0. Gojišče smo razlili v 500 ml erlenmajerice po 100 ml, jih zaprli z gazo ter avtoklavirali 20 min pri 121°C ter 1,1 bara. Pri pripravi

trdnega gojišča GYM *Streptomyces* smo v 1 l gojišča dodali še 12 g agarja. Pri trdnem gojišču smo po avtoklaviranju počakali, da se je gojišče shladilo na približno 50°C. Nato smo ga v laminariju razlili približno po 25 g v petrijevke.

3.1.3.2 Universal medium for yeast (YM)

Sestava za pripravo gojišča YM

Preglednica 3: Sestava gojišča YM

Sestavina	Količina
Kvasni ekstrakt	3 g
Sladni ekstrakt	3 g
Peptone iz sojinih semen	5 g
Glukoza	10 g
d H₂O	do 1 l

Glukozo smo avtoklavirali posebej in jo dodali šele po avtoklaviranju gojišča.

Navedene kemikalije smo zatehtali v 2-litrsko erlenmajerico in dopolnili z destilirano vodo do 1 l. Raztopino smo mešali, dokler se niso vse sestavine raztopile. Z 10% NaOH ali 10% HCl smo uravnali pH gojišča na vrednost 7,0. Gojišče smo razlili v 500 ml erlenmajerice po 100 ml, jih zaprli z gazo ter avtoklavirali 20 min pri 121°C ter 1,1 bara. Pri pripravi trdnega gojišča YM smo v 1 l gojišča dodali še 15 g agarja. Pri trdnem gojišču smo po avtoklaviranju počakali, da se je gojišče shladilo na približno 50°C. Nato smo ga v laminariju razlili približno po 25 g v petrijevke.

3.1.3.3 Industrijsko gojišče 11 (IG11)

Sestava za pripravo gojišča IG11

Preglednica 4: Sestava gojišča IG11

Sestavina	Količina
Škrob	7,5 g
CaCO₃	2,5 g
Amonijev sulfat	1,5 g
Glicerol	5 g
Kvasni ekstrakt	2,5 g
d H₂O	do 1 l

Gojišče moramo pred avtoklaviranjem segrevati vsaj do 80°C med stalnim mešanjem.

Navedene kemikalije smo zatehtali v 2-litrsko erlenmajerico in dopolnili z destilirano vodo do 1 l. Raztopino smo mešali, dokler se niso vse sestavine raztopile. Z 10% NaOH ali 10% HCl smo uravnali pH gojišča na vrednost 7,0. Gojišče smo razlili v 500 ml erlenmajerice po 100 ml, jih zaprli z gazo ter avtoklavirali 20 min pri 121°C ter 1,1 bara.

3.1.3.4 Gojišče YPD

Sestava za pripravo YPD gojišča

Preglednica 5: Sestava gojišča YPD

Sestavina	Količina
Kvasni ekstrakt	10 g
Malt ekstrakt	20 g
Glukoza	20 g
d H ₂ O	do 1 l

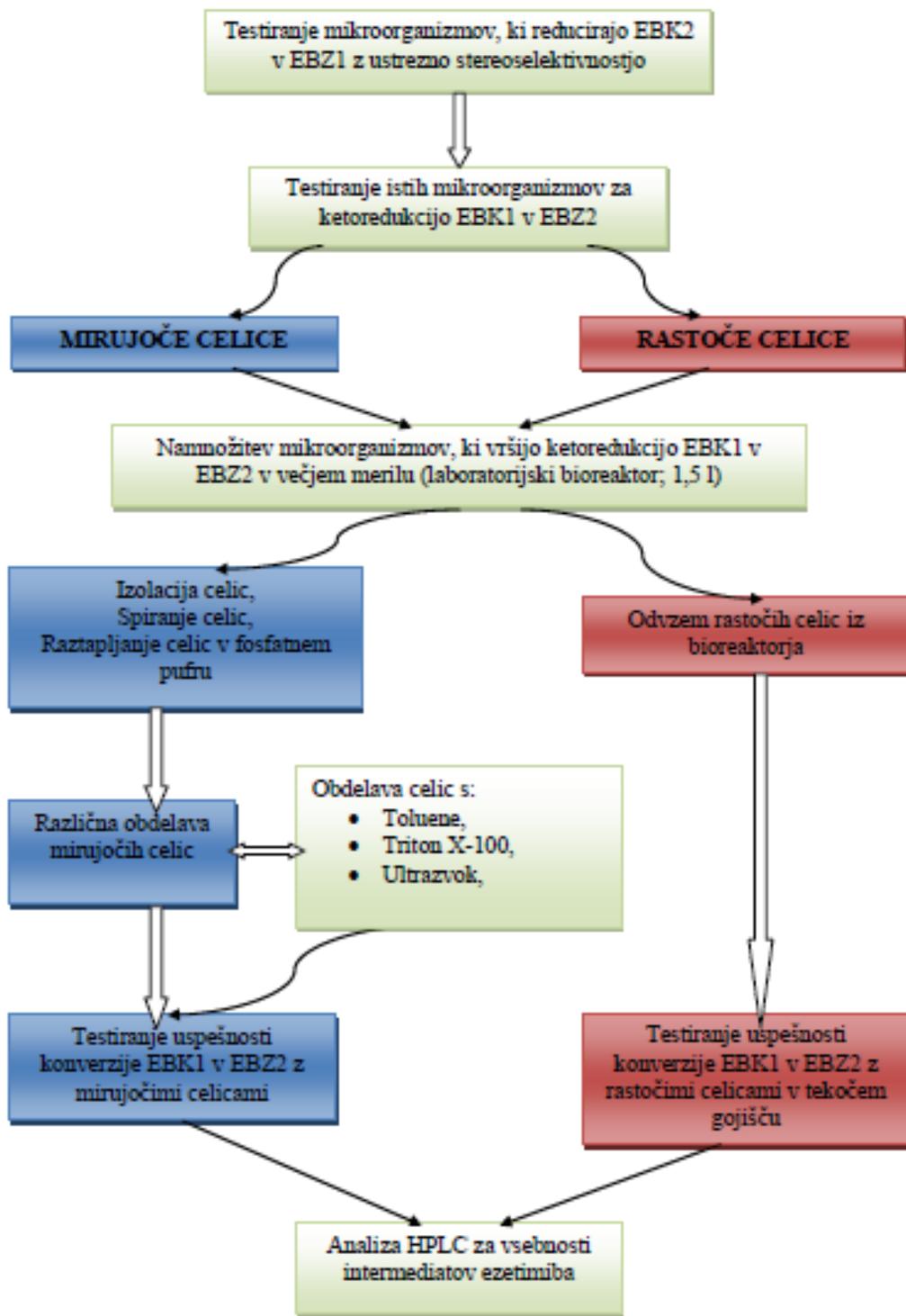
Glukozo smo avtoklavirali posebej in jo dodali šele po avtoklaviranju gojišča.

Navedene kemikalije smo zatehtali v 2-litrsko erlenmajerico in dopolnili z destilirano vodo do 1 l. Raztopino smo mešali, dokler se niso vse sestavine raztopile. Z 10% NaOH ali 10% HCl smo uravnali pH gojišča na vrednost 7,0. Gojišče smo razlili v 500 ml erlenmajerice po 100 ml, jih zaprli z gazo ter avtoklavirali 20 min pri 121°C ter 1,1 bara.

3.1.4 Laboratorijske aparature

avtoklav	Steifenhofner
centrifuga	Sorval RC 28S, Biofuge pico, Heraeus
inkubator	Sutjeska
laboratorijski bioreaktor	Biostat B-DCU (prostornina 2000 ml)
laminar	SMBC 122 AV
magnetno mešalo in grelnik	Tehnica Železniki
mikroskop	Olympus BX 50
ph meter	Mettler Toledo MP 220
stresalnik	Pilote-Shaker TM
tehtnici	Mettler P1210, Exacta 1200 EB
ultrasonikator	UP400 S, Hielscher Ultrasonics, Nemčija
vibracijsko mešalo	,„Assistant“-Reamix 2789, Nemčija
zamrzovalnik	LTH, Škofljica Loka

3.2 POTEK DELA



Slika 7: Shema poteka praktičnega dela diplomske naloge

3.3 METODE

3.3.1 Rehidracija liofiliziranih mikrobnih kultur

Iz DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) smo pridobili sedem mikrobnih kultur. Shranjene so bile v dvojnih ampulah, ki so bile zavarjene v vakuumu.

Ampule smo odpirali v laminariju v sterilnih razmerah. V laminariju smo segreli vrh ampule nad plamenom gorilnika. Nato smo hitro dodali 2-3 kapljice vode na razgret vrh ampule tako, da je le ta razpokal. S pinceto smo potrkali po razpokanem steklu tako, da je le to odpadlo. S pinceto smo nato vzeli notranjo ampulo, kateri smo odvzeli zaščitni čepek vate. Dodali smo 0,5 ml ustreznega gojišča ter počakali 30 minut, da se je pelet rehidriral. Po rehidraciji smo vsebino ampule sterilno prenesli v 5 ml ustreznega tekočega gojišča (Preglednica 6). Temu smo dodali 10% sterilnega glicerola, dobro premešali z vibracijskim mešalom ter sterilno prenesli v označene krio-mikrocentrifugirke (po 1,5 ml). Označene vzorce smo shranili v zamrzovalniku (-20°C).

3.3.2 Revitalizacija mikrobnih sevov

Rehidrirane seve smo razmazali po v naprej pripravljenih trdnih gojiščih, in sicer po univerzalnem gojišču za kvasovke ter gojišču GYM *Streptomyces*. Petrijevke z nacepljenimi sevi smo inkubirali 7 dni pri 28°C .

Preglednica 6: Uporaba gojišč za posamezni sev

Sev in DSMZ številka	Gojišče
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (743)	GYM
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (43302)	GYM
<i>Pichia methanolica makiguchi</i> (2147)	YM
<i>Fennelia nivea</i> (62070)	YM
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (18184)	YM
<i>Geotrichum candidum</i> (6593)	YM
<i>Curvularia lunata</i> (63137)	YM

Po 24 urah smo prenesli po 2 čepka vsakega seva iz petrijevke v prej pripravljena gojišča IG11 ter YPD. Po 27 urah rasti v tekočem gojišču IG11 ter YPD smo prenesli po 5% inokuluma v nova sveže pripravljena gojišča. Preostanek smo centrifugirali in naredili test na mirujočih celicah.

3.3.3 Cilji poskusov

3.3.3.1 Rastoče celice

Poskuse smo izvajali v laboratorijskem merilu na način, ki je primeren za večanje merila do industrijske proizvodnje. Zato smo namenoma uporabili celično kulturo – rastoče celice neposredno iz reaktorja ali v reaktorju in s tem posnemali stanje potencialnega industrijskega procesa, katerega cilj je enostavnost, hitrost, učinkovitost ter ekonomičnost.

3.3.3.2 Mirujoče celice

Pri izvajanju poskusov z mirujočimi celicami smo posnemali stanje, ki v določenem kontekstu ustreza delu z encimi oziroma encimskimi sistemi. Do določene mere lahko trdimo, da posnemamo sistem biokatalize z imobiliziranimi encimi.

