

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Brigita RADOVAN

**OSAMITEV MIKROORGANIZMOV Z IZBRANIMI
ENCIMSKIMI AKTIVNOSTMI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Brigita RADOVAN

OSAMITEV MIKROORGANIZMOV Z IZBRANIMI ENCIMSKIMI
AKTIVNOSTMI

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ISOLATION OF MICROORGANISMS WITH SELECTED ENZYME
ACTIVITIES

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa mikrobiologije. 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.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Romana Marinšek Logar, za somentorja dr. Aleš Gasparič in za recenzenta pa prof. dr. Tom Turk.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Somentor: dr. Aleš Gasparič

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za zagovor in oceno:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

Somentor: dr. Aleš GASPARIČ
Novo mesto, Krka d.d. tovarna zdravil Novo mesto

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Brigita Radovan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 579.222:577.151.5:628.3 (043) = 163.6
KG mikroorganizmi/encimi/biotransformacije/biokataliza/presejalni testi/nitrilaze/esteraze/monooksigenaze/o-demetilaze/odpadne vode/encimska aktivnost
AV RADOVAN, Brigita
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/GASPARIČ, Aleš (somentor)/TURK, Tom (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2009
IN OSAMITEV MIKROORGANIZMOV Z IZBRANIMI ENCIMSKIMI AKTIVNOSTMI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 61 str., 9 pregl., 37 slik, 46 vir.
IJ SI
JI SI/En
AL Encimi omogočajo potek metabolnih poti v mikroorganizmih. Preverili smo prisotnost mikroorganizmov z o-demetilaznimi, monooksigenaznimi, esteraznimi in nitrilaznimi encimi v okolju. Okoljske vzorce smo obogatili v minimalnem gojišču z dodatkom selektivnih substratov. Presejanje poteka s prehrabnimi substrati (vir C in N), ki jih ustrezni encimi razgradijo do enostavnejših sestavin uporabnih kot vir hranil in gradbenih sestavin celice. Kulture smo precepili na trdna gojišča in preverili rast. S presejalnimi testi smo kvantitativno ovrednotili encimske aktivnosti kot posledico pretvorbe substratov in nastanka obarvanega ali fluorescirajočega produkta. O-demetilazno aktivnost smo odkrili pri 29 sevih, ki smo jih identificirali s uporabo sistema API in CRYSTAL. Najbolj aktiven encim ima *Comomonas testosteroni* s specifično aktivnostjo 3,696 $\Delta A/g$ mol. Pri *M. lutues*, *M. sedentarius*, *C. aquaticum*, *S. sanguis*, *E. aerogenes*, *S. spiritivorum*, *S. pneumoniae*, *S. maltophilia*., *P. stutzeri*, *A. denitrificans* smo identificirali o-demetilazno aktivnost, o kateri predhodno niso poročali v literaturi. Od 10 izoliranih sevov smo pri *S. uberis*, *A. faecalis*, *A. urinae*, *S. maltophilia* na novo odkrili monooksigenaznim encim. Največjo specifično monooksigenazno aktivnost ima *Stenotrophomonas maltophilia*, kar $2,07 \times 10^{-8}$ mol/g min. Esterazno aktivnost smo med 8 sevi na novo odkrili pri *S. sanguis*, *O. anthropi*, *A. urinae*, *S. uberis*. Najbolj aktiven sev je *Corynebacterium jeikerum*. Njegova specifična aktivnost je 1189,668 /g. Prisotnost nitrilaz smo med 4 sevi na novo identificirali pri *C. jeikeium* in *S. maltophilia*. Najbolj aktiven nitrilazni encim spodoben razgradnje alifatskih nitrilov smo odkrili pri *Pseudomonas aeruginosa*. Specifična aktivnost je bila 879,03 g $NH_4/$ mg proteinov v min. Ti izolirani vzorci z dokazanimi encimskimi aktivnostmi lahko pripomorejo k poenostavitvi proizvodnih procesov, njihovi ekonomičnosti, okolju sprejemljivejši sintezi organskih snovi, uničenju nezaželenih snovi, pretvorbi substrata v bolj polarno, topno ali aktivno obliko za nadaljnje procese.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 579.222:577.151.5:628.3 (043) = 163.6
CX microorganisms/enzymes/biotransformation/biocatalysis/screening/nitrilases/esterases/monooxygenases/o-demethylases/enzyme activity/waste water
AU RADOVAN, Brigita
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/GASPARIČ, Aleš(co-advisor)/ TURK, Tom (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI ISOLATION OF MICROORGANISMS WITH SELECTED ENZYME ACTIVITIES
TD Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 61 p., 9 tab., 37 fig., 46 ref.
LA SI
AL sl/en
AB Enzymes are catalysts in living cells. The purpose of the research was screening of environment samples for the biocatalysts with o-demethylase, monooxygenase, esterase and nitrilase enzymes. Use of small substrate concentrations in growth media allows a selective induction, enrichment with monitoring and analyses using different sensitive screening tests. The use of carefully selected substrate results in either colored or fluorescent quantification of products. This way we were able to identify microorganisms with o-demethylase, monooxygenase, esterase and nitrilase enzyme activities. We isolated 29 microorganisms with an active o-demethylase activity. Isolation was made with API and CRYSTAL identification systems. The most active enzyme was detected in *Comomonas testosteroni* with specific enzyme activity of 3,696 ΔA/g mol. In *M. lutues*, *M. sedentarius*, *C. aquaticum*, *S. sanguis*, *E. aerogenes*, *S. spiritivorum*, *S. pneumoniae*, *S. maltophilia*, *P. stutzeri* and *A. denitrificans* enzyme activity has not been previously reported in scientific literature. 10 monooxygenase active strains *S. uberis*, *A. faecalis*, *A. urinae* and *S. maltophilia* have not been previously reported as active. The specific activity of *Stenotrophomonas maltophilia* is the highest from all ($2,07 \times 10^{-8}$ mol/g min). Esterase activity was newly discovered in *S. sanguis*, *O. anthropi*, *A. urinae* and *S. uberis*. *Corynebacterium jeikerum* has the most active enzyme from all of organisms studied (1189,668 /g). The presence of nitrilase was indentified in *C. jeikeium* and *S. maltophilia* and previously not reported in the literature. The most active nitrilase strain is *Pseudomonas aeruginosa* showing the specific activity of 879,03 g NH₄/ mg proteins min. Simple environment samples allow discoveries of new microorganisms with enzyme activities, identification of new enzyme types and new metabolic pathways. The power of this method is to create an ideal biocatalyst for the majority of applications used in the industry and in the field of science.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 GLAVNE HIPOTEZE IN NAMEN DELA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKROORGANIZMI KOT VIR ENCIMOV	3
2.2 PRESEJALNI TESTI ZA IZOLACIJO MIKROORGANIZMOV.....	3
2.2.1 GOJITVENE TEHNIKE	4
2.2.1.1 Standardne gojitvene metode.....	4
2.2.1.2 Presejalne metode na osnovi selekcije.....	4
2.2.1.3 Presejalne metode z detekcijo produkta.....	4
2.2.1.4 Selektivna substratna ali produktna vezava na protein	5
2.2.1.5 Kromogeni in fluorometrični testi	5
2.2.1.6 Genetske presejalne metode.....	6
2.2.2 OBOGATITEV IN SELEKCIJA MIKROORGANIZMOV Z INDUKTORJI	7
2.2.3 ENCIMI V ORGANSKI SINTEZI.....	7
2.3 O-DEMETILAZE	10
2.3.1 UPORABA O-DEMETILAZ.....	10
2.3.2 METODE ZA DOLOČANJE O-DEMETILAZ	11
2.4 MONOOKSIGENAZE	11
2.4.1 UPORABA MONOOKSIGENAZ.....	12
2.4.2 METODE ZA DOLOČANJE MONOOKSIGENAZ	12
2.5 ESTERAZE.....	13
2.5.1 UPORABA ESTERAZ IN LIPAZ.....	13
2.5.2 METODE ZA DOLOČANJE ESTERAZNIH ENCIMOV	14
2.6 NITRILAZE.....	14
2.6.1 UPORABA NITRILAZ.....	15
2.6.2 METODE ZA DOLOČANJE NITRILAZ.....	16
2.7 BIOTRANSFORMACIJE	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 VZORCI	19
3.2 MATERIALI	19
3.2.1 RAZTOPINE	19
3.2.2 KEMIKALIJE.....	20
3.2.3 GOJIŠČA.....	21
3.2.3.1 Mineralno gojišče MING.....	21
3.2.3.2 Mineralno gojišče M9	21
3.2.3.3 Trdno Luria-Bertani (LB) gojišče	22

3.2.4	OPREMA.....	22
3.3	METODE.....	23
3.3.1	ŽELIRNO SREDSTVO GELRITE® GELLAN GUM.....	23
3.3.2	O-DEMETILAZE.....	23
3.3.2.1	Določanje o-demetilazne encimske aktivnosti.....	23
3.3.2.2	Kvalitativni test o-demetilazne aktivnosti.....	24
3.3.2.3	Določanje mase suhe snovi.....	24
3.3.2.4	O-demetilazne aktivnosti in specifična o-demetilazna aktivnost.....	24
3.3.3	MONOOKSIGENAZE.....	25
3.3.3.1	Določanje monooksigenazne aktivnosti.....	25
3.3.3.2	Aktivnost in specifična monooksigenazna aktivnost.....	25
3.4	Esteraze.....	26
3.4.1	MERJENJE ESTERAZNE AKTIVNOSTI.....	26
3.4.2	RASTNE KRIVULJE IZOLIRANIH SEVOV Z ESTERAZNO AKTIVNOSTJO.....	27
3.4.3	SPECIFIČNA ESTERAZNA AKTIVNOST.....	27
3.4.4	DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V VZORCU Z BRADFORDOVIM REAGENTOM.....	27
3.5	Nitrilaze.....	28
3.5.1	DOLOČANJE AMONIKA V VZORCU.....	28
3.5.1.1	Priprava mirujočih celic.....	30
3.5.1.2	Nastanek amoniaka v mirujočih celicah.....	30
3.5.1.3	Nitrilazna aktivnost in specifična nitrilazna aktivnost.....	30
3.6	IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH MIKROORGANIZOV.....	31
4	REZULTATI.....	32
4.1	ŽELIRNO SREDSTVO GELRITE® GELLAN GUM.....	32
4.2	O-DEMETILAZE.....	33
4.2.1	ABSORBANCA IN AKTIVNOST O-DEMETILAZNIH ENCIMOV.....	33
4.2.1.1	Rast in encimska aktivnost <i>C. testosteroni</i> z o-demetilazno aktivnostjo ..	34
4.2.1.1.1	Rast mikroorganizma <i>C. testosteroni</i> z o-demetilazno aktivnostjo	34
4.2.1.1.2	Merjenje spremembe absorbance mikroorganizmov z o-demetilazno aktivnostjo v rastočih kulturah na gojišču MING z dodatkom MBA	34
4.2.2	SPECIFIČNA AKTIVNOST IN RASTNA KRIVULJA O-DEMETILAZNEGA ENCIMA PRI <i>C. TESTOSTERONI</i> NA GOJIŠČU MING Z DODATKOM MBA.....	35
4.3	MONOOKSIGENAZE.....	36
4.3.1	UMERITVENA KRIVULJA ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE INDIGA ..	36
4.3.2	SPECIFIČNA MONOOKSIGENAZNA ENCIMSKA AKTIVNOST.....	36
4.4	ESTERAZE.....	37
4.4.1	ESTERAZNA AKTIVNOST.....	37
4.4.2	RAST IN ESTERAZNA AKTIVNOSTI SEVA <i>C. JEIKERUM</i>	40
4.4.3	RAST MIKROORGANIZMA <i>C. JEIKERUM</i> NA GOJIŠČU MING Z DODATKOM ETIL LINOLEATA.....	40
4.4.4	KOLIČINA IZVENCELIČNIH PROTEINOV V SUPERNATANTU VZORCA ..	40
4.4.4.1	Hitrost pretvorbe substrata pri <i>C. jeikerum</i> z esterazno aktivnostjo.....	41
4.4.4.2	Specifična esterazna aktivnost in rast seva <i>C. jeikerum</i> z esterazno aktivnostjo na gojišču MING z dodatkom etil linoleata.....	41
4.4.5	DOLOČANJE PROTEINOV Z BRADFORDOVIM TESTOM.....	42
4.4.5.1	Umeritvena premica za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu	42
4.5	NITRILAZE.....	43
4.5.1	SPECIFIČNA NITRILAZNA AKTIVNOST IZOLATOV NA RAZLIČNIH SUBSTRATIH.....	43
4.5.2	PRODUKCIJA AMONIKA V MIRUJOČIH CELICAH.....	45

4.6 PREGLED ŠTEVILA ZNANSTVENIH OBJAV ZA IDENTIFICIRANE SEVE Z ENCIMSKO AKTIVNOSTJO.....	46
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
5.1 RAZPRAVA.....	48
5.2 SKLEPI	53
6 POVZETEK.....	54
6.1 POVZETEK.....	54
6.2 SUMMARY.....	55
7 VIRI.....	56
ZAHVALE	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Selektivna substratna ali produktna vezava na proteine (Reymond, 2006)	5
Slika 2: Kromogeni in fluorescenčni signal v mikrotitrski plošči (Reymond, 2006)	6
Slika 3: Zaznavanje encimske aktivnosti z genetskimi metodami (Lorenz in sod., 2002)	6
Slika 4: Uporaba encimov za biotransformacije (Plummer, 1987).....	7
Slika 5: Pretvorba vanilata v protokatehuat (Genom.net, 2007)	10
Slika 6: Metanska monooksigenaza (levo) in alkalna monooksigenaza (desno) (Li in sod., 2008; Lieberman in Rosenzweig, 2005)	11
Slika 7: Razgradnje triptofana z monooksigenazami (Genome.net, 2007).....	12
Slika 8: Struktura encima acetilholin esteraze (Bornscheuer in sod., 1999).....	13
Slika 9: Biosinteza S-naproksena z NP-esterazo (Faber, 1999).....	14
Slika 10: Nitrilazna reakcija (cepitev nitrila do ustrezne karboksilne kisline in amoniaka).....	14
Slika 11: Cianid razgrajajoča nitrilaza iz <i>Bacillus pumilus</i> (Martínková in sod., 2008)	15
Slika 12: Shema poiskusov in delo v nalogi	18
Slika 13: Pretvorba 4-metoksi-3-nitrobenzojske kisline z o-demetilazami	24
Slika 14: Pretvorba indola v indigo z monooksigenazami.....	25
Slika 15: Pretvorba etil linoleata v linolno kislino z esteraznim encimom.....	26
Slika 16: Pretvorba acetonitrila v osetno kislino in amoniak z nitrilaznim encimom	28
Slika 17: Vpliv koncentracije ionov (ionske jakosti) na trdnost želirnega sredstva gelrite	32
Slika 18: Specifične aktivnosti mikroorganizmov z o-demetilaznim encimom izoliranih na gojišču MING z dodatkom MBA	33
Slika 19: Rastna krivulja mikroorganizma <i>C. testosteroni</i> z o-demetilazno aktivnostjo	34
Slika 20: Aktivnost <i>C. testosteroni</i> z o-demetilazno aktivnostjo na gojišču MING z dodatkom MBA	35
Slika 21: Specifična encimska aktivnosti in rastna krivulja <i>C. testosteroni</i> z o-demetilazno aktivnostjo na gojišču MING in dodatkom MBA	35
Slika 22: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije indiga v vzorcu	36
Slika 23: Specifična encimska aktivnost izolatov z monooksigenazno aktivnostjo iz gojišča MING+indol	36
Slika 24: Pretvorba obarvanega kompleksa kot posledica delovanja esteraznega encima	38
Slika 25: Pretvorba obarvanega kompleksa in recesijske premice delovanja esteraznega encima.....	38
Slika 26: Specifične esterazne aktivnosti sevov izoliranih iz gojišča MING z dodatkom etil linoleata	39
Slika 27: Rastna krivulja seva <i>C. jeikerum</i> z esteraznim encimom na gojišču MING z etil linoleatom	40
Slika 28: Količina izvenceličnih proteinov v supernatantu kulture inokulirane z <i>C. jeikerum</i>	40
Slika 29: Pretvorba substrata med rastjo seva <i>C. jejuni</i> z esterazno aktivnostjo	41