V tem primeru smo se posvetili predvsem manjšanju reakcijskih prostornin (faktor 5-10 krat), kar smo dosegli z dodajanjem zgoščene celične mase (centrifugirane in suspendirane v bistveno manjših (10-15 krat) volumnih reakcijske mešanice).

Izraz konverzija, ki se pojavlja v tekstu, uporabljam za določitev vmesnih in končnih stanj v reakcijskih zmesih (prostornina reakcijske zmesi glede na čas). Gre za tehnološko kategorijo, ki je relevantna v smislu razvoja tehnologije za industrijske potrebe. Dejanska konverzija pretvorbe substrata v produkt glede na čas je opisana v razpravi.

3.3.4 Testiranje uspešnosti konverzije EBK1 v BZ2 z mirujočimi celicami

Uporaba predhodno gojenih celic za biotransformacijo je poznana kot uporaba mirujočih celic. Mirujoče celice so žive nerastoče celice. Ta metoda omogoča, da ločeno optimiziramo rast celic in procese biotransformacije. Uporaba mirujočih celic ima veliko prednosti, kot so nizka cena, nezahtevnost, zmanjšanje možnosti kontaminacij med procesom biotransformacije, olajšana izolacija in čiščenje produkta, potek reakcije v vodnem mediju (Wang in sod., 2006). V tem primeru izkoriščamo potreben encim, ki ga vsebujejo celice, za transformacijo določenega substrata. Da bi se biotransformiral, mora substrat najprej preiti celično steno in plazemsko membrano. Po isti poti nazaj pa mora preiti produkt, ki nastane v celici (Grogan, 2009).

Gojišče smo enakomerno prenesli v centrifugirke in ga centrifugirali (2250 obr/min, 10 min). Nato smo odlili supernatant in usedlini dodali 10 ml 20 mM fosfatnega pufra; pH=7,0. Vzorce smo dobro premešali z vibracijskim mešalom, da smo razbili usedlino in ji dodali EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l. Ponovno smo dobro premešali ter stresali pri 28°C in 220 obr/min.

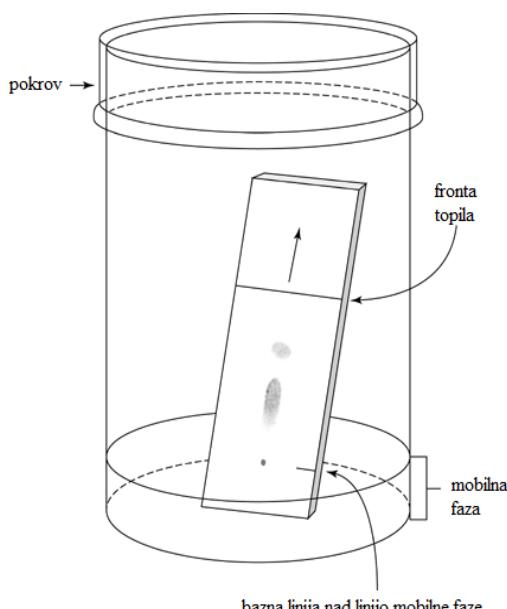
3.3.5 Testiranje uspešnosti konverzije z rastočimi celicami v tekočih gojiščih

V sveža tekoča gojišča z rastočo mikrobnou kulturo smo dodali EBK1 do končne koncentracije 1g/l. Dnevno smo merili pH ter analizirali nastajanje produkta EBZ2 s TLC.

3.3.6 Spremljanje konverzije EBK1 v EBZ2 s TLC

Tankoplastna tekočinska kromatografija (TLC, Thin layer chromatography) je predvsem analitska tehnika za ugotavljanje čistosti in tudi za preliminarno identifikacijo snovi (Harwood in sod., 1999).

Pri TLC je mobilna faza topilo ali mešanica topil, ki potuje po stacionarni fazi zaradi kapilarnega vleka. Adsorbent (silika gel, celuloza,...) je nanesen na ploščo, ki je lahko iz stekla, inertne plastike ali aluminija. Uporabljamo jo za ločevanje organskih spojin, ki se med seboj razlikujejo v polarnosti. Ob pravilno uporabljeni mobilni fazi se nanesene organske spojine ločijo med seboj po prepotovani poti na plošči.



Slika 8: Prikaz uporabe TLC-plošče v kadički s topilom (Meyers in Meyers, 2008)

Pripravo topil in TLC smo izvajali v digestoriju.

S TLC smo spremljali pretvorbo EBK1 v želeni produkt EBZ2. Na silikagelsko ploščo smo nanašali po 10 µl organske faze posameznega vzorca ter po 10 µl vzorcev standardnih raztopin EBK1 ter EBZ2.

Ko je mobilna faza prepotovala skoraj do vrha TLC-plošče, smo vzeli ploščo iz kadičke ter jo posušili s sušilnikom za lase. Pod UV svetlobo valovne dolžine 254 nm smo pregledali razvite TLC-plošče. Vijolične lise so predstavljale bodisi EBK1 bodisi EBZ2.

3.3.6.1 Priprava vzorca za TLC

Za TLC smo vzorce pripravili v 1,5 mililitrskih mikrocentrifugirkah, v katere smo odpipetirali 100 µl vzorca, dodali 100 µl etilacetata, mešali na vibracijskem mešalu 1 minuto in centrifugirali 5 minut pri 13000 obr/min.

3.3.6.2 Mobilna in stacionarna faza

Za mobilno fazo smo uporabili mešanico heksana in etilacetata v razmerju 7 : 3. Za stacionarno fazo smo uporabili silika gel (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, 20x20 cm).

3.3.6.3 Priprava standardnih raztopin

Standardne spojine EBK1 ter EBZ2 smo raztopili v metanolu do končne koncentracije 10 g/l. Od tega smo po 10 µl nanašali na silikagelsko ploščico.

3.3.7 Nacepitev *R. rhodochrous* (43302) ter *R. fascians* (20669) na trdo YM gojišče

Pripravili smo 0,5 l trdega gojišča YM. Po avtoklaviranju smo sterilno dodali 10 ml 50% glukoze, ter razlili gojišče na plošče. Pripravili smo redčitveno vrsto *R. rhodochrous* (43302) ter *R. fascians* (20669), dobro premešali ter sterilno prenesli 100 µl vzorca na trdno gojišče. Vzorec smo razmazali po plošči do suhega, jih označili ter inkubirali 7 dni pri 28°C.

3.3.8 Priprava inokuluma *R. rhodochrous* (43302) ter *R. fascians* (20669) za bioreaktor

Iz zamrzovalnika smo vzeli zamrznjena seva *R. rhodochrous* (43302) in *R. fascians* (20669) ter ju odtajali. Nato smo v 100 ml gojišča YPD dodali 4 ml sterilne 50% glukoze ter 100 µl posameznega inokuluma. Erlenmajerici smo stresali 3 dni pri 28°C in 220 obr/min.

3.3.9 Postavitev reaktorja za namnožitev celic

Najprej smo z mikroskopom pregledali oba seva v gojišču YPD, ki sta bila na stresalniku 3 dni. Obe kulti sta zrasli. Nato smo pripravili 2-krat 1,4 l gojišča YPD. Glukozo smo dodali pred avtoklaviranjem. pH gojišča smo uravnali na vrednost 7,0. Pripravili smo dva laboratorijska reaktorja (prostornina 2000 ml) (Slika 12). Kalibrirali smo pH elektrode in pO₂ elektrode. V vsak reaktor smo nato prelili gojišče YPD. Pripravili smo vse potrebne steklenice (kislina, baza, antipenilec ter inokulum) ter vse skupaj z reaktorjem avtoklavirali 20 min pri 121°C in 1.1 bara.

Po avtoklaviranju smo priklopili pH elektrodo, pO₂ elektrodo ter termometer. Namestili smo mešalo, dovod zraka ter temperaturno regulacijo. Priklopili smo steklenice s kislino, bazo ter antipenilcem. Gojišče smo ohladili na 28°C, število obratov nastavili na 200 obr/min ter pretok zraka na 1,0 l/min. Odvzeli smo vzorec gojišča ter mu izmerili pH. Nato smo uravnali vrednost pH v reaktorju. Steklenice z inokulumom smo ob gorilniku priklopili na reaktor ter dodali inokulum v gojišče.

Vklopili smo avtomatsko pH regulacijo, in sicer z nastavljenim pH na vrednost 7,0.

Potek procesa in parametre v laboratorijskih reaktorjih smo beležili na eno uro, in sicer: pretok zraka, temperaturo kulture, pH kulture, obrate, pO₂ ter dodatek baze in kisline.



Slika 9: Laboratorijska reaktorja Biostat B-DCU (prostornina 2000 ml)

3.3.10 Prekinitev rasti celic *R. rhodochrous* (43302) in *R. fascians* (20669) ter priprava mirujočih celic

Po 68 urah rasti v bioreaktorju smo prekinili proces rasti celic *R. rhodochrous* (43302). Dobili smo 1400 ml kulture in od tega smo 5 ml kulture prenesli v centrifugirko ter dodali EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l. Preostalo kulturo smo centrifugirali (10000 obr/min, 5 minut). Nato smo izolirali celice. Supernatant smo odlili stran, celice pa postrgali iz centrifugirk. Izolirali smo 41,12 g celic. Te celice smo razdelili v centrifugirke po 4 g celic.

V eno centrifugirko s 4 g celic smo dodali 10 ml 20mM fosfatnega pufra, pH=7,0. Poleg tega smo dodali še EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l.

Nato smo v tri centrifugirke dodali po 13 ml 0,1 M Tris-HCl pufra z dodatkom 5 mM EDTA, pH= 8,0.

V eno od teh centrifugirk smo dodali 480 µl toluena v eno pa 600 µl triton X-100. Obe centrifugirki smo dobro premešali ter stresali pol ure pri sobni temperaturi in 100 obr/min. Dalje smo vzorce centrifugirali 10 min pri 2250 obr/min. Odlili smo supernatant ter na pelet celic dodali 10 ml 20mM fosfatnega pufra, pH=7,0. Poleg tega smo dodali še EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l.

Tretjo centrifugirko z dodanim 0,1 M Tris-HCl pufra z dodatkom 5 mM EDTA, pH= 8,0 pa smo izpostavili ultrazvoku za 1,5 min. Nato smo jo centrifugirali (2250 obr/min, 10

min). Odlili smo supernatant ter na pelet celic dodali 10 ml 20mM fosfatnega pufra, pH=7,0. Poleg tega smo dodali še EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l.

Vse centrifugirke z dodanim EBK1 smo dobro premešali (do razbitja peleta) ter stresali pri 28°C in 220 obr/min.

Preostale centrifugirke s celicami *R. rhodochrous* (43302) smo shranili pri -20°C.

Po 69 urah rasti v bioreaktorju smo prekinili proces rasti celic *R. fascians* (20669). Dobili smo 1440 ml kulture. 5 ml kulture smo prenesli v centrifugirko ter dodali EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l. Preostalo kulturo smo centrifugirali 5 min pri 10000 obr/min. Nato smo izolirali celice. Izolirali smo 13,33 g celic. Te celice smo razdelili v centrifugirke po 3 g celic. V eno centrifugirko s 3 g celic smo dodali 10 ml 20mM fosfatnega pufra, pH=7,0. Poleg tega smo dodali še substrat EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l.