Slika 30: Specifična esterazna aktivnost in rastna krivulja <i>C. jeikerum</i> na gojišču MING z etil linoleatom	42
Slika 31: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov z Bradfordovim reagentom	42
Slika 32: Specifična nitrilazna aktivnost izolatov v gojišču MING z dodatkom AcN.....	43
Slika 33: Specifična nitrilazna aktivnost izolatov v gojišču MING z benzonitrilom.....	44
Slika 34: Specifična nitrilazna aktivnost izolatov v gojišču MING s propionitriom	44
Slika 35: Primerjava specifične encimske aktivnosti izolatov na gojišču MING z Acn, benzN ali propN	45
Slika 36: Nitrilazna aktivnost mirujočih celic <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in <i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
Slika 37: Izolirani sevi z encimskimi aktivnostmi in obstoječa poročila o njihovi aktivnosti v znanstveni literaturi.....	47

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Biokatalitične presejalne tehnike (Bommarius, 2004)	5
Preglednica 2: Industrijska uporaba encimov (Kirk in sod., 2002).....	9
Preglednica 3: Sestava mineralnega gojišča MING.....	21
Preglednica 4: Sestava mineralnega gojišča M9	21
Preglednica 5: Sestavine LB gojišča	22
Preglednica 6: Identificirani sevi z aktivnim monooksigenaznim encimom	37
Preglednica 7: Identificirani sevi z aktivnim esteraznim encimom	39
Preglednica 8: Sevi z aktivnim nitrilaznim encimom	45
Preglednica 9: Pregled identificiranih sevov in njihovo pojavljanje v znanstveni literaturi	46

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₄₀₅	absorbanca pri 405 nm
4-MNBA	3-nitro-4metokibenzoatu
AcN	acetonitril
ATP	adenozin trifosfat
BenzN	benzonitril
BSA	goveji serumski albumin
ČN	čistilna naprava
DDDV	5,5-dehidroksivanilinske kisline
ddH ₂ O	destilirana in demineralizirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EC	encimska razporeditev po nomenklaturi mednarodnega komiteja za biokemijo in molekularno biologijo
gelrite	želirno sredstvo gelrite® gellan gum
glc	glukoza
HPLC	tekočinska kromatografija
LB	Luria-Bertanijevo gojišče
MING	mineralno gojišče
MBA	metoksibenzojska kislina
NADH	nikotinamid adenine dinukleotid fosfat
o-NPB	o-nitrofenil butirat
p-NP	p-nitrofenol
p-NPA	p-nitrofenil acetat
p-NPB	p-nitrofenil butirat
PropN	propionitril
TLC	tankoplastna tekočinska kromatografija
U	encimska enota v $\mu\text{mol}/\text{min}$

1 UVOD

Mikroorganizmi nas spremljajo v vsakdanjem življenju ter omogočajo številne procese v organizmu in v naši okolici (metabolizem, bioremediacija, fermentacija). Celice v svojih strukturah vsebujejo encime. To so katalizatorji biokemijskih reakcij, ki omogočajo hitrejšo in lažjo pretvorbo snovi ter hitrejšo vzpostavitev ravnotežja reakcij. Omogočajo hitrejši potek reakcij in nastanek produkta. Encimi imajo velik pomen za pretvorbo snovi, pridobivanje energije in gradbenih elementov.

Encime uporabljamo na različnih področjih: v pekarski, farmacevtski, pivovarski, tekstilni industriji, v medicini, kemijski sintezi in varstvu okolja. Omogočajo sintezo organskih snovi, uničenje nezaželenih snovi, pretvorbo substrata v bolj topne, aktivne in polarne oblike ter sodelujejo pri fermentacijah. Za uporabo v industrijskih procesih je potrebna izolacija mikroorganizmov z želenimi encimskimi aktivnostmi. To je kompleksen proces, ki ga lahko izvajamo s presejalnimi testi, z analizo genskega zapisa, fluorometričnimi in kromogenimi tehnikami ter na podlagi specifične vezave protiteles na želeni protein. Te metode nam omogočijo zaznavanje encima ali količine encimsko pretvorjenega substrata. Omogočijo vizualizacijo kemijskih procesov in njihovo kvalitativno in kvantitativno vrednotenje.

Industrijska uporaba encimov v proizvodnji aktivnih učinkovin se v današnjem času povečuje. Encimi pri organski sintezi omogočajo potek reakcij v milih reakcijskih razmerah, ki po kemijski poti niso izvedljive ali privedejo do nastanka številnih primesi. Omogočajo in olajšajo nam izbor ustreznega katalizatorja. Ta v najmanjšem številu korakov in z veliko specifičnostjo omogoči okolju čisto katalizo, ki privede do nastanka zelene aktivne učinkovine (zdravila, vitamini, aminokisljine). Omogočajo tudi razgradnjo škodljivih snovi, biološko težko razgradljivih snovi in zmanjšanje njihove toksičnosti. Encimi so pogosto predmet raziskav, ki se posvečajo zmanjšanju ekoloških problemov, recikliranju in zmanjšanju kopičenja škodljivih snovi.

1.1 GLAVNE HIPOTEZE IN NAMEN DELA

Za iskanje, preučevanje in izolacijo encimskih aktivnosti smo uporabili vzorce aktivnega blata čistilnih naprav in druge okoljske vzorce. Tu so prisotni mikroorganizmi vsakodnevno izpostavljeni odpadnim produktom industrijskih proizvodenj in komunalnih, ki se stekajo v čistilne naprave. Mešanica odpadne vode in mikroorganizmov v bazenih čistilnih naprav se imenuje aktivno blato ter predstavlja vir hrane za preživetje velikega števila mikroorganizmov.

Dolgotrajna izpostavljenost kemijskim spojinam ter pomanjkanje drugih primernejših virov hranil lahko privede do selekcije mikroorganizmov glede na okoljske razmere in do sinteze encimov za razgradnjo prisotnih snovi.

Želeli smo preveriti prisotnost mikroorganizmov z o-demetilaznimi, esteraznimi, monooksigenaznimi in nitrilaznimi encimi v okoljskih vzorcih. Mikroorganizme smo obogatili, selekcionirali, izolirali posamezne seve in testirali encimsko aktivnost. Posvetili smo se izboru presejalnih metod za zaznavo izbranih encimskih aktivnosti in razvoju hitrih testov za kvantifikacijo encimskih aktivnosti mikroorganizmov.

V delu smo preverjali sledeče hipoteze:

- da so v okoljskih vzorcih in vzorcih aktivnega blata prisotni mikroorganizmi, ki imajo o-demetilazno, esterazno, monooksigenazno in nitrilazno encimsko aktivnost,
- da okolje oz. izpostavljenost različnim kemijskim spojinam omogoča preferenčno selekcijo mikroorganizmov, ki imajo encime za razgradnjo prisotnih snovi,
- da nam metode s hitrimi testi omogočajo zaznavo prisotnosti encimov z o-demetilazno, esterazno, monooksigenazno in nitrilazno encimsko aktivnost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROORGANIZMI KOT VIR ENCIMOV

Mikroorganizmi uporabljajo encime za svoje rastne in prehranske potrebe. Encimi omogočajo celični metabolizem, izrabljanje hranil in pridobivanje energije. Razvoj metabolnih poti je posledica prilagajanja mikroorganizmov in sinteze novih encimov.

Bakterijske kulture s svojim velikim spektrom encimov omogočajo velik in natančen biokatalitični potencial ter omogočajo pretvorbe snovi z uporabo oksidacije, redukcije, hidrolize, dehidracije in kondenzacije. Biokatalizator lahko zadržimo v reakcijskem volumnu z imobilizacijo celic ali encimov.

Biokatalitična masa je lahko prokariontska ali evkariontska in je v različnih morfoloških strukturah (posamezne celice, agregati, flokule, peleti, aktivne kulture, organeli in encimi). Na njeno biokatalitično aktivnost vplivajo spremembe okolja, stabilnost encimov, predhodna kultivacija in lokacija mikroorganizmov ali encimov (na nosilcu, membrani, površinskem filtru, mikrokapsulah, agregatih, ...) (Cimerman, 1992; Gasparič, 1992; Raspor, 1992)

2.2 PRESEJALNI TESTI ZA IZOLACIJO MIKROORGANIZMOV

Encimski testi so pomembno orodje za odkrivanje encimov in encimskih lastnosti. Test zahteva razumevanje encimskega delovanja, vloge kemijskih lastnosti produktov in substratov. Encimsko aktivnost lahko spremljamo s spremembami svetlobnega spektra substrata ali produktov, spremembami pH vrednosti, spremembami oksidacijsko redukcijskega stanja itd.

Presejalni testi morajo biti enostavni za izvedbo in morajo prepečiti lažno pozitivne rezultate. Teste uporabljamo za identifikacijo aktivnih encimov iz mikroorganizmov ali mikrobnih združb (Zhu in sod., 2007).

Presejalni testi ("screening") nam dajo kar najširši vpogled v določene lastnosti pregledovanih sevov. Individualno kolonijo vzgojimo in analiziramo izhodni signal (fluorescenca, absorbanca, itd.). Nekatere metode omogočajo ločevanje med pozitivnimi in negativnimi vzorci na agarški plošči. Zaznamo obarvanje kolonij, razbarvanje gojišč, zbitritvene cone, nastanek fluorescence, ...

Selekcija vključuje direktno povezavo med encimom in življenjskimi lastnostmi celice (proizvodnja aminokislin v mutantah, ...). Selekcija izvira iz genetske komplementacije. Ta

preučuje vnos gena v vektor, izražanje in sintezo kodirajočega gena. Gensko komplementacijo uporabljamo za izboljšavo mikroorganizmov z vnosom genov z antibiotičnimi rezistencami (Reymond, 2006; Sandoval in Marty, 2007).

Presejalni testi in izbor ustreznih sevov vključuje tudi metode, ki zahtevajo testiranje s pomočjo raznih aparaturo kot so:

- tekočinska kromatografija,
- analitska HPLC
- masna spektrometrija,
- kapilarna elektroforeza,
- IR-termografija,
- UV/VIS spektroskopija ali fluorescenca,
- kolorimetrične metode (Wahler in sod., 2001).

2.2.1 GOJITVENE TEHNIKE

2.2.1.1 Standardne gojitvene metode

Tradicionalne metode pridobivanja novih biokatalizatorjev temeljijo na kultivaciji in poznejšem testiranju čistih sevov mikroorganizmov s presejalnimi testi. To so standardni, zanesljivi, a počasni pristopi (Bommarius, 2004).

2.2.1.2 Presejalne metode na osnovi selekcije

Presejalne metode omogočijo selektivno razmnoževanje mikroorganizmov z iskanimi biokatalitičnimi aktivnostmi. To so pogoste in enostavne metode. Izbrani substrati predstavljajo vir ogljika ali dušika za rast mikroorganizma. Prisotnost encima za razgradnjo tega substrata omogoča mikroorganizmu katalitično aktivnost, pretvorno substrata in nastanek virov energije in preživetje (Bommarius, 2004; Lorenz in sod., 2002).

2.2.1.3 Presejalne metode z detekcijo produkta

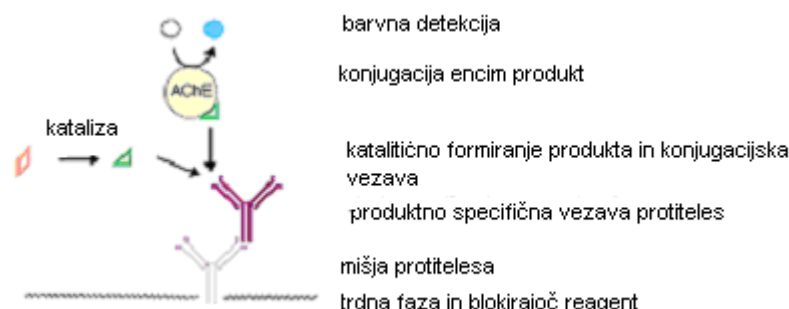
Metoda vključuje fizično ločevanje vseh mikroorganizmov prisotnih v združbi ter individualno testiranje čistih kultur in njihove encimske aktivnosti. To izvedemo na agarških ali v mikrotitrskih ploščah z uporabo občutljivih detekcijskih metod (Bommarius, 2004).

Preglednica 1: Biokatalitične presejalne tehnike (Bommarius, 2004)

Metoda	Analizna metoda	Kinetični profil
Kromogena ali fluorometrična	TLC	ločevanje po velikosti
	barvanje produktov	fluoro/kromogeni substrati ali produkti
	biosinteza obarvanih produktov	pH indikator
Kompleksni instrumenti	HPLC	IR-termografija
	masna spektrometrija	
	plinska kromatografija	

2.2.1.4 Selektivna substratna ali produktna vezava na protein

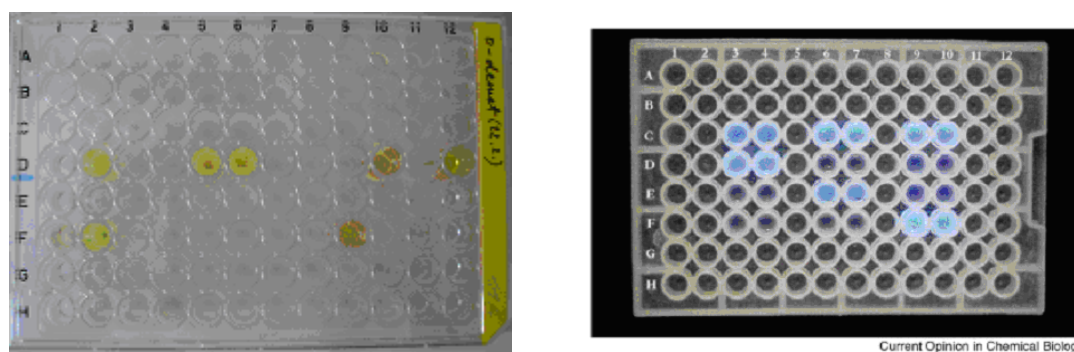
Produktno specifična monoklonska ali poliklonska protitelesa omogočajo testiranje na trdni fazi ali v raztopini. Označena protitelesa se specifično vežejo na tarčni encim ali substrat, ki deluje kot antigen. Odvečna protitelesa speremo, vezana protitelesa pa zaznamo s signalom (obarvanost, fluorescenca, ...) (Reymond, 2006).