Nato smo v tri centrifugirke dodali po 10 ml 0,1 M Tris-HCl pufra z dodatkom 5 mM EDTA, pH= 8,0. V eno od teh centrifugirk smo dodali 360 µl toluena v eno pa 450 µl triton X-100. Vsebino obeh centrifugirk smo dobro premešali ter stresali pol ure pri sobni temperaturi in 100 obr/min. Dalje smo vzorce centrifugirali 10 min pri 2250 obr/min. Odlili smo supernatant ter usedlini celic dodali 10 ml 20mM fosfatnega pufra, pH=7,0. Poleg tega smo dodali še EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l.

Po eni uri smo iz stresalnika vzeli centrifugirko z dodanim tritonom X-100 ter jo centrifugirali 10 min pri 2250 obr/min. Odlili smo supernatant ter na pelet celic dodali 10 ml 20mM fosfatnega pufra, pH=7,0. Poleg tega smo dodali še substrat EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l.

Tretjo centrifugirko z dodanim 0,1 M Tris-HCl pufra z dodatkom 5 mM EDTA, pH= 8.0 smo izpostavili ultrazvoku za 1,5 min. Nato smo jo centrifugirali 10 min pri 2250 obr/min. Odlili smo supernatant ter usedlini celic dodali 10 ml 20mM fosfatnega pufra, pH=7,0. Poleg tega smo dodali še EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l.

Pripravili smo še kontrolni vzorec v katerega smo dali 10 ml 20 mM fosfatnega pufra, pH=7,0 ter EBK1 v DMSO do končne koncentracije 1 g/l.

Vsebine vseh centrifugirk z dodanim EBK1 smo dobro premešali, da se je usedlina resuspendirala, ter stresali pri 28°C in 220 obr/min.

3.3.10.1 Priprava substrata EBK1 v DMSO

Zatehtali smo 100 mg EBK1 ter ga raztopili v 2 ml DMSO. Od tega smo dali po 200 µl v posamezno centrifugirko (razen v vzorca s 5 ml kulture, kjer smo dodali po 100 µl te raztopine).

3.3.11 Spremljanje ketoredukcije s TLC

V času 24, 95, 119, 142, 168 ter 192 ur smo odvzeli po 100 µl posameznega pripravljenega vzorca reakcijske mešanice in jih prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke. Vsakemu vzorcu smo dodali 100 µl etilacetata, dobro premešali (1 min) ter centrifugirali 5 min pri 13000 obr/min. Nato smo odvzeli 10 µl zgornje organske faze vzorca ter jo nanesli na TLC-ploščo. TLC-ploščo smo razvili v kadički z mobilno fazo heksan : etilacetat = 7 : 3.

3.3.12 Vzorčenje za HPLC intermediatov ezetimiba ter dodatek celic

Po 96 urah stresanja smo odvzeli po 2 ml vzorca reakcijske mešanice v stekleničke ter jih shranili v zamrzovalniku (-20°C) do analize HPLC. Po 96 urah stresanja smo v vzorce seva *R. rhodochrous* (43302), kjer so bili najboljši rezultati TLC (Preglednica 10), dodali še po 4 g zamrznjenih celic *R. rhodochrous* (43302). Celice smo dodali v vzorce, ki smo jih predhodno obdelali s toluenom, tritonom X-100, ultrazvokom ter vzorcem, kjer celice niso bile obdelane.

Po 120 urah stresanja smo odvzeli vzorce reakcijske mešanice za analizo HPLC intermediatov ezetimiba ter jih shranili v zamrzovalniku (-20°C).

Preglednica 7: Oznaka stekleničk ter shema odvzemanja vzorcev za HPLC analizo intermediatov ezetimiba

Oznaka stekleničke	Oznaka 50 ml plastične epruvete	Čas odvzema	Količina odvzema [ml]
EBZ11_162	ROR-006-LR3+1g/l EBK1, prej ultrazvok	PON96	2 ml
EBZ11_163	ROR-006-LR3 +1g/l EBK1, prej toluen	PON96	2 ml
EBZ11_164	ROR-006-LR3+1g/l EBK1, prej Triton X-100	PON96	2 ml
EBZ11_165	ROR-006-LR3+1g/l EBK1, brez obdelave	PON96	2 ml
EBZ11_166	ROR-006-LR3+1g/l EBK1, kultura	PON96	2 ml
EBZ11_167	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, prej ultrazvok	PON96	2 ml
EBZ11_168	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, prej toluen	PON96	2 ml
EBZ11_169	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, prej Triton X-100	PON96	2 ml
EBZ11_170	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, brez obdelave	PON96	2 ml
EBZ11_171	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, kultura	PON96	2 ml
EBZ11_172	SLEPI VZOREC+1g/l EBK1	PON96	2 ml
EBZ11_173	ROR-006-LR3+1g/l EBK1, prej ultrazvok	PON 120	2 ml
EBZ11_174	ROR-006-LR3 +1g/l EBK1, prej toluen	PON 120	2 ml
EBZ11_175	ROR-006-LR3+1g/l EBK1, prej Triton X-100	PON 120	2 ml
EBZ11_176	ROR-006-LR3+1g/l EBK1, brez obdelave	PON 120	2 ml
EBZ11_177	ROR-006-LR3+1g/l EBK1, kultura	PON 120	1 ml
EBZ11_178	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, prej ultrazvok	PON 120	2 ml
EBZ11_179	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, prej toluen	PON 120	2 ml
EBZ11_180	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, prej Triton X-100	PON 120	2 ml
EBZ11_181	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, brez obdelave	PON 120	2 ml
EBZ11_182	ROF-004-LR4+1g/l EBK1, kultura	PON 120	1 ml
EBZ11_183	SLEPI VZOREC+1g/l EBK1	PON 120	2 ml

3.3.13 Priprava odvzetih vzorcev za HPLC intermediatov ezetimiba

Zamrznjene vzorce reakcijske mešanice, ki smo jih odvzemali, smo odtalili. Nato smo jih prenesli v centrifugirke. Dodali smo jim enak volumen etilacetata, dobro premešali ter stresali 1 uro pri 28°C in 260 obr/min. Nato smo vzorce centrifugirali 10 min pri 4000 obr/min ter zgornjo organsko fazo prenesli v nove, označene stekleničke. Označili smo do kje v stekleničkah je segala organska faza. Vzorce smo čez noč sušili v digestoriju. Nato smo vzorce obdelali z 80% acetonitrilom, pH=2.5, in jih analizirali s HPLC.

Topilo za vzorce je bilo:

- 80% acetonitril, pH 2,5

HPLC-kolona:

- Gemini C6-Phenyl, 110A, 3 µm, 150*4,6 mm, pretok 1ml/min, temperatura kolone 50°C, UV=230 nm, volumen injiciranega vzorca 5 µl

Mobilna faza:

- A: 0,01 M NaH₂PO₄, pH=2'5
- B: Acetonitril : metanol = 80 : 20 (izokratsko razmerje topil)

3.3.14 Izračun odstotka konverzije EBK1 v EBZ2 glede na rezultate analize HPLC

Iz kromatograma, ki smo ga dobili po analizi HPLC, lahko med drugimi podatki odčitamo tudi površino posameznega vrha, ki ustreza koncentraciji posamezne snovi v vzorcu.

Ker sta nas zanimala le EBK1 ter EBZ2, smo sešteli njuni površini pikov in dobili skupno površino. Odstotek površine EBZ2 glede na skupno površino pa predstavlja odstotek konverzije EBK1 v EBZ2 (enačba 4). Ker smo poznali začetno koncentracijo EBK1 v reakcijski mešanici (1 g/l), lahko z odstotkom konverzije izračunamo koncentracijo EBZ2 v reakcijski mešanici po določenem času stresanja (enačba 5).

$$((A_{EBK1} + A_{EBZ2}) / A_{EBZ2}) \times 100 = \% \text{ konverzije EBK1 v EBZ2} \quad \dots(4)$$

A_{EBK1} ... površina pika za EBK1 na kromatogramu

A_{EBZ2} ... površina pika za EBZ2 na kromatogramu

$$C_k \text{ EBZ2} = \% \text{ konverzije EBK1 v EBZ2} \times C_z \text{ EBK1} \quad \dots(5)$$

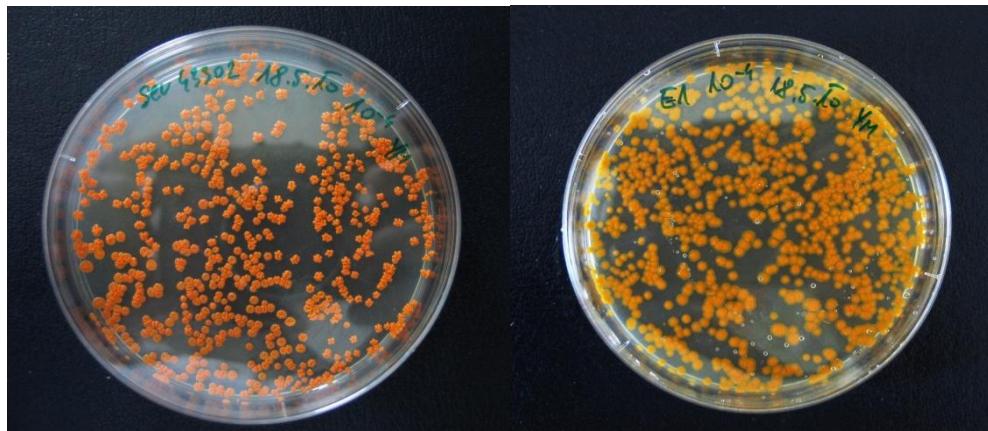
$C_z \text{ EBK1}$... začetna koncentracija EBK1 v reakcijski mešanici

$C_k \text{ EBZ2}$... končna koncentracija EBZ2 v reakcijski mešanici

4 REZULTATI

4.1 RAST *R. RHODOCHROUS* (43302) IN *R. FASCIANS* (20669) NA TRDNEM GOJIŠČU

Po razmazu različnih redčitev *R. rhodochrous* (43302) ter *R. fascians* (20669) na trdno YM gojišče smo plošče inkubirali 7 dni pri 28°C. Rast smo spremljali dnevno. Po dveh dneh so bile že opazne kolonije, vendar niso bile še obarvane in se na pogled niso ločile. Po 7 dneh (slika 10) so bile kolonije lepo obarvane in velike. Pri *R. rhodochrous* (43302) opazimo močno oranžno barvo kolonij, ki so brazdaste s suho površino ter okrogle. Pri *R. fascians* (20669) pa opazimo bolj rumenkaste kolonije, ki so okrogle, konveksne ter imajo gladko, sluzasto površino.