Slika 1: Selektivna substratna ali produktna vezava na proteine (Reymond, 2006)

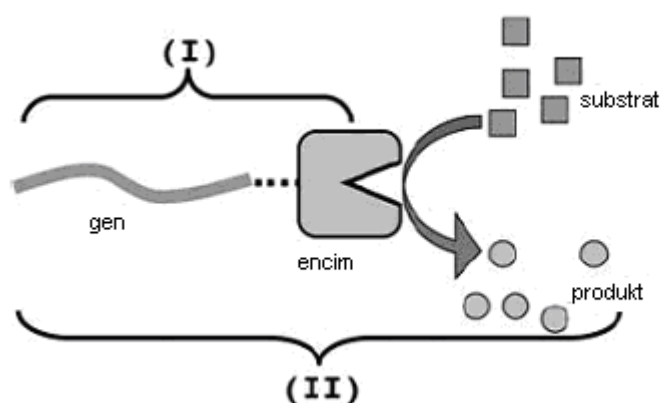
2.2.1.5 Kromogeni in fluorometrični testi

To so enostavni in zanesljivi testi. Substrati onemogočajo direktno testiranje katalize velikega števila reakcij in so uporabni za detekcijo razredov, ki kažejo ponavljajoče parametre. Pomanjkljivosti kromogenih in fluorogenih substratov je možnost prehitrega in nespecifičnega reagiranja v ostrih razmerah testiranja, kot so nečist ekstrakt, visoka temperatura ali pH vrednost (spontana hidroliza). To lahko vodi do detekcije lažno pozitivnih biokatalizatorjev (Reymond, 2006).



Slika 2: Kromogeni in fluorescenčni signal v mikrotitrski plošči (Reymond, 2006)

Mikrobna raznolikost dobljena z gojitvenimi tehnikami pokrije le majhen delež (1 %) prisotnih vrst v okoljskih vzorcih. Vseh mikroorganizmov ne moremo gojiti. Iz okolja izolirano DNA lahko namnožimo s PCR in z molekularnimi tehnikami induciramo genetski material v plazmidni vektor. Plazmidni vektor z vnesenim genskim zaporedjem analiziramo in pregledamo ohranjenost zaporedja. Ta podatek je pokazatelj izražanja encimske aktivnosti (Lorenz in sod., 2002).



Slika 3: Zaznavanje encimske aktivnost z genetskimi metodami (Lorenz in sod., 2002)

2.2.1.6 Genetske presejalne metode

Osnova presejalne in selekcijske metode je povezava med encimom nastalim produktom in njunim kodirajočim genom. Presejanje na podlagi sekvenc omogočajo oligonukleotidni začetniki, ki nalegajo na tarčne gene in omogočajo identifikacijo tarčnih genov direktno s PCR ali preko PCR pridobljenih hibridizacijskih sond. Prednost genetskega presejanja je analiza zelo velikega števila mutant za dani encim v okolju in zaznavanje neizraženih zaporedij (Lorenz in sod., 2002).

2.2.2 OBOGATITEV IN SELEKCIJA MIKROORGANIZMOV Z INDUKTORJI

Iskanje encimov in preučevanje njihovega metabolnega delovanja v celici zahteva poznavanje biokemijskih mehanizmov regulacije sinteze želenega encima.

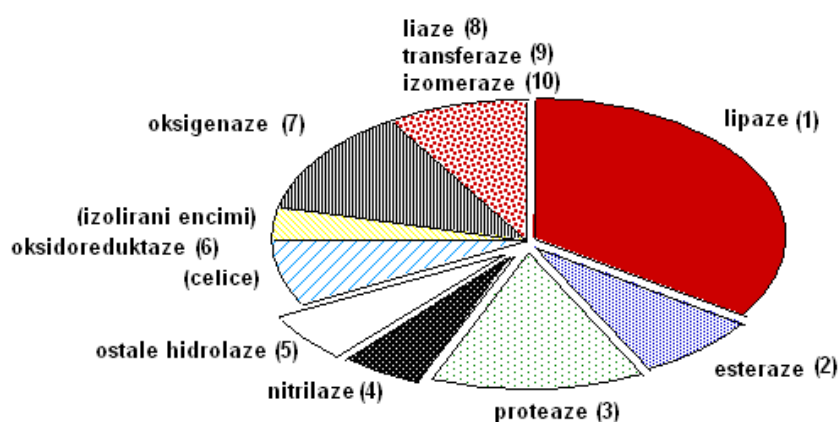
Ti načini regulacije sinteze so indukcija, katabolna represija in regulacija s povratno zanko.

- Encimska indukcija je proces, ko se encim sintetizira kot odgovor na specifične signalne molekule. Te molekule (pogosto substrat potreben za encimsko reakcijo) sodelujejo z represorjem, preprečujejo blokiranje operona in omogočajo sintezo encima (Lehninger in sod., 1993).
- Katabolična represija se vključi ob prisotnosti določenih virov ogljika ali dušika v gojišču, na katere je encimska sinteza občutljiva, ter prepreči sintezo encima (Lehninger in sod., 1993).
- Regulacija s povratno zanko ("feed back" regulacija) - prekine sintezo produkta zaradi prevelikega kopičenja le-tega. Za nemoten kontinuiran potek procesa moramo produkt odvzeti iz sistema (Lehninger in sod., 1993).

Substratni analogi, ki so vir ogljika med selektivnim razmnoževanjem, dajo mikroorganizmu možnost selekcije in hitre sinteze encimov, ki lahko pretvorijo izbrani substrat (Lehninger in sod., 1993).

2.2.3 ENCIMI V ORGANSKI SINTEZI

Prvi zapis uporabe encimov v organski kemiji sega skoraj stoletje nazaj. Od takrat so odkrili veliko število encimov in določili njihovo uporabnost v organski kemiji. Danes so na področju biotransformacij za organsko sintezo najpomembnejši encimi, ki spadajo v družino hidrolaz in oksidoreduktaz (slika 4) (Plummer, 1987).



Slika 4: Uporaba encimov za biotransformacije (Plummer, 1987).

Encimi prikazani na sliki 4 in njihovo delovanje:

- (1) – lipaze - cepitev estrskih vezi, hidroliza
- (2) – esteraze - hidroliza estrov
- (3) – proteaze –katalizira razgradnjo in cepitev peptidne vezi
- (4) – nitrilaze -hidroliza nitrilov (organske komponente z funkcionalno skupino- $C\equiv N$)
- (5) – ostale hidrolaze - hidroliza epoksidov, halogenov, fosfatov, glikozilacija
- (6) – oksidoreduktaze - redukcija in oksidacija aldehydov in ketonov
- (7) – oksidaze- biohidroksilacija, sulfoksidacija, epoksidacija, Baeyer-Villigerjeva oksidacija
- (8) – liaze, transferaze, izomeraze - izomerizacija karboksihidratov, racemizacija in epimerizacija (Plummer, 1987).

Prednost encimsko kataliziranih reakcij v primerjavi s kemijskimi so:

- visoka specifičnost (katalizirajo le eno reakcijsko stopnjo),
- delovanje nekaterih encimov pri visokih hitrostih reakcije in fizioloških razmerah nizkega pritiska, temperature in pH
- možnost večkratne ponovne uporabe in prijaznost do okolja.

Slabosti encimsko katalizirane reakcije pri sintezi organskih snovi so:

- prisotnost enantiomerne oblike v naravi,
- ozko območje (pH in temperature) delovanja encimov,
- aktivnost v vodnem okolju,
- inhibicija encimov z visoko koncentracijo substrata ali produkta.

Razvoj encimske tehnologije je zelo hiter na področju proizvodnje, izolacije in prečiščevanja encimov. Razvojne perspektive lahko razdelimo v 3 skupine:

- izboljšava organizmov, ki se uporabljajo za proizvodnjo encimov,
- razvoj encimov za proizvodnjo novih izdelkov,
- razvoj tehnoloških procesov sinteze encimov (Boyer, 2005).

Mikroorganizmi in encimi se v današnjem času vedno bolj uporabljajo za industrijsko proizvodnjo v raznolikih panogah.

Preglednica 2: Industrijska uporaba encimov (Kirk in sod., 2002)

Industrija	Encimski razred	Uporaba
Detergenti	proteaze	odstranjevanje madežev
	amilaze	odstranjevanje škroba
	lipaze	odstranjevanje maščob
	celulaze	čiščenje, zbistritev barv
Hrana	proteaze	okus, sirjenje
	laktaze	zorenje sirov
	pektinaze	razgradnja pektinov
Škrob in goriva	amilaze	utekočinjenje škroba
	glukoze izomeraze	pretvorba glukoze do fruktoze, zmanjšanje viskoznosti
Živalska krma	ksilanaze	razgradnja neškrobnih polimerov
	β -glukonaze	razgradnja polimerov
Pijača	pektinaze	drozganje, mehčanje, utekočinjenje
	amilaze	obdelava sokov, nizko kaloričnih piv
	β -glukanaze	mehčanje, drozganje
Tekstil	celulaze	mehčanje in razbarvanje bombaža
	pektinske liaze	čiščenje
	laktaze	beljenje
Papir in papirna kaša	lipaze	kontrola smol in kontaminacij
	proteaze	odstranjevanje biofilmov
	amilaze	odstranjevanje barvila, izboljšanje sušenja
	ksilanaze	beljenje
	celulaze	odstranjevanje barvila, izboljšanje sušenja
Organska sinteza	lipaze	razgradnja kiralnih alkoholov
	akrilaze	sinteza sintetičnih penicilinov
	nitrilaze	sinteza čistih karboksilnih kislin
Osebna higiena	peroksidaze	antimikrobno delovanje
	glukoze oksidaze	beljenje, antimikrobno delovanje

2.3 O-DEMETILAZE

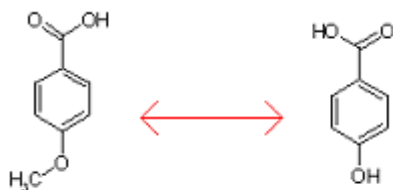
O-demetilaze so encimi, ki odstranijo metilno (CH_3 -) skupino vezano z etrsko vezjo, ki je v proteinih (lignin, ksilan, ...) ali drugih spojinah. Spadajo v skupino oksidoreduktaz. O-demetilacija lahko poteka v aerobnem ali anaerobnem okolju. Reakcija O-demetilacije potrebuje koencime, kot so NADPH oz. NADH, flavoproteine ali Fe-S proteine, ki jih v biokatalizo z živimi celicami ni potrebno dodajati (Shimoni in sod., 2002).

O-demetilaza je znotrajcelični, inducibilen encim sestavljen iz štirih enot. V aktivnem centru vsebuje kobalt, železo ali nikelj. Elektroni potujejo iz NADH do komponent z reduktaznimi lastnostmi (kisik, flavin (FAD ali FMN), NAD vezavno stran ali 2 Fe-2S skupek). Kot vir energije potrebujejo ATP (Herman in sod., 2005).

Encim 4-metoksibenzoat monooksigenaza (EC 1.14.99.15) katalizira pretvorbo 4-metoksibenzojske kisline v 4-hidroksibenzojsko kislino. Encim je sestavljen iz dveh podenot in sicer iz od NADH ali NADPH odvisne reduktaze in iz monooksigenaze (Shimoni in sod., 2002).

2.3.1 UPORABA O-DEMETILAZ

O-demetilaze uporabljajo v farmacevtski industriji in industriji dišav. Uporablja se lahko za pretvorbo lignina, aromastkih obročev in vanilina; v kmetijstvu pa za razgradnjo herbicidov.



Slika 5: Pretvorba vanilata v protocatehuat (Genom.net, 2007)

Aromatska o-demetilacija je glavni korak v sintezi skoraj vseh opinskih medicinskih narkotikov in njihovih antagonistov. Pretvorijo lahko nekatere toksične in rakotvorne snovi (borov tribromid, propantiolat in kalijev hidroksid) v netoksične in zaželene alternative (Shimoni in sod., 2002; Brouk in Fishman, 2009).

2.3.2 METODE ZA DOLOČANJE O-DEMETILAZ

Metode določanja o-demetilaz:

- Spektrofotometrično merjenje prisotnosti rumeno obarvanega produkta 3-nitro-4-hidroksibenzoata (Shimoni in sod., 2002).
- Spremljanje pretvorbe sestavin v gojišču. Ekstrakcija sestavin gojišča in analiza produktov encimskih reakcij s HPLC metodo. Opazi se zmanjšanje količine substrata in povečanje količine produkta (Hibi in sod., 2005; Herman in sod., 2005).
- Merjenje porabe kisika oksigenaznih sistemov o-demetilaz z galvansko celično elektrodo (Sonoki in sod., 2000).

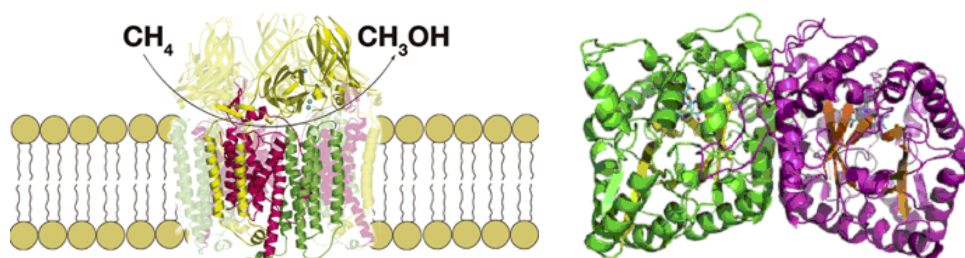
2.4 MONOOKSIGENAZE

Monooksigenaze (EC 1.13.12) katalizirajo prenos kisikovega atoma iz molekule kisika v substrat in redukcijo druge molekule kisikovega atoma v vodo. So znotrajcelični encimi in so pomembni za prenos elektronov in sintezo ATP-ja. Za svoje delovanje potrebujejo NADPH, nekateri pa tudi FADH₂.