Slika 10: *R. rhodochrous* (43302) (levo) ter *R. fascians* (20669) (desno) slikana po 7 dneh inkubacije pri 28°C, redčitev 10^{-4}

4.2 REZULTATI TESTA Z MIRUJOČIMI CELICAMI PRI RAZLIČNIH MIKROBNIH KULTURAH

Centrifugiranim celicam smo dodali substrat EBK1 do končne koncentracije 1 g/l. Dnevno smo merili pH ter spremljali konverzijo v EBZ2 s TLC. pH-vrednosti so bile od 6,8 do 8,0. TLC je pokazala, da je do delne ketoredukcije iz EBK1 v EBZ2 prišlo pri nekaterih vzorcih (Preglednica 8).

Preglednica 8: Pozitivna ketoredukcija EBK1 v EBZ2 v dveh različnih gojiščih pri testu na mirujočih celicah (+... pozitivna ketoredukcija EBK1 v EBZ2, - ... ni prišlo do redukcije EBK1 v EBZ2)

GOJIŠČE

MIKROBNA KULTURA	<u>IG11</u>	<u>YPD</u>
<i>R. rhodochrous</i> (43302)	+	+
<i>R. erythropolis</i> (743)	-	+
<i>R. mucilaginosa</i> (18184)	-	+

4.2.1 Pozitivna ketoredukcija EBK1 v EBZ2 pri mirujočih celicah iz gojišča IG11

Do delne ketoredukcije EBK1 v EBZ2 v gojišču IG11 je prišlo pri vzorcu *R. rhodochrous* (43302), kjer je HPLC pokazala, da je razmerje EBK1 : EBZ2 = 80,5 : 17 in koncentracija EBZ2 0,248 mg/ml.

4.2.2 Pozitivna ketoredukcija EBK1 v EBZ2 pri mirujočih celicah iz gojišča YPD

Do delne ketoredukcije EBK1 v EBZ2 v gojišču YPD je prišlo pri vzorcu z *R. rhodochrous* (43302), kjer je HPLC pokazala, da je razmerje EBK1 : EBZ2 = 66 : 27 in koncentracija EBZ2 0,26 mg/ml.

4.3 REZULTATI TESTA NA RASTOČIH CELICAH PRI RAZLIČNIH MIKROBNIH KULTURAH

V sveža gojišča smo dodali EBK1 do končne koncentracije 1g/l. Dnevno smo merili pH in spremljali produkt EBZ2 s TLC. pH vrednosti so bile od 6,8 do 8,0.

TLC je pokazala, da je do delne ketoredukcije iz EBK1 v EBZ2 prišlo v gojišču YPD z *R. rhodochrous* (43302), kjer je HPLC pokazala razmerje EBK1 : EBZ2 = 74,0 : 20,2 in koncentracijo EBZ2 0,38 mg/ml (Preglednica 9).

Ostali vzorci so bili zavrnjeni.

Preglednica 9: Pozitivna ketoredukcija EBK1 v EBZ2 z *R. rhodochrous* (43302) v različnih gojiščih

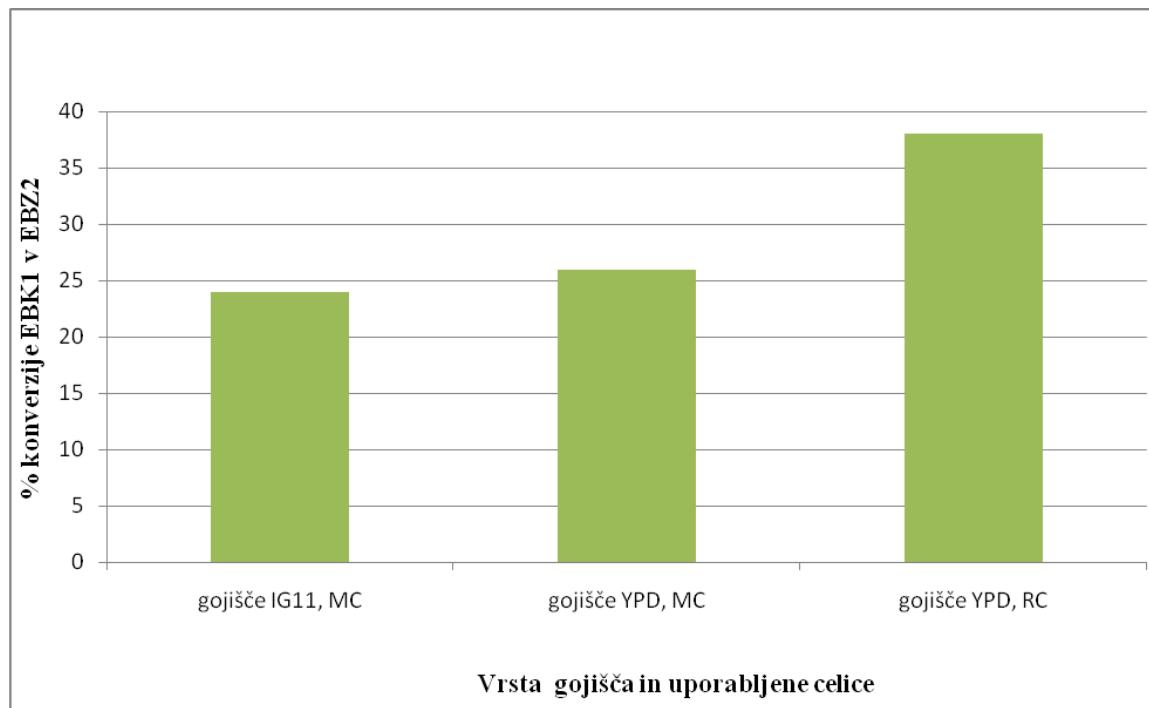
GOJIŠČE	VRSTA	INOKULUM	HPLC	HPLC (konc.)	% konverzije
			TESTA	[EBK1:EBZ2]	EBZ2) [mg/ml]
IG11	MC	sev 43302	80,5 : 17	0,24	24
YPD	MC	sev 43302	66 : 27	0,26	26
YPD	RC	sev 43302	74,0 : 20,2	0,38	38

MC - mirujoče celice

RC - rastoče celice

Za izračun % konverzije glej točko 3.3.14

Odstotek konverzije EBK1 v EBZ2 je bil največji pri *R. rhodochrous* (43302). V gojišču YPD smo dobili boljšo konverzijo kakor v gojišču IG11, prav tako pa je boljša konverzija v rastočih celicah, kot na mirujočih celicah (Slika 11, Preglednica 9).



Slika 11: Konverzije EBK1 v EBZ2 pri *R. rhodochrous* (43302) v gojišču YPD ter IG11
MC – mirujoče celice, RC – rastoče celice

4.4 KONVERZIJA EBK1 V EBZ2 PRI MIRUJOČIH CELICAH NAMNOŽENIH V BIOREAKTORJU

4.4.1 Rezultati TLC konverzije EBK1 v EBZ2 pri različno obdelanih mirujočih celicah

Ko smo izolirali celice iz reaktorja, smo naredili teste na mirujočih celicah. Poleg tega smo odvzeli tudi kulturo iz reaktorja, s katero smo naredili poskus konverzije EBK1 v EBZ2 v rastočih celicah. Mirujoče celice smo različno obdelali (toluen, ultrazvok, triton X-100). Po različnih časih smo odvzemali vzorce za TLC. Glede na rezultate TLC smo nato odvzemali tudi vzorce za HPLC, ki smo jih hranili v zamrzovalniku.

Vzorce smo odvzeli po 24 urah, 95 urah, 119 urah, 142 urah, 168 urah ter 192 urah. Glede na rezultate TLC smo s HPLC analizirali vzorce odvzete po 95 urah ter 119 urah.

Preglednica 10: Količina EBZ2 glede na standardno raztopino EBZ2 (10 g/l) pri vzorcih mirujočih celic po 95 urah stresanja

MIKROBNA KULTURA	OBDELAVA CELIC	KOLIČINA EBZ2 GLEDE NA STANDARD
<i>R. rhodochrous</i> (43302)	Ultrazvok	++
	Toluene	+
	Triton X-100	+++
	Brez obdelave	+++
	Rastoče celice	+
<i>R. fascians</i> (20669)	Ultrazvok	+
	Toluene	+
	Triton X-100	+
	Brez obdelave	++
	Rastoče celice	++
<i>Kontrolni vzorec</i>		-

+ ... slaba pretvorba EBK1 v EBZ2

++ ... dobra pretvorba EBK1 v EBZ2

+++ ... zelo dobra pretvorba EBK1 v EBZ2

- ... ničelna pretvorba EBK1 v EBZ2

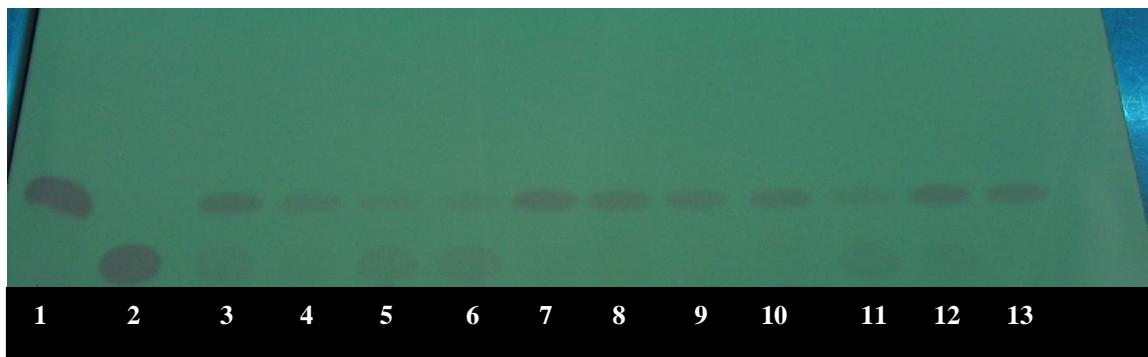
Preglednica 11: Količina EBZ2 glede na standardno raztopino EBZ2 (10 g/l) pri vzorcih mirujočih in rastočih celic po 119 urah stresanja

MIKROBNA KULTURA OBDELAVA CELIC KOLIČINA EBZ2 GLEDE NA STANDARD

<i>R. rhodochrous</i> (43302)	Ultrazvok	++
	Toluene	++
	Triton X-100	+++
	Brez obdelave	+++
	Rastoče celice	+
<i>R. fascians</i> (20669)	Ultrazvok	+
	Toluene	+
	Triton X-100	+
	Brez obdelave	++
	Rastoče celice	+

Kontrolni vzorec

- + ... slaba pretvorba EBK1 v EBZ2
++ ... dobra pretvorba EBK1 v EBZ2
+++ ... zelo dobra pretvorba EBK1 v EBZ2
- ... ničelna pretvorba EBK1 v EBZ2



Slika 12: Rezultati TLC vzorcev *R. rhodochrous* (43302) in *R. fascians* (20669) z dodanim EBK1 kot substratom (1g/l) po 95 urah na stresalniku

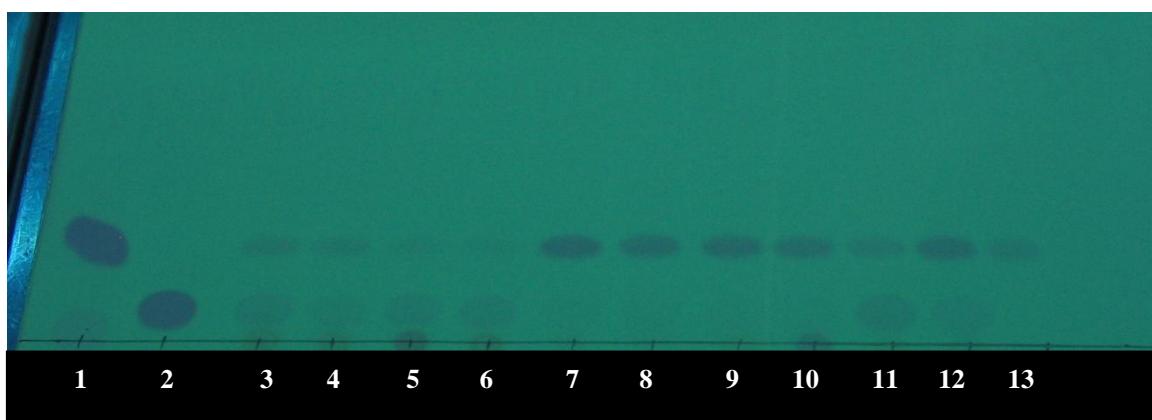
1-EBK1, 2-EBZ2, 3-sev 43302+ultrazvok, 4-sev 43302+toluen, 5-sev 43302+triton X-100, 6-sev 43302 brez obdelave, 7-sev 43302 rastoče celice iz reaktorja, 8-sev 20669+ultrazvok, 9-sev 20669+toluen, 10-sev 20669+triton X-100, 11-sev 20669 brez obdelave, 12-sev 20669 rastoče celice iz reaktorja, 13-kontrolni vzorec

Po 95 urah na stresalniku je vseh primerih prišlo do redukcije EBK1 v EBZ2 (Slika 12). Pri *R. rhodochrous* (43302) smo najboljšo redukcijo dokazali pri mirujočih celicah, ki niso bile obdelane; podobna redukcija je pri vzorcu obdelanem s tritonom X-100, veliko slabša pa pri vzorcu rastočih celic iz reaktorja.

Pri *R. fascians* (20669) pa smo najboljšo redukcijo dokazali pri rastočih celic iz reaktorja ter vzorcu z neobdelanimi celicami. Pri vzorcih obdelanih s toluenom, tritonom X-100 ter ultrazvokom, pa je bila redukcija precej majhna (Slika 12).

Pri kontrolnem vzorcu ni prišlo do redukcije EBK1 (Slika 12).

Po 95 urah na stresalniku smo vzorcem mirujočih celic z *R. rhodochrous* (43302) dodali še 4 g zamrznjenih mirujočih celic istega seva.



Slika 13: Rezultati TLC vzorcev *R. rhodochrous* (43302) in *R. fascians* (20669) z dodanim EBK1 kot substratom (1g/l) po 119 urah na stresalniku

1-EBK1, **2**-EBZ2, **3**-sev 43302+ultrazvok, **4**-sev 43302+toluen, **5**-sev 43302+triton X-100, **6**-sev 43302 brez obdelave, **7**-sev 43302 rastoče celice iz reaktorja, **8**-sev 20669+ultrazvok, **9**-sev 20669+toluen, **10**-sev 20669+triton X-100, **11**-sev 20669 brez obdelave, **12**-sev 20669 rastoče celice iz reaktorja, **13**-kontrolni vzorec

Po 119 urah (inkubirano s stresanjem) smo pri *R. rhodochrous* (43302) najboljšo redukcijo dokazali pri vzorcu z mirujočimi celicami, ki niso bile obdelane; podobna redukcija je pri vzorcu obdelanem s tritonom X-100, veliko slabša pa pri vzorcu rastočih celic iz reaktorja (Slika 13).

Pri *R. fascians* (20669) pa smo najboljšo redukcijo EBK1 v EBZ2 dokazali pri vzorcu rastočih celic iz reaktorja ter vzorcu z mirujočimi celicami, ki niso bile obdelane. Pri vzorcih obdelanih s toluenom, tritonom X-100 ter ultrazvokom, pa je bila redukcija precej majhna (Slika 13).

Pri kontrolnem vzorcu vidimo, da ni prišlo do redukcije EBK1 (Slika 13).

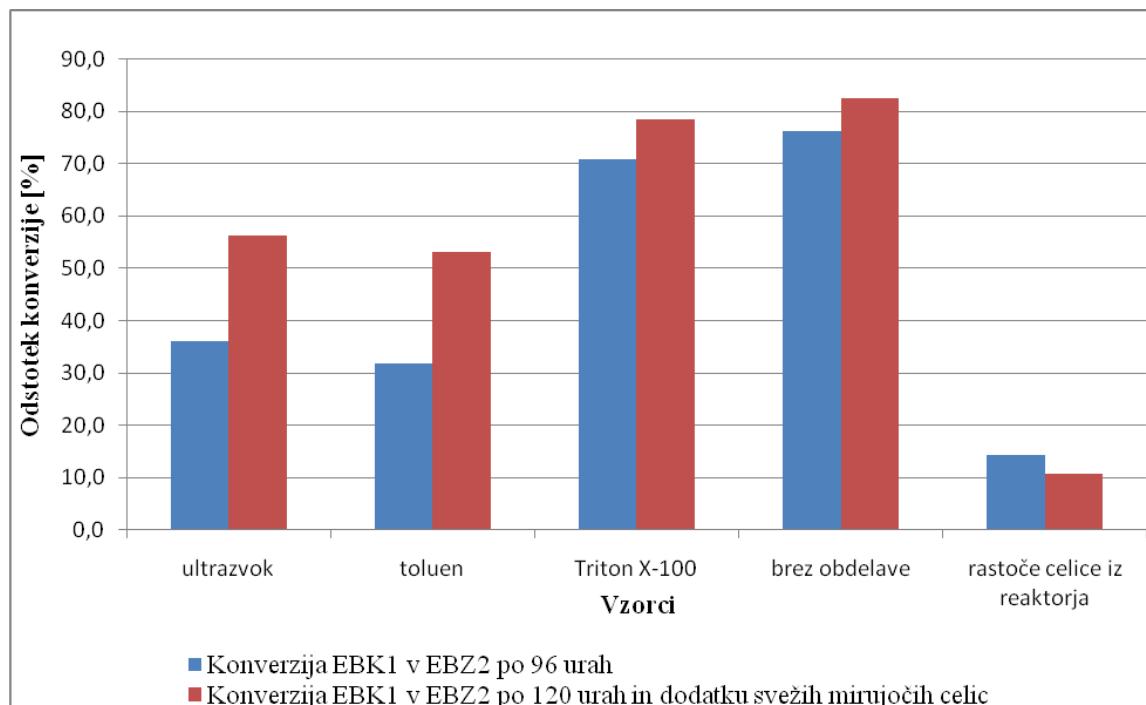
4.4.2 Rezultati analize HPLC

Vzorce smo obdelali, kot je prikazano v točki 3.3.12. Pregledali smo kromatograme analize HPLC ter preračunali % konverzije EBK1 v EBZ2. Rezultati smo podani v preglednici 12.

Preglednica 12: Pregled ketoredukcije EBK1 v EBZ2 na HPLC pri dveh različnih sevih ter različnem času

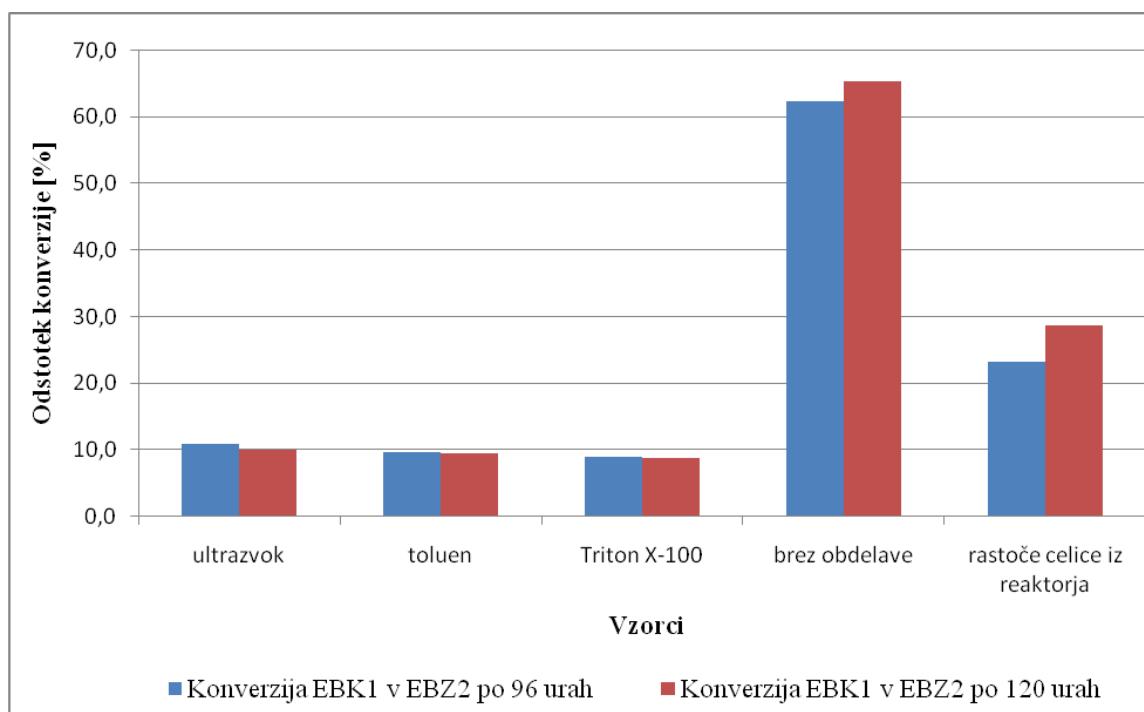
Oznaka flaške	HPLC [EBK1:EBZ2]	HPLC(konc.EBZ2)[mg/ml]	% konverzije
EBZ11_162	57,9 : 32,8	0,4	36,1
EBZ11_163	59,2 : 27,5	0,3	31,7
EBZ11_164	29,2 : 70,8	0,7	70,8
EBZ11_165	20,3 : 64,7	0,8	76,2
EBZ11_166	78,3 : 13,1	0,1	14,3
EBZ11_167	81,6 : 10,0	0,1	10,9
EBZ11_168	81,3 : 8,7	0,1	9,6
EBZ11_169	91,1 : 8,9	0,1	8,9
EBZ11_170	33,5 : 55,3	0,6	62,2
EBZ11_171	71,5 : 21,6	0,2	23,2
EBZ11_172	85,7 : 0,0	0,0	0,0
EBZ11_173	36,9 : 47,3	0,6	56,1
EBZ11_174	38,6 : 43,6	0,5	53,0
EBZ11_175	21,6 : 78,4	0,8	78,4
EBZ11_176	14,7 : 69,5	0,8	82,5
EBZ11_177	84,7 : 10,1	0,1	10,6
EBZ11_178	82,7 : 9,2	0,1	10,0
EBZ11_179	81,2 : 8,2	0,1	9,4
EBZ11_180	91,3 : 8,7	0,1	8,7
EBZ11_181	30,4 : 57,3	0,7	65,3
EBZ11_182	65,8 : 26,5	0,3	28,7
EBZ11_183	94,8 : 0,0	0,0	0,0