Monooksigenaze in dioksigenaze spadajo v skupino oksigenaz. Dioksigenaze katalizirajo vključitev obeh atomov kisika v molekulo (Madigan in sod., 1997).

Pomembna podskupina monooksigenaz je citokrom P450 monooksigenaza. Encime najdemo v živalih, rastlinah, bakterijah in vsaki človeški celici. Bakterijski monooksigenazni encimi so vpleteni v metabolizem železa, oksidativni stres in patogeni odziv. Njihovo delovanje je odvisno od prisotnosti NADH ali NADPH v organizmih (Doble in sod., 2004).

Monooksigenaze (BM-3-tipa) vsebujejo eno molekulo citokroma P450, hem domeno in oksidoreduktazno NADPH vezavno domeno, kar jih loči od široko razširjene skupine reduktaz (Vatsyayan in sod., 2008).



Slika 6: Metanska monooksigenaza (levo) in alkalna monooksigenaza (desno) (Li in sod., 2008; Lieberman in Rosenzweig, 2005)

2.4.1 UPORABA MONOOKSIGENAZ

Monooksigenaze katalizirajo hidroksilacijo neaktivnega ogljika ali epoksidacijo organskih substratov. Molekula kisika pogosto služi kot oksidant za ekvivalente iz NAD(P)H odvisnih reduktaznih proteinov preko prenosa elektronov. Ta omogoča metabolizem endogenih in ksenobiotičnih sestavin in ima velik potencial za uporabo v sintezni kemiji, okoljski remediaciji, tekstilni industriji, toksikologiji in genski terapiji (Reymond, 2006).

Monooksigenazni in dioksigenazni encimi so zanimivi za uporabo, saj katalizirajo stereoizomere, ki jih je težko doseči z organsko sintezo (Bornscheuer in sod., 1999).



Slika 7: Razgradnje triptofana z monooksigenazami (Genome.net, 2007)

2.4.2 METODE ZA DOLOČANJE MONOOKSIGENAZ

Metode za določanje encimov:

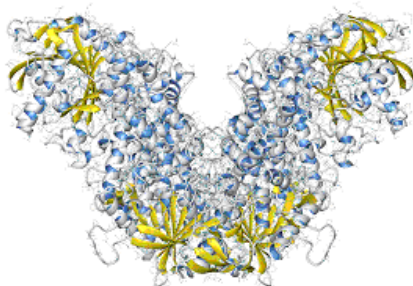
- Ekstrakcija modrega produkta indiga, analiza s TLC in primerjava s kontrolnim indigo vzorcem (Gillam in sod., 1999); analiza indiga z UV spektrofotometrom in masno spektrometrijo (Gillam in sod., 1999); Indigo so uporabili tudi kot modro beli test za direktno ločevanje in pregledovanje velikega števila sevov (Tee in sod., 2008).
- Merjenje aktivnosti citokrom P450 monooksigenaze z merjenjem substratno odvisne porabe kisika z elektrodo Clarkovega tipa (Vatsyayan in sod., 2008)
- Določanje kromogenega substrata, njegovega razbarvanja in analiza količine pretvorbe iz umeritvene krivulje (Tee in sod., 2008).
- Ekstrakcija vzorca in analiza količine produkta s plinsko kromatografijo (Tee in sod., 2008).

2.5 ESTERAZE

Esteraze spadajo (EC 3.1.1) v skupino v naravi razširjenih hidrolaz. Katalizirajo reakcijo cepitve estrske vezi v spojini v alkohol in kislino. Esteraze hidrolizirajo kisikovo estrsko vez (specifično ali nespecifično). Najdemo jih v tkivih sesalcev, rastlinah in mikroorganizmih.

Največja razreda esteraz sta razreda karboksilnih esteraze in lipaz, ki lahko pretvorijo širok spekter substratov (naravne ali umetne) in kažejo veliko aktivnost v organskih medijih. Esteraze hidrolizirajo estre s kratkimi maščobno kislinskimi verigami v vodnih raztopinah, lipaze pa substrate z daljšimi verigami maščobnih kislin na hidrofobno-hidrofilno fazni meji (Bommarius, 2004).

Esteraze so encimi iz naddružine α/β -hidrolaz. V svoji tridimenzionalni strukturi vsebujejo α/β -hidrolizni žep, ki je sestavljen iz α -vijačnice in β -zavojev (Bornscheuer in sod., 1999).



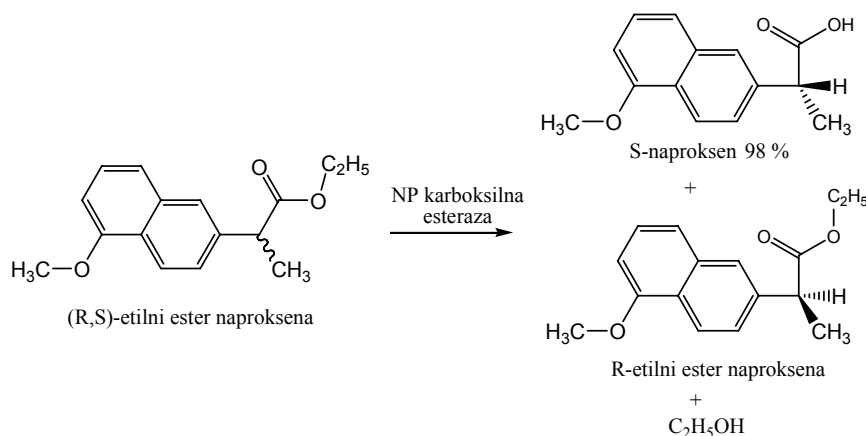
Slika 8: Struktura encima acetilholin esteraze (Bornscheuer in sod., 1999)

2.5.1 UPORABA ESTERAZ IN LIPAZ

Esteraze so relativno stabilni encimi, ki za delovanje ne potrebujejo kofaktorjev. Izkazujejo veliko regioselektivnost in stereoselektivnost, kar jim omogoči nastanek optično čistih sestavin za kemijsko sintezo.

Lipaze in esteraze so odgovorne za zunaj in znotrajcelično razgradnjo lipidov. Hidrolizirajo estrske skupine različnih zdravil in toksinov vključno s kokainom in heroinom (Bommarius, 2004; Sandoval in Marty, 2007).

V industrijski uporabi sta najpomembnejši esteraza iz svinjskih jeter (PLE) in esteraza iz konjskih jeter (HLE). PLE biokatalizira pretvorbo širokega spektra substratov v stereoselektivne fine kemikalije in omogoča pridobitev optično čistih sestavin. Naproksen esteraza (NP) iz *B. subtilis* katalizira nastanek optično čistega S-naproksena (slika 9) in S-ibuprofena (nesteroidno protivnetno zdravilo) (Bornscheuer in sod., 1999).



Slika 9: Biosinteza S-naproksena z NP-esterazo (Faber, 1999)

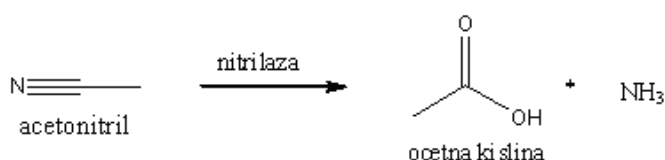
2.5.2 METODE ZA DOLOČANJE ESTERAZNIH ENCIMOV

Metode določanja esteraznih encimov:

- Spektrofotometrično merjenje barvne spremembe. Potek reakcije lahko povzroči sproščanje protonov in obarvanje indikatorja. Nastali produkti se lahko vežejo z dodatki v gojišču, kar privede do nastanka barvnega kompleksa (Martínez-Martínez in sod., 2007).
- Pretvorba substratov do fluorescirajočih sestavin in njihova akumulacija v celici omogoča štetje aktivnih fluorescentnih celic s fluorescenčnim mikroskopom (Bitton, 1994).
- Analitske metode HPLC, TLC, GC omogočajo analizo in kvantifikacijo produktov ali ostankov substratov s specifičnimi kolonami (Reymond, 2006).

2.6 NITRILAZE

Nitrilaze (EC 3.5.5.1) so razred encimov, ki katalizirajo hidrolizo organonitrilnih sestavin v ustrezno karboksilno kislino v blagih razmerah katalize.

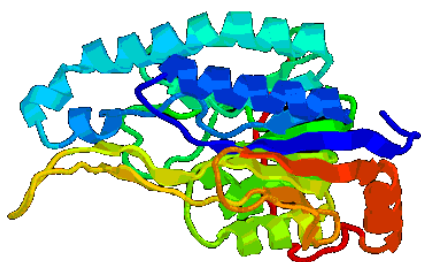


Slika 10: Nitrilazna reakcija (cepitev nitrila do ustrezne karboksilne kisline in amoniaka)

Nitrilaze lahko na podlagi substratnega delovanja razdelimo v tri družine:

1. nitrilaze, ki hidrolizirajo aromatske substrate ali heterociklične nitrile,
2. nitrilaze, ki preferenčno hidrolizirajo alifatske nitrile,
3. nitrilaze, ki preferenčno hidrolizirajo akrilacetonitrile.

Nitrilaze so v splošnem inducibilni encimi. Aktivnost encima je odvisna od posameznih dejavnikov: temperature, encimske koncentracije, prisotnosti substratov, soli ali organskih topil. Katalitična narava nitrilaznih encimov se vedno bolj izkorišča za proizvodnjo različnih farmacevtskih aktivnih učinkovin (Mueller in sod., 2006; Martínková in sod., 2008).



Slika 11: Cianid razgrajajoča nitrilaza iz *Bacillus pumilus* (Martínková in sod., 2008)

2.6.1 UPORABA NITRILAZ

Nitrilaze razgrajujejo nitrile. To so toksične snovi, ki se uporabljajo v proizvodnih procesih plastike, herbicidov in sintezo industrijsko pomembnih kemikalij (Kobayashi in sod., 1990).

Nitrilazno hidrolitični encimi se uporabljajo za proizvodnjo farmacevtsko pomembnih sestavin in aktivnih kemikalij. Omogočajo regio- in enantioselektivno hidrolizo nitrilov. Kataliza je okolju prijazna, biokonverzija pa dovoljuje čisto in blago sintezo z visoko selektivnostjo in donosi, kar jih ovrednoti kot idealne industrijske katalizatorje. Nitrilaze sodelujejo v dušikovem metabolizmu in se uporabljajo za razgradnjo nitrilnih sestavin (nitrilnih odpadkov), ki so zelo nevarni in težko razgradljivi odpadki v okolju (Xie in sod., 2006; Banerjee in sod., 2003).

2.6.2 METODE ZA DOLOČANJE NITRILAZ

Določanje aktivnosti nitrilaz:

- Barvna sprememba indikatorja. Sproščanje vodikovega iona iz nitrilazno katalizirane reakcije privede do spremembe pH (Martínková in sod., 2008).
- Komercialni testi zaznavajo encimsko aktivnost na osnovi 2-ketalglutamatne katalize z glutamatno dehidrogenazo (Qing in sod., 2007).

Aktivnosti nitrilaz se pogosto meri s količino amoniaka v vzorcih.

- Merimo fluorescenco, ki nastaja kot produkt reakcije z nitrilazami (OPA/NAC metoda, Nesslerjeva metoda) (Qing in sod., 2007).
- Kolorimetrična metoda zaznave obarvanega produkta (amoniak tvori kompleks s Co^{2+} ioni in nastane barvna sprememba iz rožnate v rumeno) (Xie in sod., 2006).
- Kromatografske metode omogočajo določanje sestavin v reakcijski mešanici. Za dokazovanje nitrilaznih produktov uporabljajo TLC, HPLC, GC (Martínková in sod., 2008).
- Analitske metode: indofenol in indotimolna metoda, fluorometrična metoda, kemiluminiscenčna metoda in ionska selektivna elektroda (Qing in sod., 2007).

2.7 BIOTRANSFORMACIJE

Biotransformacija uporablja biokatalizatorje kot mediatorje kemijskih procesov, za sintezo organskih kemikalij, uničenje nezaželenih snovi, pretvorbo substrata v bolj polarno, topno ali aktivno obliko uporabno za nadaljnje procese. Proces poteka z biokatalizo v omejenem številu encimskih korakov. Encimsko delovanje je lahko specifično, mnogi pa lahko pretvorijo zelo različne substrate.

Biokatalizatorji so lahko različnih izvorov (iz plesni, gliv, rastlin, mikroorganizmov) ali pa so že izolirani in očiščeni encimi. Potreben je izbor pravega mikroorganizma, v katerem je encim najbolj aktiven (naravno ali zaradi genetskih modifikacij).

Biotransformacijski proces ima prednost pred kemijskim. Kemijske metode lahko vodijo do tvorbe mešanice izomerov in stranskih produktov. Biotransformacije pa omogočajo visoko specifičnost napada izbranih mest v substratu in pripravo posameznega izomernega produkta (Bitton, 1994). Uporaba encimov in mikroorganizmov za kemijske biotransformacije in organsko sintezo se pričakovano povečuje, odkar je industrija prisiljena k uporabi okolju prijaznih postopkov pridelave, zmanjšanju toksičnosti in uporabi varnejših in čistejših kemikalij v proizvodnih procesih.

Biotransformacija je uspešna na področju farmacije (priprava kiralnih zdravilnih učinkovin, vitaminov, specifičnih kemikalij), okoljske bioremediacije, tekstilne industrije, plastik in kmetijstva. Najdemo jo tudi v prehrambeni, kozmetični industriji, industrijski katalizi, čiščenju oljnih madežev in medicinski kemiji (Doble in sod., 2004).

Biokataliza je nadomestna tehnologija za kemijsko industrijo. Omogoča zahtevne reakcije, ki so težko izvedljive s klasično organsko kemijo ali take reakcije, ki lahko zamenjajo številne zamudne večstopenjske postopke v kemiji. Danes stereoizomerne biotransformacije lahko poenostavijo proizvodnji proces in ga naredijo ekonomičnejšega in okolju prijaznejšega (Liese in sod., 2006).

Biokataliza je zelena tehnologija, ki uporablja celotne celice, spore ali le očiščene encime. Reakcije lahko potekajo v ostrih razmerah kot so ekstremen pH, visoka ali nizka temperatura, pritisk, visoka koncentracija soli in prisotnost aditivov. Encimsko aktivnost so ugotovili tudi v drugih običajno neuporabljenih medijih, organskih topilih, vodnih dvofaznih sistemih, trdnih medijih, plinih in tekočinah. Vse to je povečalo možnost uporabe biokatalize v organski sintezi (Doble in sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE



Slika 12: Shema poiskusov in delo v nalogi

Vir mikroorganizmov so predstavljali okoljski vzorci in aktivno blato iz čistilnih naprav. To nam omogoča večjo mikrobno raznolikost, in različne aktivnosti glede na odplake, ki jih čistilne naprave čistijo.