Za izračun % konverzije glej točko 3.3.14

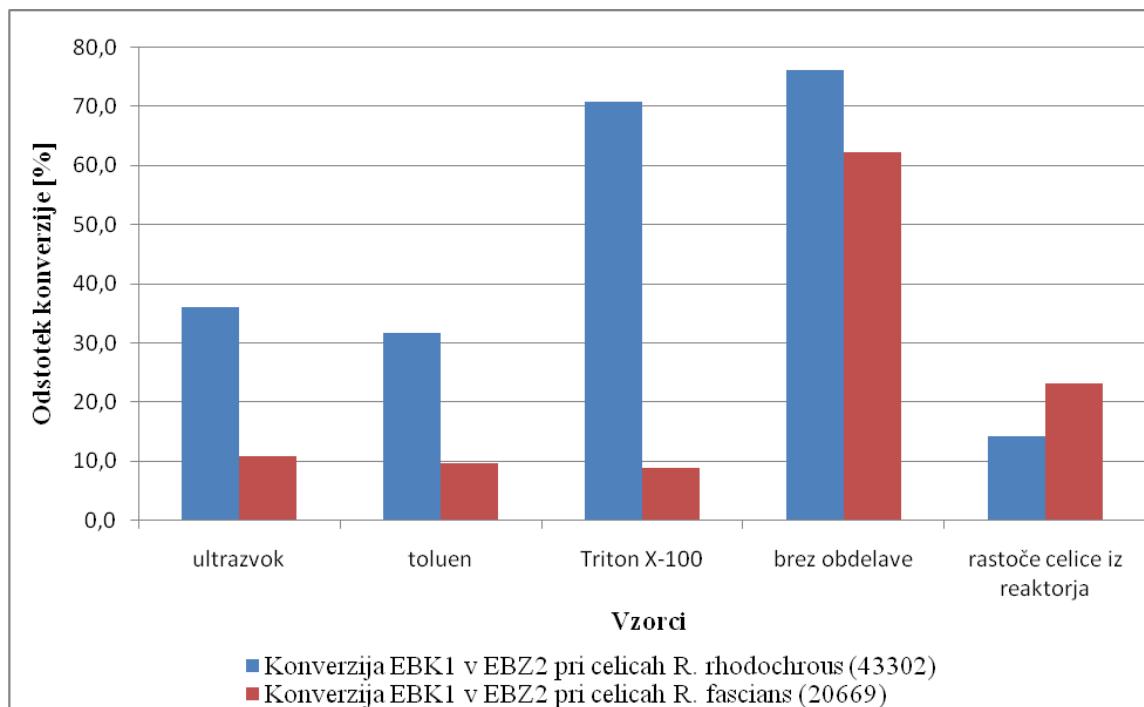


Slika 14: Konverzija EBK1 v EBZ2 z mirujočimi in rastočimi celicami *R. rhodochrous* (43302) po 96 in 120 urah stresanja

Rezultati analiz HPLC so pokazali, da je konverzija v primeru mirujočih celic *R. rhodochrous* (43302) boljša po daljšem času stresanja, medtem ko konverzija EBK1 v EBZ2 pri kulturi ni boljša, če čas podaljšamo (Slika 14 in 15).



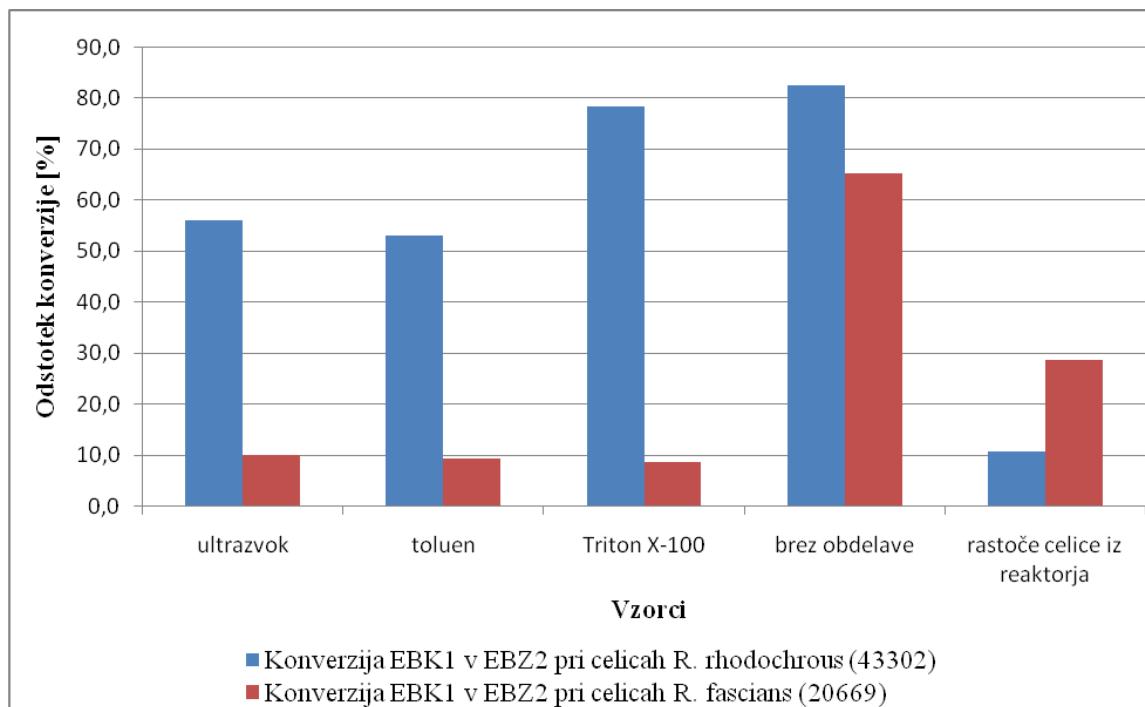
Slika 15: Konverzija EBK1 v EBZ2 z mirujočimi in rastočimi celicami *R. fascians* (20669) pri različnih obdelavah po 96 in 120 urah stresanja



Slika 16: Konverzija EBK1 v EBZ2 z mirujočimi in rastočimi celicami obeh sevov *Rhodococcus* pri različnih obdelavah in po 96 urah stresanja

Rezultati analiz HPLC so pokazali, da mirujoče celice *R. rhodochrous* (43302) po 96 urah stresanja bolj učinkovito pretvarjajo EBK1 v EBZ2 kakor mirujoče celice *R. fascians* (20669) (Slika 16).

Pri rastičih celicah iz reaktorja pa je boljša konverzija potekla pri celicah *R. fascians* (20669) (Slika 16).



Slika 17: Konverzija EBK1 v EBZ2 z mirujočimi in rastičimi celicami obeh sevov *Rhodococcus* pri različnih obdelavah in po 120 urah stresanja

Rezultati analiz HPLC so pokazali, da mirujoče celice *R. rhodochrous* (43302) po 120 urah stresanja mnogo bolje pretvarjajo EBK1 v EBZ2 kakor mirujoče celice *R. fascians* (20669) (Slika 17).

Pri rastičih celicah iz reaktorja pa je boljša konverzija potekla pri celicah *R. fascians* (20669) (Slika 17).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pri našem delu smo iskali mikroorganizem, ki bi reduciral EBK1 v EBZ2, in sicer z večjim izkoristkom, kakor so opisali v patentu WO 2009/032264 A1 (6% konverzija z *R. fascians* (20669)). Na osnovi patenta US št. 6,133,001 smo izbrali mikroorganizme, ki so reducirali skupino keto EBK2 (nebenziliran ezetimib). Te mikroorganizme smo naročili iz nemške zbirke mikroorganizmov DSMZ in jih uporabili za ketoredukcijo EBK1 v EBZ2.

Bakterija *R. rhodochrous* (43302) pretvarja EBK1 s ketoredukcijo v EBZ2.

Teste smo izvajali z rastočimi celicami in z mirujočimi celicami. Mirujoče celice smo obravnavali kot izolirane celice mikroorganizma (mokre biomase) iz gojišča, katerim dodamo fosfatni pufer ter želen substrat. Čeprav smo v začetnem poskusu sicer dobili 38% konverzijo EBK1 v EBZ2 z rastočimi celicami, z mirujočimi celicami pa le 26%, smo nadaljne poskuse opravili z mirujočimi celicami. Razlog za to je v tem, da je delo z mirujočimi celicami s plati tehnologije bolj enostavno. Pri delu z mirujočimi celicami je možnost kontaminacije manjša, reakcijski mešanici lahko dodajamo sveže celice, poleg tega pa lahko v fazi priprave mirujočih celic s substratom ali s homologi induciramo specifične encimske sisteme, celice namnožimo do večje koncentracije/ml ali pa jih po gojitvi »zgostimo« z eliminacijo gojišča. Gojenje lahko prekinemo, ko so celice v najprimernejši fazi rasti, oziroma stanju primernemu za načrtovano uporabo. To dosežemo z reguliranjem fizikalno-kemijskih razmer gojenja, sestavo gojišča, načinom vodenja procesa rasti. S tem lahko dosežemo na primer višji potencial za nujno regeneracijo kofaktorjev, lahko pa tudi večamo odpornost celic proti reagentom in/ali produktom.

Primerjali smo celice obdelane na način predstavljen v točki 3.3.10. Domnevali smo, da bo pri obdelanih celicah lažji prehod substrata v celico in s tem izboljšana konverzija.

V našem poskusu je HPLC-analiza pokazala, da je pri celicah obdelanih s toluenom, tako pri *R. rhodochrous* (43302) kakor tudi *R. fascians* (20669), slabša konverzija EBK1 v EBZ2 v primerjavi z neobdelanimi vzorci mirujočih celic. Pri celicah *R. fascians* (20669) konverzija ne doseže 10%, medtem ko konverzija pri celicah *R. rhodochrous* (43302) doseže 53% po 120 urah na stresalniku. Glede na HPLC-analizo smo ugotovili, da je toluen negativno vplival na delovanje celotnega encimskega sistema celice ter s tem

onemogočil boljšo konverzijo substrata EBK1 v EBZ2. Razlogi za to so v lastnostih toluena in njegovem delovanju. Toluен je nepolarna molekula. Kot tako se vrine med membranske lipide in v majhnih količinah povzroči nastanek por, skozi katere je olajšan prehod substrata v celico. Vendar v prevelikih količinah toluena pride do razpada esencialnih membranskih funkcij, inaktivacije ali denaturacije encimov vezanih na membrano ter tudi do razpada in propada celice (Dupont in Clark, 1991).

Pri celicah obdelanih z ultrazvokom (25% amplituda ter s hitrostjo 0,5 cikla), tako pri *R. rhodochrous* (43302) kakor tudi *R. fascians* (20669), je bila konverzija EBK1 v EBZ2 slabša kakor pri neobdelanih mirujočih celicah. Pri celicah *R. fascians* (20669) konverzija ne doseže 10%, medtem ko je konverzija v primeru celic *R. rhodochrous* (43302) po 96 urah 36,1% in po 120 urah ter dodatku celic 56,1%.