3.1 VZORCI

1. Aktivno blato iz centralne čistilne naprave Domžale Kamnik
2. Aktivno blato iz čistilne naprave Cerkno
3. Aktivno blato iz čistilne naprave Industrije usnja Vrhnika (ČN IUUV)
4. Pilotna biološka čistilna naprava Kemijskega inštituta
5. Čistilna naprava podjetja Melamin
6. Odtočni jašek v industrijski coni Kanižarica
7. Čistilna naprava Novo mesto - Krka d.d Novo mesto

Odvzeli smo 500 ml vzorca. Del vzorca (2 x 100 ml) smo shranili z dodatkom 20 % glicerola pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred pričetkom dela smo jih odtalili in nacepili v obogateno gojišče.

3.2 MATERIALI

3.2.1 RAZTOPINE

Fosfatni pufer pH 7,5

Za pripravo 100 ml 50 mM raztopine uporabimo:

- 37,5 ml 100 mM Na_2HPO_4 ,
- 12,5 ml 100 mM NaH_2PO_4 in
- 0,44 g NaCl in
- dodamo vodo do oznake 100 ml.

2,5 % raztopina MBA

Za pripravo 100 ml 2,5 % raztopine MBA uporabimo:

- 2,5 g MBA in
- dodamo vodo do oznake 100 ml.

3.2.2 KEMIKALIJE

4-metoksibenzojska kislina 99 % (MBA)	Sigma-Aldrich, ZDA
acetonitril	Merck, Nemčija
agar	Interpartners, Češka
albumin	Merck, Nemčija
amonijev klorid	Riedel-de Haën, Nemčija
benzonitril, 99 %;	Sigma-Aldrich, ZDA
Bradford reagent	PureExtreme, Fermentas, Kanada
etilni linoleat	Fluka
Gelrite [®] gellan gum	Sigma-Aldrich, ZDA
glicerol	Sigma-Aldrich, ZDA
glukoza	Carlo Erba Reagents, Italija
HCl	Merck, Nemčija
indigo	Fluka, Nemčija; Sigma
indol	Fluka, Nemčija
kvasni ekstrakt	BioSpringer, Francija
L-arginin	Sigma-Aldrich, ZDA
MgCl	Sigma-Aldrich, ZDA
N, N-dimetilformamid, 98 %	Fluka
Na ₂ HPO ₄	Merc, Nemčija
NaH ₂ PO ₄	Fluka, Biochemika,
NaCl	Merck, Nemčija
propionitril 99 %	Sigma-Aldrich, ZDA
Trisma	Sigma-Aldrich, ZDA
Triton x-100	Sigma-Aldrich, ZDA
železov sulfat heptahidrat	Sigma-Aldrich, ZDA

3.2.3 GOJIŠČA

3.2.3.1 Mineralno gojišče MING

Sestava za pripravo mineralnega gojišča MING

Preglednica 3: Sestava mineralnega gojišča MING

Sestavine	Količina
85 % H ₃ PO ₄	250 µl
NH ₄ SO ₄	4,0 g
1,0 % FeSO ₄ × 7 H ₂ O	3 ml
5 % MgCl ₂ × 6 H ₂ O	250 µl
4 % NaOH	100 µl
4 % KOH	100 µl
Substrat	0,5 g
Trisma baza	2,42 g

Navedene kemikalije zatehtamo oz. odpipetiramo v 2-litersko erlenmajerico in dopolnimo z vodovodno vodo do 1 l. Z 10 % NaOH ali HCl uravnamo pH gojišča na 7,0. Gojišče razlijemo v 500 ml erlenmajerice po 50 ml in avtoklaviramo 20 min pri 121 °C. Pri pripravi trdnega gojišča MING v 1 l gojišča smo dodali 15 g agarja ali 7 g gelrita.

3.2.3.2 Mineralno gojišče M9

Sestava za pripravo mineralnega gojišča M9

Preglednica 4: Sestava mineralnega gojišča M9

Sestavine	Količina
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
d H ₂ O	1 l
Substrat	0,5 g

Kemikalije zatehtamo oz. odpipetiramo v 2-litersko erlenmajerico in dopolnimo z vodovodno vodo do 1 l. Z 10 % NaOH ali HCl naravnamo pH gojišča na 7,0. Gojišče nato razlijemo v 500 ml erlenmajerice po 50 ml in avtoklaviramo 20 min pri 121 °C. Po avtoklaviranju dodamo 50 µl 1M MgSO₄ in 500 µl 0,01 M CaCl₂. Pri pripravi trdnega gojišča M9 v 1 l gojišča dodamo 15 g agarja ali 7 g gelrita. V 50 ml gojišča smo dodali substrat za indukcijo zelene encimske aktivnosti in gojišče avtoklavirali pri 121° C, 1.1 bara za 20 min.

3.2.3.3 Trdno Luria-Bertani (LB) gojišče

Preglednica 5: Sestavine LB gojišča

Sestavine	Količina (za pripravo 1 l)
Tripton	10 g
kvasni ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
d H ₂ O	do 1 l

Sestavine smo dobro premešali in avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo raztopino ohladili, razlili v petrijevke ter počakali, da se je agar strdil.

3.2.4 OPREMA

- JENWAY 6305 UV/VIS Spectrophotometer
- Eppendorf Biophotometer
- Centrifuga: Biofuge pico Heraeus instruments (13000 obr/min)
- Vorteks: Assistent Reamix 2789
- Inkubator Sutjeska 28 °C
- Avtoklav: IRA® RCT basic sefty control
- Tehnica EXACTA 1200 EB
- Natančna tehnica: METTLER AT 261 Delta Range
- pH meter: METTLER TOLEDO MP 220
- Hladilnik LTH +5
- Termostatiran stresalnik, 28 °C, 50 ± 10 % vlaga
- Stresalnik Pilot-Shake® TM (Basel Scweiz)
- Tecan Multifunctin Microplate Reader

3.3 METODE

Za izolacijo zelenih mikroorganizmov smo uporabili mehanizem obogatitve in selekcije z induktorjem. Mikroorganizme smo gojili v gojišču obogatenem s substratom. Molekule substrata so vir hranil, gradbenih in energetskih sestavin. Delujejo tudi kot induktor ter spodbudijo sintezo in delovanje encima. Izoliranim mikroorganizmom smo določili encimsko aktivnost z encimskimi testi.

3.3.1 ŽELIRNO SREDSTVO GELRITE® GELLAN GUM

Za izolacijo mikrobnih kolonij smo testirali novo želirno sredstvo Gelrite® gellan gum (gelrite). Gelrite je zelo čisto polisaharidno, bakterijsko gojišče. Po segrevanju tvori ireverzibilno trd gel in je primeren nadomestek agarju.

Gelrite je naravno pridobljen produkt fermentacije vrste *Pseudomonas elodea*. Ta naravni, čist, heteropolisaharidni biopolimer, zaradi čistosti, odsotnosti hranil in strukturne zamreženosti prepreči izolacijo velikega števila lažno pozitivnih sevov. Omogoča izolacijo čiste bakterijske kulture, opazovanje morfoloških lastnosti kolonij ter izvajanje mikrobioloških testov in analiz. Uporabljamo ga lahko tudi kot nadomestek agaroze za elektroforezo in izolacijo DNA.

Želirno sredstvo gelrite za strjevanje potrebuje prisotnost ionov, ki omogočijo zamrežitev strukture in dajo gelu ustrezno trdnost za nacepitev bakterijskega vcepka. S preiskovanjem smo poiskali najprimernejšo koncentracijo gelrita in kationov za nadaljno uporabo (Shungu in sod., 1983; Sigma-Aldrich, 2007).

3.3.2 O-DEMETILAZE

3.3.2.1 Določanje o-demetilazne encimske aktivnosti

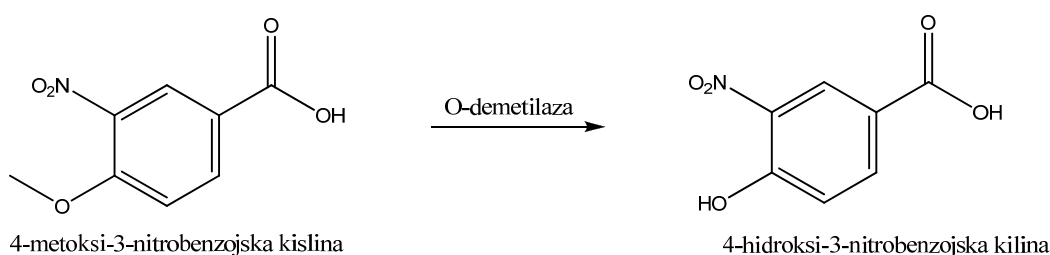
Okoljske vzorce iz sedmih različnih virov smo nacepili v tekoče minimalno gojišče MING z dodatkom substrata 0,5 g/l 4-metoksibenzojske kisline (MBA). MBA predstavlja vir ogljika, dušika in energije ter hkrati omogoči selekcijo mikroorganizmov.

Kulturo smo precepili v sveža gojišča enkrat tedensko. Po dvomesečni bogatitvi in selekciji smo kulturo tekočega gojišča precepili na trdno gojišče z in brez substrata. Kolonije zrasle le na gojišču z dodatkom substrata smo očistili do posameznih kolonij. Te smo precepili v centrifugirke s 5 ml gojišča MING z MBA (0,5 g/l) ter inkubirali dva dni na stresalniku (230 obr/min, 28 °C). Spremljali smo rast v centrifugirkah in izmerili znotrajcelično encimsko aktivnost s kvalitativnim testom o-demetilazne aktivnosti (Shimoni in sod., 2002).

3.3.2.2 Kvalitativni test o-demetilazne aktivnosti

Iz centrifugirke z mikrobo kulturo smo v dveh alikvotih odpipetirali 1 ml gojišča v mikrocentrifugirko. Vzorce smo centrifugirali 5 min z 20500 obr/min. Supernatant smo zavrgli in usedlini dodali 380 μ L 50 mM fosfatnega pufru (pH = 7,5). En alikvot smo inkubirali na sobni temperaturi, negativno kontrolo pa 10 min na 100 $^{\circ}$ C.

V vse vzorce smo dodali 20 μ L 5 mM 3-nitro-4-metoksibenzoata (4-MNBA) in vzorce inkubirali na stresalniku pri 28 $^{\circ}$ C preko noči. Ob prisotnosti o-demetilaznega encima je nastal rumeno obarvan produkt 3-nitro-4-hidroksibenzoat. Tega smo izmerili spektrofotometrično pri 28 $^{\circ}$ C in 405 nm (Shimoni in sod., 2002).



Slika 13: Pretvorba 4-metoksi-3-nitrobenzojske kisline z o-demetilazami

3.3.2.3 Določanje mase suhe snovi

Za določanje suhe teže centrifugirane mikrobne kulture smo gojišče s kulturo centrifugirali 5 min na 20500 obr/min, odstranili supernatant in mikrocentrifugirke s celicami sušili 24 ur v šušilniku na 105 $^{\circ}$ C. Mikrocentrifugirke s kulturo smo stehali in ponovno sušili do dosega konstantne teže (Lehninger in sod., 1993).

3.3.2.4 O-demetilazne aktivnosti in specifična o-demetilazna aktivnost

Aktivnost encima ovrednotimo s hitrostjo encimske reakcije.

Aktivnost o-demetilaz smo izračunali kot spremembo A_{405} glede na maso suhe snovi centrifugirane mikrobne kulture.

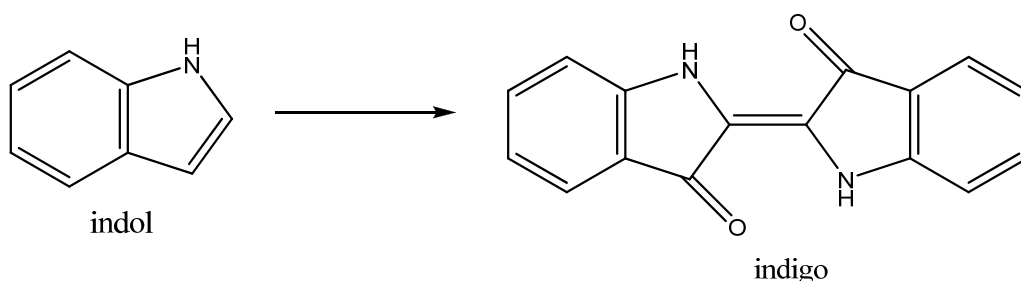
$$O\text{-demetilazna encimska aktivnost} = \frac{\text{sprememba } A_{405}}{\text{masa suhe snovi (g)}} \quad \dots (1)$$

Specifično aktivnost o-demetilaznega encima smo ovrednotili kot aktivnost encima v določeni časovni enoti (min).

$$\text{Specifična o-demetilazna encimska aktivnost} = \frac{\text{sprememba } A_{405}}{\text{masa suhe snovi (g) } \cdot \text{čas (min)}} \quad \dots (2)$$

3.3.3 MONOOKSIGENAZE

Okoljske vzorce iz sedmih različnih virov smo nacepili na trdno gojišče z dodatkom arginina (1 g/l) in indola (0,1 g/l). Arginin je induktor monooksigenazne aktivnosti. Aktivnost smo zaznali s pretvorbo 2 molov indola v 1 mol modrega barvila indigo (O'Connor in sod., 1997). Vzorce smo naknadno inokulirali v gojišče z lesno moko kot virom hranil. Vzorce aktivnega blata smo nacepili v tekoče gojišče MING z dodatkom lesne moke (0,5 g/l). Po 14-dnevni inkubaciji smo vzorce nacepili na trdno gojišče z argininom in indolom ter dobili modro in belo obarvane kolonije. Vse modro obarvane kolonije smo precepili do čistih sevov in jih nacepili v tekoče gojišče MING z dodatkom indola in arginina. Po 3-dnevni inkubaciji na stresalniku smo izmerili obarvanost gojišča.



Slika 14: Pretvorba indola v indigo z monooksigenazami

3.3.3.1 Določanje monooksigenazne aktivnosti

Modro obarvano gojišče smo uporabili za določanje koncentracije indiga. Iz centrifugiranih vzorcev smo odpipetirali 1 ml gojišča. Vzorec smo centrifugirali 5 min pri 20500 obr/min in odstranili supernatant. Celični pelet smo resuspendirali v 2 ml dimetilformamida (DMF), ki omogoča boljšo topnost indiga. Raztopino smo vorteksirali in centrifugirali 2 min pri 20500 obr/min. Izmerili smo absorbanco supernatanta v kvarčnih kivetah pri 610 nm (Gillam in sod.,1999).

3.3.3.2 Aktivnost in specifična monooksigenazna aktivnost

Monooksigenazno aktivnost smo testirali pri sevih izoliranih iz okoljskih vzorcev. Kot dodaten vir kolonij s potencialno monooksigenazno aktivnostjo smo uporabili tudi združbo iz gojišča z lesno moko. Izoliranim čistim kolonijam smo določili encimsko aktivnost in specifično aktivnost. Aktivnost monooksigenaznega encima smo izračunali kot spremembo količine nastalega produkta glede na maso suhe snovi .

$$\text{Monooksigenazna encimska aktivnost} = \frac{\text{količina indiga (mol)}}{\text{masa suhe snovi (g)}} \quad \dots(5)$$

Specifično aktivnost encima smo izračunali kot spremembo količine nastalega produkta glede na maso suhe snovi (g) v določeni časovni enoti (min).