Ultrazvok deluje tako, da pretvarja električno napetost standardne frekvence 50/60 Hz v visokofrekvenčno napetost ter jo nato s prevornikom spreminja v mehanske vibracije. Vibracije v tekočini ustvarijo mikroskopske mehurčke, ki se razširjajo ob negativnem pritisku in močno implodirajo ob pozitivnem pritisku. Ta pojav povzroči udarne valove v tekočini, stranska učinka sta povišana pritisk in temperatura (High intensity ..., 2004). Udarni valovi povzročijo močne strižne sile, ki lahko povzročijo razpad celične membrane, oziroma nastanek por v membrani, če je obdelava z ultrazvokom narejena v dovolj kratkem času in pri pravšnji amplitudi. Ker razpada celic nismo opazili, sklepamo, da je prišlo predvsem do neletalnih poškodb membrane ter funkcionalnih sistemov (poškodba encimskih sistemov), verjetno pa tudi do stresnega odgovora celic zaradi šoka.

Celice, obdelane s Tritonom X-100 so dosegle boljšo konverzijo kakor celice pri drugih obdelavah (toluen, ultrazvok). Pri celicah *R. rhodochrous* (43302) je bila konverzija po 96 urah 70,8% po 120 urah in dodatku celic pa 78,4%. Pri celicah *R. fascians* (20669) pa je bila konverzija po 96 urah in po 120 urah le okrog 8,9%.

Triton X-100 je neionski detergent, ki znižuje površinsko napetost membrane in lahko povzroči nastanek por v celični membrani ter v dovolj veliki količini tudi lizo celice (Sigma, 1999). Pomembno je, da smo detergent Triton X100, sodeč po rezultatih, dodali v primerni količini in zato ni prišlo do obsežnejših poškodb celičnih membran.

Celice, ki jih nismo obdelali, so omogočile v primerjavi z vsemi obdelavami najboljšo konverzijo tako pri *R. rhodochrous* (43302), kakor tudi pri *R. fascians* (20669). Pri *R. rhodochrous* (43302) je bila v neobdelanih celicah konverzija po 96 urah 76,2%, po 120 urah in dodatku celic pa 82,5%. V neobdelanih celicah *R. fascians* (20669) pa je bila konverzija po 96 urah 62,2% ter po 120 urah 65,3%.

Bakterijske celice imajo na voljo, za razliko od evkariontskih celic, samo eno membrano, če zunanje membrane pri po Gramu negativnih bakterijah zaradi njenih specifičnih lastnosti in samo posrednega stika s citoplazmo ne upoštevamo. Ohranjanje delovanja sistemov, ki so povezani z membrano, med drugimi tudi ohranjanje ustreznega elektrokemijskega potenciala membrane (redoks reakcije, sklopljene reakcije, vzdrževanje pH vrednosti), je ključno za ohranitev delovanja bakterijskih oksidoreduktaz. Najbolj očitno zaradi zmožnosti – nezmožnosti regeneracije kofaktorjev oksidoreduktaz. V nadaljnjih raziskavah bi to lahko potrdili, ali ovrgli, in sicer s poskusom, v katerem bi dodajali NADH in NADPH ter ugotavliali, če kljub uničenju celične membrane ohranimo delovanje ketoreduktaze.

Izvedli smo tudi poskus, pri katerem smo v reakcijsko mešanico po 96 urah dodali mirujoče celice istega seva iz zamrzovalnika. Aktivnost se je sicer povišala, vendar ne proporcionalno glede na dodano biomaso.

Ena od možnih razlag je, da smo celice z zamrzovanjem poškodovali. Znano je, da viabilnost celic z zamrzovanjem in odtajanjem hitro pada (počasno zamrzovanje povzroči nastanek relativno velikih kristalov vode). Pri počasnem zamrzovanju celic nastanejo pogoji, ki okoli celičnih struktur močno povišajo ali znižajo vrednosti pH ter lokalno povečajo tudi ionsko jakost, kar ponovno lahko privede do denaturacije ali drugih poškodb – kemijskih sprememb celičnih beljakovin ter drugih struktur.

Druga razlaga se nanaša na delovanje in kinetiko encimskih reakcij. Lahko da je prišlo do inhibicije reakcije zaradi akumulacije produkta. Za poskus, s katerim bi preverili, če je encimski sistem še aktiven, bi najprej s pomočjo ultra-filtriranja reakcijske mešanice odstranili produkt. Nato bi dodali nov substrat in merili aktivnost. V sistemu se lahko inaktivira tudi regeneracija kofaktorjev, kar bi lahko preverili tako, da bi v reakcijsko mešanico dodali NADH in NADPH. V reakcijski mešanici se lahko inaktivira tudi encim. Če je inaktiviran encim, bi v sistem dodali sveže (nezamrznjene) celice, za katere vemo, da

so encimsko aktivne. V primeru pozitivne redukcije bi to pomenilo, da se je encim inaktiviral po določene času ali v določenih razmerah.

Kot rečeno, je najboljši odstotek konverzije EBK1 v EBZ2 pri neobdelanem vzorcu celic *R. rhodochrous* (43302) po 120 urah ter dodatku zamrznjenih mirujočih celic istega seva. Odstotek konverzije v tem primeru je bil 82,5%. Več kakor 70% konverzijo EBK1 v EBZ2 so dosegli tudi vzorci brez dodanih celic in sicer *R. rhodochrous* (43302), ki je bil obdelan s tritonom X-100 (70,8% konverzija) ter neobdelane celice *R. rhodochrous* (43302) (76,2% konverzija). Prav tako so celice *R. rhodochrous* (43302) dosegle visoko konverzijo EBK1 v EBZ2 po obdelavi celic s tritonom X-100 in z dodatkom biomase (78,4% konverzija).

Celice *R. fascians* (20669) pa niso dosegle večje konverzije od 70%. Najvišjo konverzijo smo z njimi dosegli v laboratorijskem poskusu s stresano reakcijsko mešanico neobdelanih celic, in sicer 65,3% po 120 urah inkubacije.

Glede na to, da smo v reakcijsko mešanico dali enako količino mokre biomase obeh sevov, lahko govorimo, da so rezultati kvantitativno primerljivi. Celice *R. rhodochrous* (43302) so za 20% učinkovitejše od *R. fascians* (20669).

Razlogi za boljšo konverzijo so lahko v tem, da so encimi celic *R. rhodochrous* (43302) strukturno drugačni in s tem pripomorejo k boljši konverziji. Celice *R. rhodochrous* (43302) imajo lahko tudi boljše sisteme za regeneracijo kofaktorjev, ki zdrži dlje časa in s tem omogoča encimu normalno delovanje, ali pa lahko celice *R. rhodochrous* (43302) proizvedejo več encima, oziroma več različnih encimov z isto specifičnostjo.

Naredili smo tudi test na rastočih celicah. Na rastočih celicah *R. fascians* (20669) je bila konverzija 23,2% po 96 urah in 28,7% po 120 urah. V primeru rastočih celic *R. rhodochrous* (43302) pa je konverzija po 96 urah 14,3% in po 120 urah le še 10,6%.

Konverzija glede na težo mokre biomase pa je pri mirujočih celicah manjša kakor pri rastočih celicah. Konverzija glede na maso celic je tako pri *R. rhodochrous* (43302) manjša za najmanj 2,3-krat ter 13-krat pri *R. fascians* (20669).

Zanimiva je tudi primerjava med testi na začetku in koncu raziskave, saj smo dobili v prvotnih poskusih boljšo konverzijo pri rastočih celicah kakor pri mirujočih, v

nadaljevanju pa ravno obratno. Gre za to, da smo metodo za učinkovito vzgojo celic v bioreaktorju razvili šele v nadaljevanju. Navidezne razlike v konverziji so predvsem na račun večje ali manjše gostote celične populacije v reakcijski zmesi. V laboratorijskih bioreaktorjih smo celice namnoževali v kontroliranih razmerah (pH), prav tako pa je bilo prezračevanje intenzivnejše kakor v steklenicah.

Idealno iz vidika industrijske uporabe bi bilo, da bi imeli rastoče celice, ki že med rastjo v bioreaktorju reducirajo substrat v produkt. To nam je uspelo, vendar je bil izkoristek redukcije premajhen. To bi lahko dosegli tako, da bi optimizirali gojišče ter vodenje biosinteze in s tem pripomogli h gostejši populaciji rastočih celic. Uporabljenе seve bi lahko tudi genetsko spreminjaли z vstavljanjem genov za encim, kloniranjem, povečevanjem ekspresije genov, in tako dosegli višjo aktivnost na enoto biomase.

Omejitve takega dela pa se kažejo predvsem v času, ki ga porabimo za izvedbo genskih manipulacij. Poleg tega obstaja tudi tveganje, da nam z genskim manipuliranjem sevov ne uspe zadostno izboljšati redukcije in tako je končni rezultat negotov. Zaradi kompleksnosti encimskega sistema, ki za delovanje potrebuje tudi regeneracijo kofaktorjev, pa bi bila potrebna dvojna genska manipulacija, da bi encimski in podporni sistem delovala zadostno. Cene take manipulacije so visoke in porabljen čas pomeni tudi manj dobička v industriji, saj dlje kot delamo na potencialno zanimivem postopku, manj dobička lahko pričakujemo.

Zato so bile mirujoče celice naše izhodišče, kajti z delom na mirujočih celicah prihranimo prostor, čas in zmanjšamo strošek dela.

V nadalnjem delu se bo potrebno osredotočiti na razvoj tehnologije ter realizacijo začetih zamisli, kot so:

- optimizirati tehnike obdelave celic tako, da ne bi vplivali na funkcionalnost celičnega in encimskega sistema,
- v začetnem stanju v reakcijsko mešanico dati večjo količino mirujočih celic,
- spremljati reduktazno aktivnost v manjšem časovnem intervalu ter tako ugotoviti v kakšnem najkrajšem možnem času pride do maksimalne redukcije substrata,
- dodajati sveže izolirane celice in ne zamrznjenih, saj smo ugotovili, da zamrzovanje negativno vpliva na celice,

- preveriti, kaj vpliva na nepopolno redukcijo (neaktivnost encima, nezadostna regeneracija kofaktorjev, ...),
- preveriti vpliv produkta na potek encimske reakcije.

5.2 SKLEPI

Naši sklepi so sledeči:

- Odkrili smo, da bakterija vrste *R. rhodochrous* (43302) reducira substrat EBK1 v EBZ2 1,2-krat boljše od celic *R. fascians* (20669).
- *R. rhodochrous* (43302) po znanih podatkih za ta proces, to je redukcijo EBK1 v EBZ2, ni patentno zaščitena.
- Mirujoče in neobdelane celice bakterij *R. rhodochorus* (43302) in *R. fascians* (20669) so glede na delež konverzije EBK1 v EBZ2 najmanj tako učinkovite kakor rastoče celice.
- Celice bakterij z nepoškodovano celično membrano so zagotavljale boljše delovanje ketoreduktaznega sistema kakor celice s permeabilizirano membrano.
- Dodatek biomase oziroma encima omogoči nadaljevanje reakcije; sistem pa je potrebno izboljšati ter preveriti učinek kontinuirnega dodajanja sveže, aktivne biomase.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo poskušali v laboratoriju najti, poleg že znanega mikroorganizma *R. fascians* (20669) (glede na patent WO 2009/032264 A1), druge mikroorganizme, ki opravljajo konverzijo EBK1 v EBZ2 z istim ali večjim izkoristkom. Konverzijo smo preučevali z rastočimi in mirujočimi celicami.