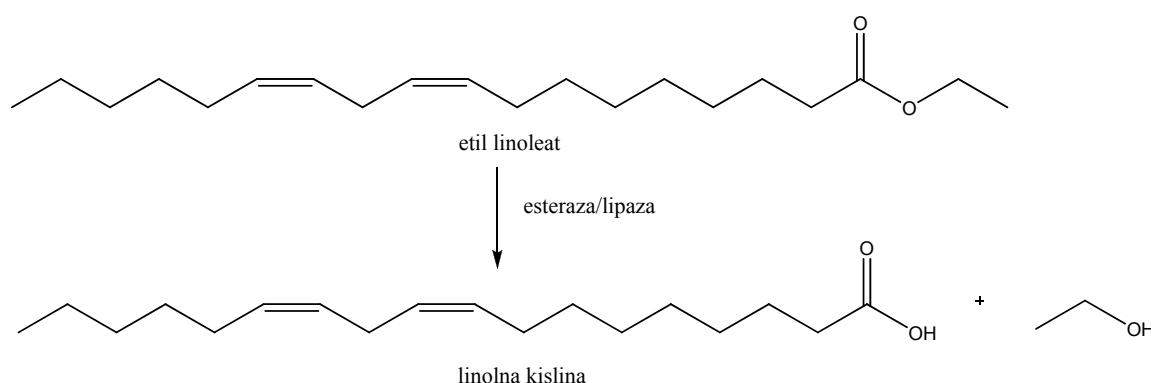
$$\text{Specifična monooksigenazna encimska aktivnost} = \frac{\text{količina indiga (mol)}}{\text{masa suhe snovi (g) čas (min)}} \dots(6)$$

3.4 ESTERAZE

Okoljske vzorce iz sedmih različnih virov smo nacepili na tekoče gojišče z dodatkom etil linoleata. To je vir hranil za mikroorganizme v vzorcu in substrat za delovanje esteraznih encimov.

3.4.1 MERJENJE ESTERAZNE AKTIVNOSTI

Iz mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1 ml gojišča in ga centrifugirali 10 min na 10500 obr/min. Supernatant smo uporabili kot vir izvenceličnih esteraz. Reakcijska mešanica je bila sestavljena iz 900 μl 50 mM fosfatnega pufru pH = 7,5, 50 μl 5 mM ftalaldehidnega reagenta in 50 μl supernatanta. Mešanico smo vorteksirali in prenesli 200 μl v mikrotitrne plošče in izmerili absorbanco pri 405 nm in 40 °C (Boczar, 2001).



Slika 15: Pretvorba etil linoleata v linolno kislino z esteraznim encimom

Absorbanco nastalega obarvanega produkta smo merili v določenem časovnem obdobju. Iz premice spreminjanja absorbance glede na čas smo določili hitrost pretvorbe substrata. Enačba premice je prikazana v obliki: $y = ax + b$. Vrednost a nam podaja naklon premice, ki je sorazmeren z aktivnostjo encima. Vrednost b pa začetno vrednost v točki $x = 0$, ki za izračun aktivnosti ni nujen podatek.

3.4.2 RASTNE KRIVULJE IZOLIRANIH SEVOV Z ESTERAZNO AKTIVNOSTJO

Rastna krivulja je pokazatelj povečanja števila celic oz. povečanja celične mase v določenem časovnem intervalu v zaprtem sistemu. Krivulja je značilna za specifičen sev in razmere kultivacije. Spreminja se glede na sestavo gojišča, temperaturo inkubacije, pH, ...

Sev smo vcepili v gojišče ter v intervalih merili spremembo optične gostote. Meritve smo opravili v časovnih intervalih od 2 do 20 ur od inokulacije, kar omogoča prikaz rastle krivulje za gojeni sev in vpogled v faze rasti (prilagoditvena, eksponentna, stacionarna faza in faza odmiranja).

3.4.3 SPECIFIČNA ESTERAZNA AKTIVNOST

Aktivnost encima nam omogoča ovrednotenje encimskega delovanja. Esterazno aktivnost smo definirali kot pretvorbo substrata (naklon regresijske premice) glede na količino izvenceličnih proteinov v supernatantu vzorca.

Hitrost esterazne aktivnosti = pretvorba substrata (A/min) ... (3)

Specifično aktivnost esteraznega encima smo definirali kot pretvorbo substrata (naklon regresijske premice) glede na količino izvenceličnih proteinov v časovni enoti.

Specifična esterazna encimska aktivnost = $\frac{\text{naklon premice (A/min)}}{\text{masa proteinov (g/l)}}$... (4)

Enačbo specifične aktivnosti smo definirali glede na parametre, ki smo jih lahko dobili z meritvami. Izvencelična prisotnost esteraznega encima je vzrok, da smo namesto mase suhe snovi uporabili maso proteinov v supernatantu vzorca.

3.4.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V VZORCU Z BRADFORDOVIM REAGENTOM

Bradfordov reagent omogoča hitro in natančno določanje koncentracije vseh proteinov v raztopini. Postopek temelji na nastanku kompleksa med barvilom Commasie Brilliant Blue G-250 in proteini v raztopini. Vezava povzroči premik absorpcijskega maksimuma iz 465 v 595 nm. Koncentracijo proteinov v vzorcu določimo iz umeritvene krivulje, ki podaja absorbanco znane količine proteinov v raztopini.

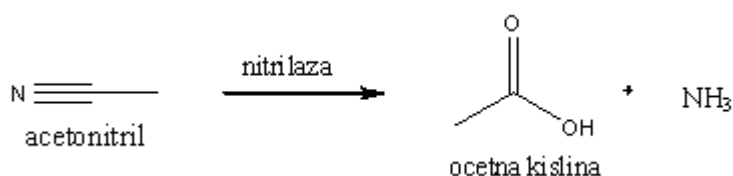
Količino proteinov smo določali v mikrotitrskih ploščah. Reakcijska mešanica je bila sestavljena iz 250 μm raztopine Bradfordovega reagenta in 5 μm vzorca. Absorbanco smo izmerili s Tecan Multifunctional Microplate Reader pri 595 nm (Fermentas, 2007).

Za ugotavljanje neznane količine proteinov v vzorcu smo pripravili umeritveno krivuljo. Znanim količinam proteinov (govejega serumskega albumina - BSA) v fosfatnem pufru (pH 7,5) smo določili vrednost A_{595} . Reakcijska mešanica je bila sestavljena iz 250 μm Bradfordovega reagenta in 5 μl raztopine vzorca proteinov z znano koncentracijo.

Dobljene vrednosti absorbanc za znano količino proteinov smo s programom Excel prikazali na sliki, skoznje narisali regresijsko premico in ji določili enačbo. Enačba premice omogoča določanje neznane količine proteinov iz izmerjene vrednosti absorbance (Fermentas, 2007).

3.5 NITRILAZE

Okoljske vzorce iz sedmih različnih virov smo nacepili v tekoče minimalno gojišče MING z dodanim virom dušika (0,5 g/l acetonitrila (AcN) ali benzonitrila (benzN) ali propionitrila (propN)), ki služi kot induktor in substrat nitrilaznih encimov. To omogoča selekcijo mikroorganizmov. Dodaten vir ogljika in energije pa je bila glukoza. Kulturo smo tedensko precepili v sveža gojišča. Po 4-mesečni bogatitvi in selekciji smo kulturo tekočega gojišča precepili na trdno gojišče z AcN in glukozo. Kolonije, zrasle na gojišču z dodatkom substrata, smo očistili do posameznih kolonij. Te smo nacepili v treh ponovitvah v centrifugirke s 5 ml gojišča MING z AcN, benzN, propN (0,5 g/l) ter jih inkubirali na stresalniku (28 °C, 24h) (Sharma in sod., 2006).



Slika 16: Pretvorba acetonitrila v očetno kislino in amoniak z nitrilaznim encimom

3.5.1 DOLOČANJE AMONIAKA V VZORCU

Nitrilazno aktivnost smo določali s komercialnim amonijevim testom (Sigma-Aldrich, 2008) za določanje količine amoniaka v vzorcu. Test se uporablja za kvantitativno, encimsko določanje amoniaka v hrani in bioloških vzorcih. Amoniak reagira z α -ketoglutarno kislino (KGA) in oksidira nikotin adenozin dinukleotidni fosfat (NADPH) v prisotnosti L-glutamatne dehidrogenaze (GDH) v dinukleotidni fosfat (NADP^+).



Zmanjšanje ΔA_{340} med oksidacijo NADPH je sorazmerno s količino amoniaka, saj L-glutamat dehidrogenaza specifično reagira z amoniakom.

Test za določanje amoniaka omogoča določanje koncentracij v območju 0,02-15 $\mu\text{g/ml}$.

Za izvedbo smo pripravili kontrolno raztopino (1 ml reagenta in 100 μl vode), standardno raztopino (1 ml reagenta in 0,05 ml standardne raztopine NH_4^+) in ničelno raztopino (1ml reagenta in 100 μl vzorca).

V reakcijsko mešanico dodamo 1 ml reagenta za amonijev test in 100 μl vzorca, inkubiramo 5 min pri 18-35 $^\circ\text{C}$ in izmerimo A_{340} . V vsako kiveto dodamo 10 μl raztopine L-glutamat dehidrogenaze in inkubiramo še 5 min pri 18-35 $^\circ\text{C}$. Po končani inkubaciji izmerimo A_{340} .

Količino amoniaka v vzorcu ovrednotimo po izračunu:

Določimo spremembo absorbance pri A_{340} (ΔA_{340}) za ničelno, testno in standardno raztopino.

Za vsako raztopino izračunamo razliko začetne vrednosti od končne:

$$\Delta A_{340} = A_{\text{začetna}} - A_{\text{končna}} \quad \dots (7)$$

Realno spremembo absorbance dobimo, če od spremembe absorbance odštejemo spremembo ničelne vrednosti.

$$\Delta(\Delta A_{340})_{\text{testne ali standardne mešanice}} = \Delta A_{340}(\text{testne ali standardne raztopine}) - \Delta A_{340}(\text{ničelne raztopine}) \quad \dots (8)$$

Količino amoniaka v vzorcu izračunamo po enačbi:

mg NH_3/ml originalnega vzorca izračunamo po enačbi:

$$\begin{aligned} \text{Količina amoniaka} &= \frac{(A)(TV)(\text{MW}_{\text{amoniaka}})(F)}{(\varepsilon)(d)(SV)(\text{konverzijski faktor za } \mu\text{g v mg})} \\ &= \frac{(A)(TV)(17)(F)}{(6,22)(1)(SV)(1,000)} \\ &= \frac{(A)(TV)(F) \times 0,00273}{(SV)} \quad \dots (9) \end{aligned}$$

$A = \Delta(\Delta A_{340})$ testne ali standardne raztopine

TV = celotni volumen testa v ml

SV = vzorec volumna v ml

MW_{amoniaka} = molska masa amoniaka = 17 g/mol ali ekvivalentno 17 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

F = dilucijski faktor za pripravo vzorca

ϵ = milimolarni ekstinkcijski koeficient za NADPH pri 340 nm [$(\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ali ekvivalentno $\text{ml}/\mu\text{mol})(1/\text{cm})$]

d = dolžina žarka (cm) = 1 cm

(Sigma-Aldrich, 2008)

3.5.1.1 Priprava mirujočih celic

Mirujoče celice smo pripravili iz obogatene kulture, ki smo jo 24 ur gojili v centrifugirkih v gojišču MING s substratom. Odpipetirali smo 1 ml vzorca in ga centrifugirali 10 min na 13000 obr/min pri 4 °C. Usedlino celic smo 2-krat sprali in nato resuspendirali v fosfatnem pufri (Sharma in sod., 2006).

Pripravljenim mirujočim celicam smo dodali 1 ml fosfatnega pufru pH = 7,5 in substrat (za delovanje nitrilaznega encima in vir hranil (AcN 0,5 g/l)). Mešanico smo premešali, inkubirali na stresalniku za 3, 5 in 23 ur na 28 °C ter izmerili količino nastalega amoniaka v vzorcu (Sigma-Aldrich, 2008).

3.5.1.2 Nastanek amoniaka v mirujočih celicah

Amoniak je stranski produkt delovanja nitrilaz. Nastala količina je odvisna od pretvorbe nitrila, količina v gojišču pa od možnosti raztapljanja plina v gojišču in količine mikrobnoporabljenega dušika za procese v celici. Analiza amoniaka v mirujočih celicah nam omogoča natančnejše določanje nastale količine amoniaka.

Najbolj aktivne seve smo obdelali, pripravili mirujoče celice in z amonijevim testom izmerili količino nastalega amoniaka. Vrednosti smo podali glede na maso nastale suhe snovi.

3.5.1.3 Nitrilazna aktivnost in specifična nitrilazna aktivnost

Aktivnost nitrilaz smo definirali kot količino nastalega amoniaka glede na maso suhe snovi ali maso proteinov.

$$\text{Nitrilazna encimska aktivnost (suhe snovi)} = \frac{\text{količina amoniaka } (\mu\text{g})}{\text{masa suhe snovi (g)}} \quad \dots(10)$$

$$\text{Nitrilazna encimska aktivnost (proteinov)} = \frac{\text{količina amoniaka } (\mu\text{g})}{\text{masa proteinov } (\mu\text{g})} \quad \dots(11)$$

Specifično aktivnost encima smo izračunali kot količino nastalega amoniaka glede na maso suhe snovi in čas trajanja reakcije.

$$\text{Specifična nitrilazna aktivnost (suhe snovi)} = \frac{\text{količina amoniaka } (\mu\text{g})}{\text{masa suhe snovi (g) čas (min)}} \quad \dots (12)$$

$$\text{Specifična nitrilazna aktivnost (proteinov)} = \frac{\text{količina amoniaka } (\mu\text{g})}{\text{masa proteinov } (\mu\text{g}) \text{ čas (min)}} \quad (13)$$

3.6 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH MIKROORGANIZOV

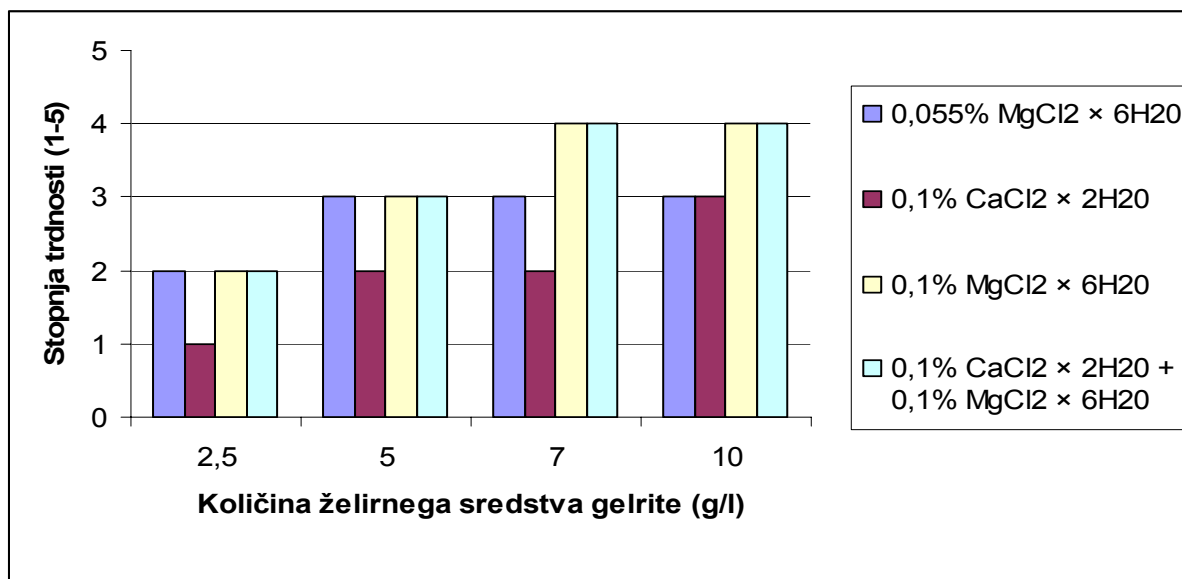
Določili smo mikroorganizme, ki so kazali zelene encimske aktivnosti. Čiste seve smo nacepili na LB gojišče do posameznih kolonij. Nadaljnje teste so izvedli v Službi za laboratorijsko kontrolo kakovosti na Oddelku za mikrobiološko kontrolo (Krka, d. d.). Za identifikacijo mikroorganizmov smo uporabili:

- barvanje po Gramu
- mikroskopski pregled kulture
- identifikacijski program API za gram negativne mikroorganizme (API® Gram-Negative Identification, BioMérieux)
- Biokemični diagnostični sistem CRYSTAL za gram pozitivne mikroorganizme (BD BBL CRYSTAL™ Gram-Positive ID System)

4 REZULTATI

4.1 ŽELIRNO SREDSTVO GELRITE® GELLAN GUM

Želirno sredstvo Gelrite® gellan gum (gelrite) predhodno ni bilo uporabljeno na oddelku za biokemijo v Krki d.d. Testirali smo vpliv kationov in količine želirnega sredstva gelrita za pridobitev ustrezne trdnosti gojišča (slika 17).



Slika 17: Vpliv koncentracije ionov (ionske jakosti) na trdnost želirnega sredstva gelrite

Stopnje trdnosti prikazane na sliki 17 smo definirali kot:

- 1- tekoče gojišče
- 2- tekoče gojišče z zmožnostjo strjevanja
- 3- trdno gojišče delno primerno za nacepitev bakterijske kulture
- 4- trdno gojišče primerno za nacepitev bakterijske kulture
- 5- prevelika trdnost gojišča

Želirno sredstvo gelrite smo testirali na gojišču s pH $7,5 \pm 0,2$. Ustrezno trdnost gojišča za kultivacijo mikroorganizmov dosežemo z dodatkom 0,1 % MgCl₂ × 6H₂O. MgCl₂ omogoči večjo zamrežitev in trdnost gojišča kakor enaka količina CaCl₂. Odločili smo se za uporabo 0,7 % želirnega sredstva gelrite in 0,1 % MgCl₂ × 6 H₂O (slika 17).

Preverili smo tudi zaviralne učinke želirnega sredstva gelrite na rast bakterij. Na gojišču z gelritom ni bilo opazne inhibicije. Ob primerjavi rasti bakterij na minimalnem gojišču brez substrata (vir ogljika, dušika in energije) je bila opazna slabša ali celo odsotna rast.

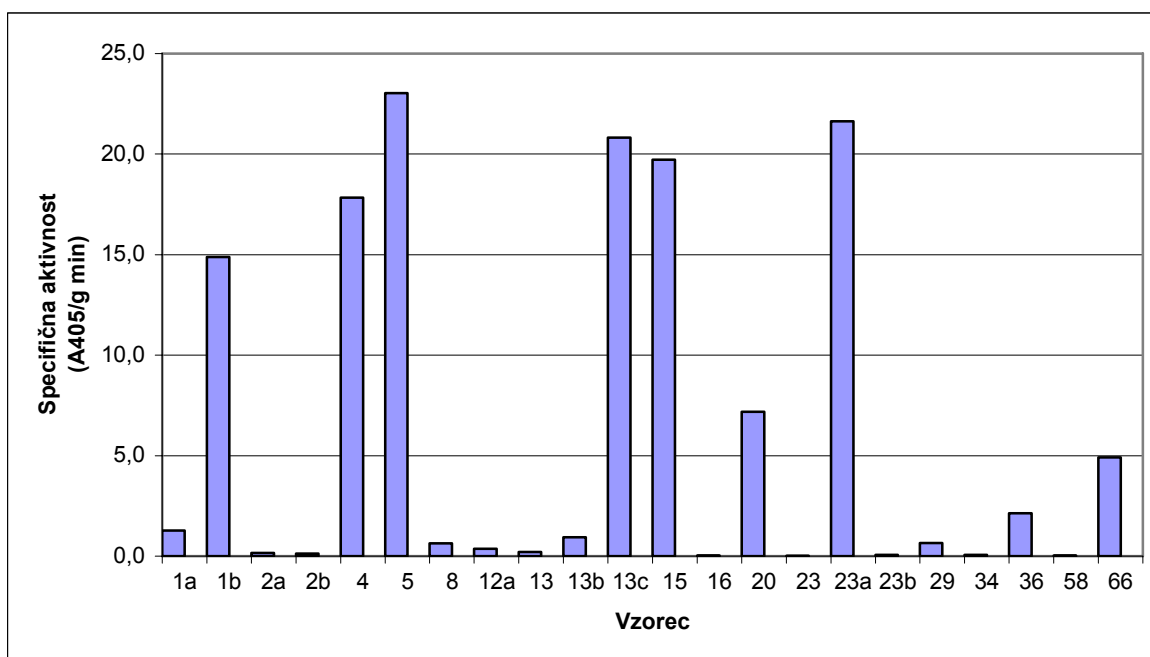
4.2 O-DEMETILAZE

Merjenje absorbance podaja prisotnost in aktivnost o-demetilaznih encimov v izoliranih mikroorganizmih. Izolirali smo 66 čistih kolonij in od tega testirali 29 sevov.

4.2.1 ABSORBANCA IN AKTIVNOST O-DEMETILAZNIH ENCIMOV

Prisotnost mikroorganizmov z o-demetilazno aktivnostjo se odraža kot sprememba absorbance, ki dokazuje prisotnost iskanega encima. Izmerili smo absorbanco nastalega obarvanega produkta delovanja o-demetilaznega encima, kar podaja stopnjo nastanka substrata in aktivnost encima.

Sprememba absorbance prikazuje veliko sposobnost pretvorbe substrata za 7 sevov (1b: G-, 4: *Micrococcus luteus*, 5: *Comomonas testosteroni*, 13: *Micrococcus sedentarius*, 13c: *Streptococcus saguis*, 15: *Comomonas testosteroni*, 23a: *Pseudomonas stutzeri*). Vzorec št. 5, *Comomonas testosteroni*, je imel največjo specifično aktivnost (slika 18).



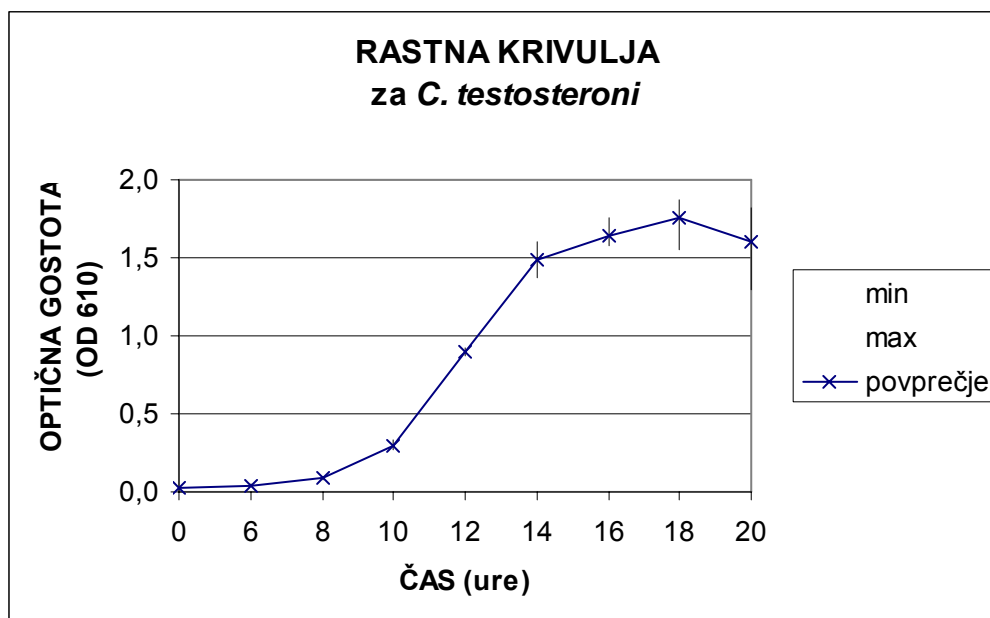
Slika 18: Specifične aktivnosti mikroorganizmov z o-demetilaznim encimom izoliranih na gojišču MING z dodatkom MBA

Od 29 testiranih sevov jih ima 6 zelo aktiven o-demetilazni encim, 3 izolati imajo prisoten encim, ostali pa imajo minimalno encimsko aktivnost. Najbolj aktiven sev z o-demetilazno aktivnostjo je *C. testosteroni* izoliran iz vzorca čistilne naprave Cerčno. Njegovo specifično aktivnost smo ovrednotili kot $3,696 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ suhe snovi (slika 18).

4.2.1.1 Rast in encimska aktivnost *C. testosteroni* z o-demetilazno aktivnostjo

4.2.1.1.1 Rast mikroorganizma *C. testosteroni* z o-demetilazno aktivnostjo

Optična gostota gojišča je sorazmerna s količino celic. Merjenje optične gostote v časovnih intervalih in rastno krivuljo *C. testosteroni* prikazuje slika 19.

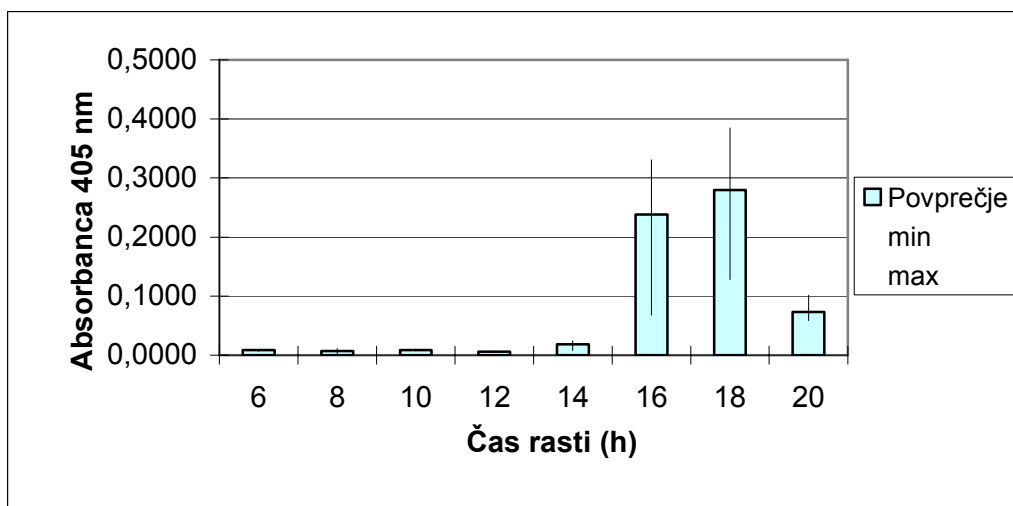


Slika 19: Rastna krivulja mikroorganizma *C. testosteroni* z o-demetilazno aktivnostjo

Po 10-urni inkubaciji se je začelo hitro pomnoževanje celic, ki je doseglo maksimalno vrednost v 18. uri po inokulaciji (slika 18). To je obdobje prehoda med logaritemsko in stacionarno fazo rasti celic. Mikroorganizem se je prilagodil na okoljski substrat ter uspešno sintetiziral potrebne encime za razgradnjo substrata in svoje delovanje.

4.2.1.1.2 Merjenje spremembe absorbance mikroorganizmov z o-demetilazno aktivnostjo v rastočih kulturah na gojišču MING z dodatkom MBA

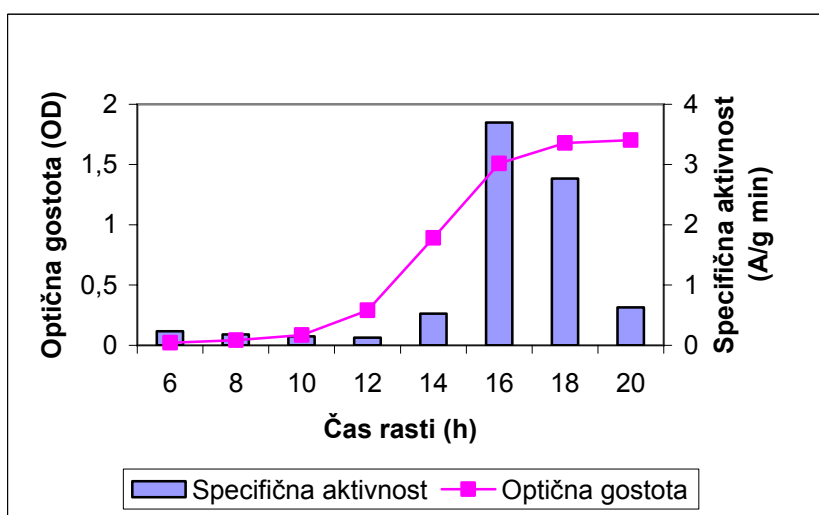
Encim ima zmožnost pretvorbe substrata, kar se kaže kot nastanek obarvanega produkta. Encimsko aktivnost smo spremljali z merjenjem absorbance, rezultati so prikazani na sliki 20.



Slika 20: Aktivnost *C. testosteroni* z o-demetilazno aktivnostjo na gojišču MING z dodatkom MBA
Izmerjene vrednosti absorbanca za *C. testosteroni* naraščajo s časom rasti. Encimska aktivnost je bila največja med 16. in 18. uro inkubacije. To je obdobje logaritemske faze rasti celic.