Glede na US patent št. 6,133,001, ki opisuje uporabo različnih mikroorganizmov za biotransformacijo EBK2 v EBZ1 (uporaba nebenziliranega ezetimiba), smo naročili seve iz DSMZ. Le te smo revitalizirali ter uporabili za preskus redukcije EBK1 v EBZ2 (benziliranega ezetimiba). Preskus redukcije smo opravljali v dveh gojiščih, in sicer v IG11 ter YPD. Prav tako smo preverili uporabo tekočih gojišč (rastočih celic) ter uporabo mirujočih celic. En sev je opravljal redukcijo EBK1 v EBZ2 tako v tekočem gojišču, kakor tudi na mirujočih celicah. Dosegli smo 6-krat večjo konverzijo benziliranega ezetimiba z *R. rhodochrous* (43302) kakor so jo opisuje US patent št. 6,133,001 z nebenziliranem ezetimibom z *R. fascians* (20669).

Namnožene celice *R. rhodochrous* (43302) in *R. fascians* (20669) smo izolirali iz celične kulture. Celice smo razdelili v enakomerne odmerke, ki smo jih različno obdelali. Celice smo obdelali z ultrazvokom, toluenom ter tritonom X-100. Dodali smo jim fosfatni pufer ter substrat.

Glede na HPLC-analizo je najboljši odstotek konverzije EBK1 v EBZ2 kazal neobdelan vzorec celic *R. rhodochrous* (43302) po 120 urah na stresalniku ter dodatku zamrznjenih celic *R. rhodochrous* (43302). Odstotek konverzije v tem primeru je bil 82,5%. 70% konverzijo EBK1 v EBZ2 so presegli tudi vzorci brez dodanih celic, in sicer *R. rhodochrous* (43302), ki je bil obdelan s tritonom X-100 (70,8% konverzija) ter neobdelane celice *R. rhodochrous* (43302) (76,2% konverzija). Prav tako so celice *R. rhodochrous* (43302) dosegle visoko konverzijo EBK1 v EBZ2 po obdelavi celic s tritonom X-100 in dodatkom celic (78,4% konverzija).

Celice *R. fascians* (20669) pa niso dosegle večje konverzije od 70%. Najvišja konverzija je bila pri celicah *R. fascians* (20669), ki so bile neobdelane in na stresalniku 120 ur. Ta konverzija je bila 65,3%.

Pri našem delu smo odkrili nov mikroorganizem, poleg že znanega *R. fascians* (20669), ki reducira EBK1 v EBZ2. Ta mikroorganizem je *R. rhodochrous* (43302), ki smo ga naročili iz DSMZ. Za ta mikroorganizem je bilo že znano, da reducira EBK2 v EBZ1, vendar postopek še ni bil patentno zaščiten. Hoteli pa smo preveriti zmožnost redukcije EBK1 v EBZ2. Redukcija substrata z *R. rhodochrous* (43302) je uspela in bila celo precej boljša od tiste v patentu WO 2009/032264 A1, kjer so uporabili *R. fascians* (20669). V končni fazi nam je uspelo povečati konverzijo za 8-krat glede na odstotek konverzije, ki so jo opisali v patentu WO 2009/032264 A1. Ugotovili smo, da s povečanjem prehodnosti membrane ne izboljšamo redukcije.

7 VIRI

Beloqui A., Dominguez de Maria P., Golyshin P.N., Ferrer M. 2008 Recent trends in industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 240–248

Biade A.E., Bourdillon C., Lava J.M., Mairesse G., Moiroux J. 1992 Complete conversion of l-lactate into d-lactate. A generic approach involving enzymatic catalysis, electrochemical oxidation of NADH, and electrochemical reduction of pyruvate. *Journal of the American Chemical Society*, 114: 893–897

Bühler B., Park J.B., Blank L.M., Schmid A. 2008. NADH availability limits asymmetric biocatalytic epoxidation in a growing recombinant *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1436–46

Carballeira J.D., Quezada M.A., Hoyos P., Simeó Y., Hernaiz M.J., Alcantara A.R., Sinisterra J.V. 2009. Microbial cells as catalysts for stereoselective red–ox reactions. *Biotechnology Advances*, 27: 686–714

Doukyu N., Ogino H. 2009. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 48: 270–282

Drauz K., Waldmann H. 1995. Enzyme catalysis in organic synthesis. A Comprehensive Handbook. West Sussex Wiley-VCH: 504 str.

Duetz W.A., Beilen J.B., Witholt B. 2001. Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 419–425

Dupont C., Clarke A.J. 1991. In-vitro synthesis and O acetylation of peptidoglycan by permeabilized cells of *Proteus mirabilis*. *The Journal of Bacteriology*, 3: 4618–4624

Faber K. 2004 Biotransformations in organic chemistry. 4th ed. Berlin Springer, 454 str.

Faber K. 1995. Biotransformations in organic chemistry—a textbook, 2nd ed. New York Springer, 356 str.

Fontanille P., Larroche C. 2003. Optimization of isonovalal production from α-pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 534–540

Goldberg K., Schroer K., Lütz S., Liese A. 2007. Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76: 237–248

Grogan G. 2009. Practical Biotransformations: A Beginner's Guide. Chichester, West Sussex, Wiley: 344 str.

Harwood L.M., Moody C.J., Percy J.M. 1999. Experimental organic chemistry; standard and microscale. 2nd edition. London, Blackwell science: 716 str.

High intensity ultrasonic processor with temperature controller, Autotune series: User guide. 2004. Newtown, Sonics & Materials Inc.: 30 str.

Hollmann F., Schmid A. 2004. Electrochemical regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions. *Biocatalysis and Biotransformation* 22: 63–88

Hollmann F., Schmid A., Steckhan E. 2001. The first application of a monooxygenase employing indirect electrochemical NADH regeneration. *Angewandte Chemie International Edition*, 40: 169–71

Inoue A., Horikoshi K.A. 1989. *Pseudomonas putida* thrives in high concentration of toluene. *Nature*, 338: 264–266

Lee J.Y., Choi Y.B., Kim H.S. 1993. Simultaneous biodegradation of toluene and *p*-xylene in a novel bioreactor: Experimental results and mathematical analysis. *Biotechnology Progress*, 9: 46–53

León R., Fernandes P., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S. 1998. Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 483–500

Liang J., Jenne S.J., Mundorff E., Ching C., Gruber J.M., Krebber A., Huisman G.W. 2009. Ketoreductase polypeptides for the reduction of acetophenones. Patent number US 2009/0191605 A1

Meyers C.L.F., Meyers D.J. 2008. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. Wiley Online library. John Wiley & Sons, Inc.
(<http://www.currentprotocols.com/protocol/nca03d>) (13. maj 2010)

Michels A., Puetz A., Maurer K.H., Eggert T., Jaeger K.E., 2007. Use of esterases for separating plastics. Patent number WO 2007017181

NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide). 2004-2008. China GreatVista Chemicals. (<http://www.greatvistachemicals.com/nutritional-supplements/NADH-nicotinamide-adenine-dinucleotide.html>) (15. maj 2010)

Nanba H., Takaoka Y., Hasegawa J. 2003. Purification and characterization of an α -haloketone-resistant formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. strain KNK65MA, and cloning of the gene. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 67: 2145–2153

Nanduri V.B., Banerjee A., Howell J.M., Brzozowski D.B., Eiring R.F., Patel R.N. 2000, Purification of a stereospecific 2-ketoreductase from *gluconobacter oxydans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25: 171-175

Ni Y., Chen R.R. 2004. Accelerating Whole-Cell Biocatalysis by Reducing Outer Membrane Permeability Barrier. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 6: 804-811

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2002. *Microbiology*. 5th ed. New York, McGraw-Hill: 1135 str.

Rosenblum S.B., Dugar S., Burnett A.D., Clader J.W., McKittrick B.A. 1997. Hydroxy-substituted azetidinone compounds useful as hypcholesterolemic agents. Patent number US 5,631,365

Schmid A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409: 258-268

Senkovich O., Speed H., Grigorian A. 2005. Crystallization of three key glycolytic enzymes of the opportunistic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1750, 2: 166–72

Shaked Z., Whitesides G.M. 1980. Enzyme-Catalyzed Organic Synthesis: NADH Regeneration Using Formate Dehydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*, 102: 7104-7105

Shranjevanje mikroorganizmov. 2007. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko.
(http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/studij/dodipl/mikro/bologna2008/shranjevanje_8.htm)
(14. maj 2010)

Sigma. 1999. Product information: Triton X-100. Sigma, ckv 4/21/99.

Simon H., Bader J., Gunther H., Neumann S., Thanos J. 1985. Chiral Compounds Synthesized by Biocatalytic Reductions: New Synthetic Methods (51). *Angewandte Chemie International Edition English*, 24: 539–553

Taglieber A., Schulz F., Hollmann F., Rusek M., Reetz M.T. 2008. Light-driven biocatalytic oxidation and reduction reactions: scope and limitations. *ChemBioChem*, 9: 565–572

Wang Z., Zhao F., Chen D., Li D. 2006. Biotransformation of phytosterol to produce androsta-diene-dione by resting cells of *Mycobacterium* in cloud point system. *Process Biochemistry*, 41: 557–561

Weckbecker A., Gröger H., Hummel W. 2009. Regeneration of Nicotinamide Coenzymes: Principles and Applications for the Synthesis of Chiral Compounds. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 120: 195-242

Woodley J. 2006. Choice of biocatalyst form for scalable processes. *Biochemical Society Transactions*, 34, 2: 301–303

Wykes J.R., Dunnill P., Lilly M.D. 2004. Cofactor recycling in an enzyme reactor. A comparison using free and immobilized dehydrogenases with free and immobilized NAD. *Biotechnology and Bioengineering*, 17, 1: 51–68

Zetia (Ezetimibe). 2008. MedicineNet. (<http://www.medicinenet.com/ezetimibe/article.htm>)
(20. maj 2010)

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem delovnemu mentorju dr. Alešu Gaspariču in mentorici prof. dr. Romani Marinšek-Logar, ki sta mi ponudila priložnost opravljanja praktičnega dela diplomske naloge na oddelku za biokemijo v Krki d.d., Novo mesto. Prav tako sta mi nudila vso pomoč pri sestavi in poteku dela ter pripravi in pregledu besedila.

Prof. dr. Tomu Turku se zahvaljujem za strokoven in natančen pregled diplomske naloge v vlogi recenzenta.

Iskrena hvala tudi gospodični Petri Ljubi za pomoč pri delu, za vse koristne napotke in nasvete ter dobro družbo med opravljanjem praktičnega dela. Zahvala gre tudi vsem ostalim zaposlenim na oddelku za biokemijo v Krki d.d. za razumevanje in pomoč.

Iskrena hvala tudi moji družini, punci Jasni ter vsem prijateljem, ki so mi vedno stali ob strani.