4.2.2 SPECIFIČNA AKTIVNOST IN RASTNA KRIVULJA O-DEMETILAZNEGA ENCIMA PRI *C. TESTOSTERONI* NA GOJIŠČU MING Z DODATKOM MBA

Specifična o-demetilazna aktivnost *C. testosteroni* je prikazana na sliki 21.



Slika 21: Specifična encimska aktivnosti in rastna krivulja *C. testosteroni* z o-demetilazno aktivnostjo na gojišču MING in dodatkom MBA

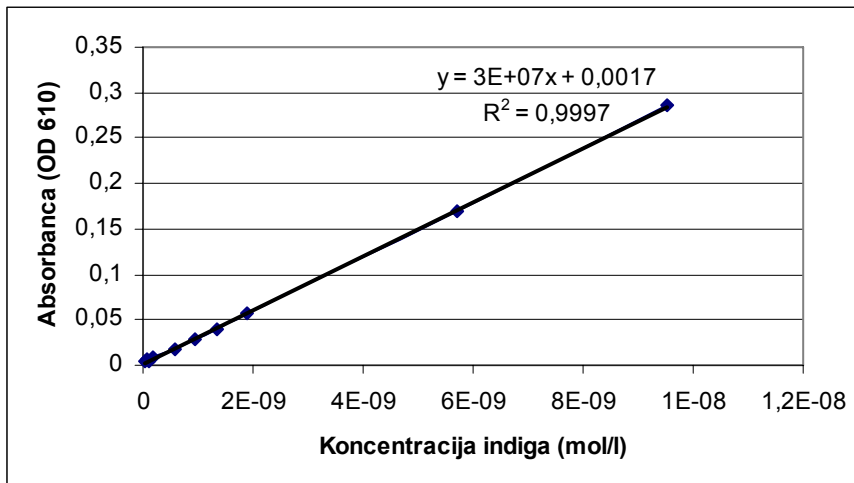
Največja specifična o-demetilazna aktivnost in optična gostota sovpadata in naraščata s časom. Specifična encimska aktivnost je dosegla maksimum v 16. uri, vrednost optične gostote *C. testosteroni* pa v 18. uri inkubacije.

4.3 MONOOKSIGENAZE

Monooksigenazno aktivnost smo zaznali z nastankom modrega barvila indiga.

4.3.1 UMERITVENA KRIVULJA ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE INDIGA

Monooksigenaze so pretvorile indol v indigo. Umeritvena krivulja za količino indiga je prikazana na sliki 22.

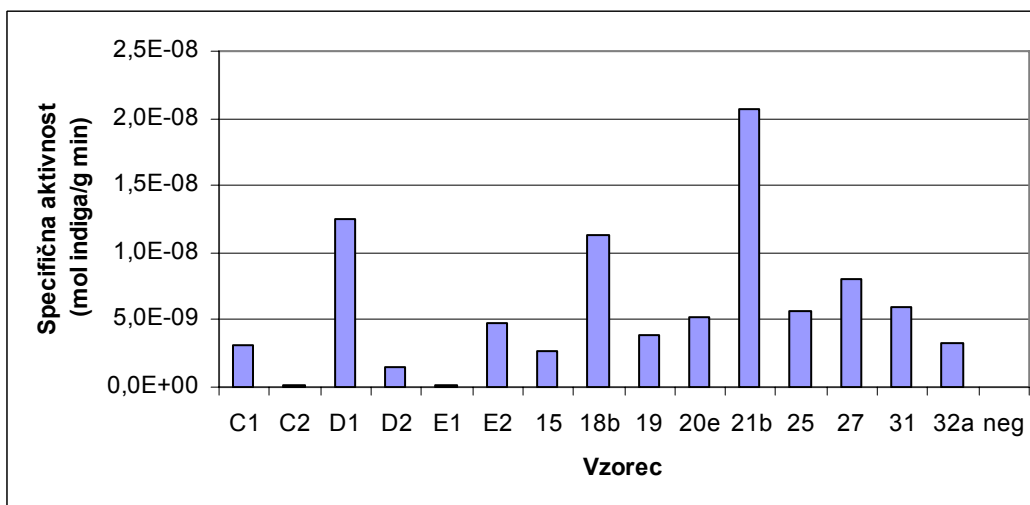


Slika 22: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije indiga v vzorcu

Enačba premice omogoča izračun koncentracije indiga ($y = 3 \times 10^7 x + 0,0017$).

4.3.2 SPECIFIČNA MONOOKSIGENAZNA ENCIMSKA AKTIVNOST

Monooksigenazno aktivnost smo testirali z sevi, iz sedmih okoljskih vzorcev. Količina nastalega indiga podaja hitrost encimske pretvorbe indola v indigo. To služi za izračun specifične monooksigenazne encimske aktivnosti prikazane na sliki 23.



Slika 23: Specifična encimska aktivnost izolatov z monooksigenazno aktivnostjo iz gojišča MING+indol

Izolirali smo 20 modro pigmentiranih čistih kolonij in od tega testirali 14 sevov. Iz izračuna specifične aktivnosti smo opazili, da imajo 3 sevi veliko (21 b: *Stenotrophomonas maltophilia*, D1: *Pseudomonas putida*, 18b: *Alcaligenes faecalis*), 8 sevov srednjo in 3 sevi minimalno sposobnost pretvorbe substrata. Največjo specifično aktivnost je imel *Stenotrophomonas maltophilia*.

Najbolj aktivne seve smo taksonomsko opredelili kot je prikazano v preglednici 6:

Preglednica 6: Identificirani sevi z aktivnim monooksigenaznim encimom

ŠT. IZOLATA	RODOVNO IN VRSTNO IME
C1	<i>Streptococcus uberis</i>
D1	<i>Pseudomonas putida</i>
18b	<i>Alcaligenes faecalis</i>
19	<i>Aerococcus urinae</i>
20e	<i>Alcaligenes faecalis</i>
21b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
25	<i>Aerococcus urinae</i>
27	<i>Aerococcus urinae</i>
31	<i>Alcaligenes faecalis</i>
32 a	<i>Pseudomonas putida</i>

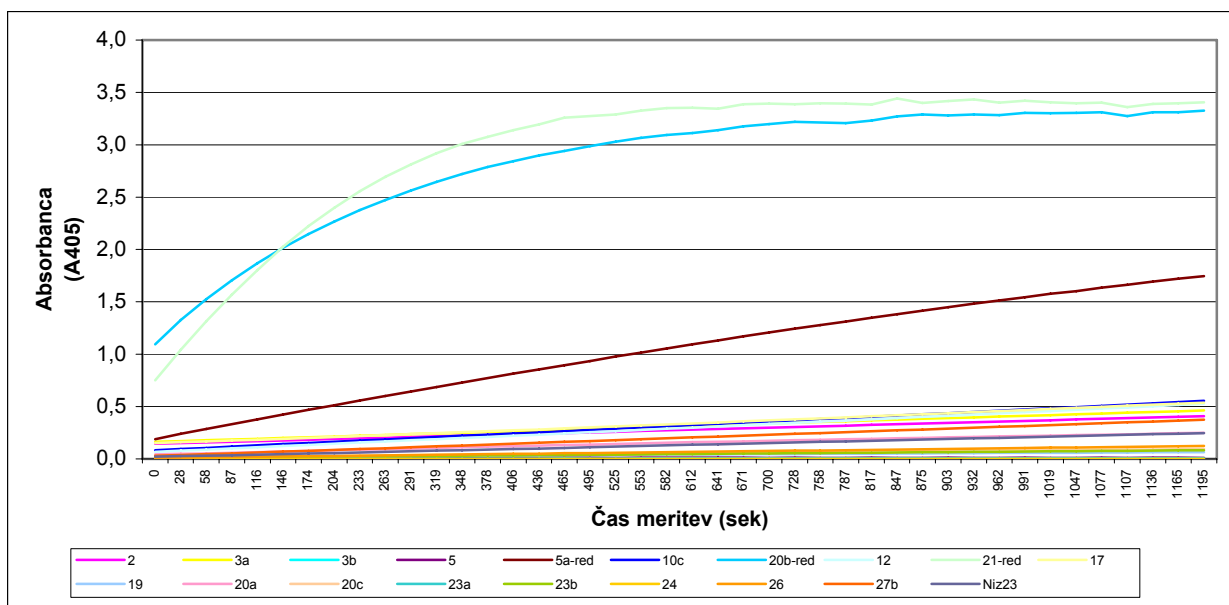
4.4 ESTERAZE

Esterazno aktivnost smo določali kot količino pretvorjenega substrata in izračunali encimsko aktivnost.

4.4.1 ESTERAZNA AKTIVNOST

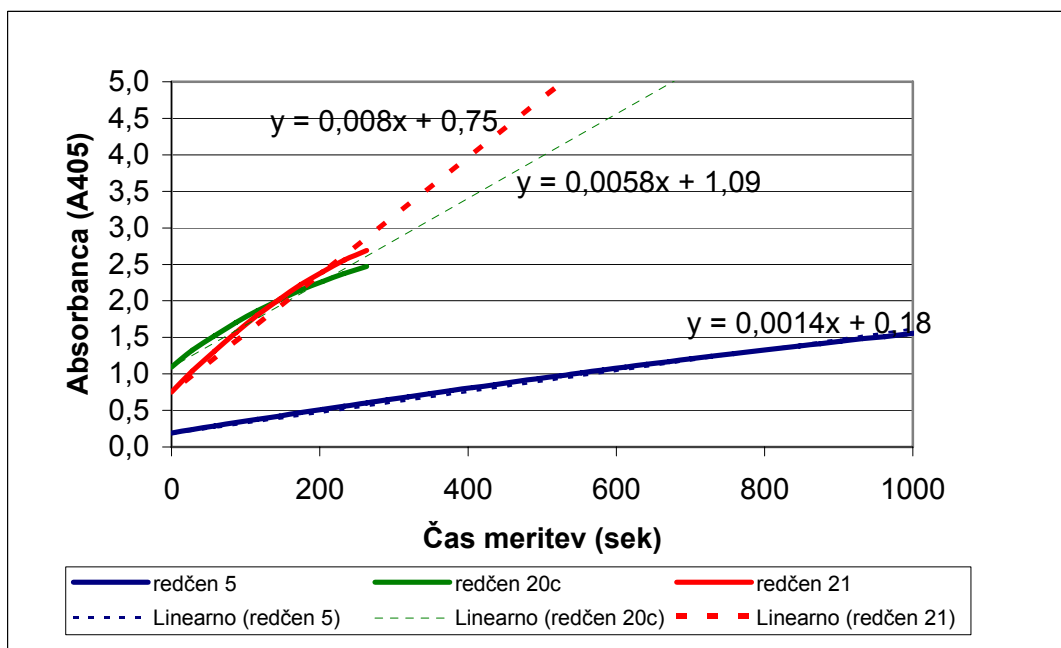
Esterazno aktivnost smo merili spektrofotometrično in jo časovno prikazali na sliki 24. Krivulji smo priredili enačbo premice $y = a x + b$. Ta ovrednoti hitrost encimske pretvorbe. Vrednost a nam poda naklon premice, ki je sorazmeren s hitrostjo pretvorbe substrata.

Slika 24 podaja izmerjene vrednosti absorbanc esterazne aktivnosti v supernatantu vzorcev.



Slika 24: Pretvorba obarvanega kompleksa kot posledica delovanje esteraznega encima

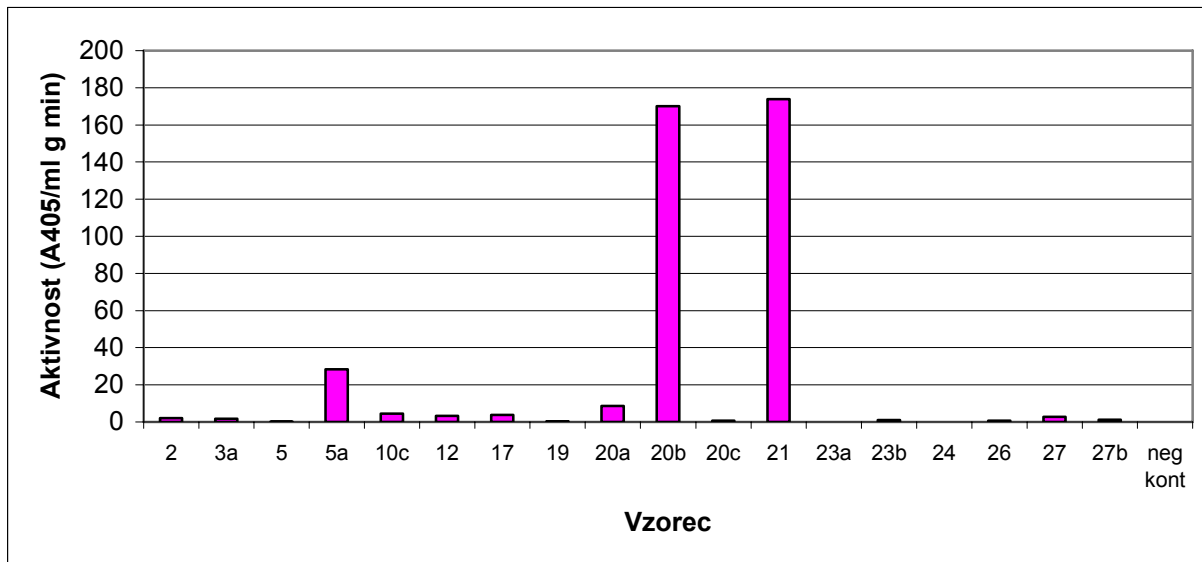
Krivuljam z največjim naklonom smo v začetnem najbolj strmem delu krivulje določili regresijsko enačbo. Ta poda naklon oz. maksimalno hitrost encimske pretvorbe, kar lahko uporabimo kot esterazno aktivnost. Najstrmejše krivulje so prikazane na sliki 25 skupaj s pripadajočimi regresijskimi premicami in njihovimi enačbami.



Slika 25: Pretvorba obarvanega kompleksa in recesijske premic delovanja esteraznega encima

Izmerjene hitrosti pretvorbe so dokaz aktivnosti esteraznega encima v izoliranih mikroorganizmih. Izolirali smo 30 čistih kolonij in od tega testirali 16 sevov. Iz hitrosti

pretvorbe substrata in količine izvenceličnih proteinov prisotnih v supernatantu vzorca smo opazili, da imata 2 seva (*Stenotrophomonas maltophilia* in *Corynebacterium jeikerum*) visoko izraženo aktivnost, 1 nizko, ostali sevi pa imajo zanemarljive vrednosti. Rezultati so prikazani na sliki 26.



Slika 26: Specifične esterazne aktivnosti sevov izoliranih iz gojišča MING z dodatkom etil linoleata

Najbolj aktivne seve smo taksonomsko opredelili in jih prikazali v preglednici 7:

Preglednica 7: Identificirani sevi z aktivnim esteraznim encimom

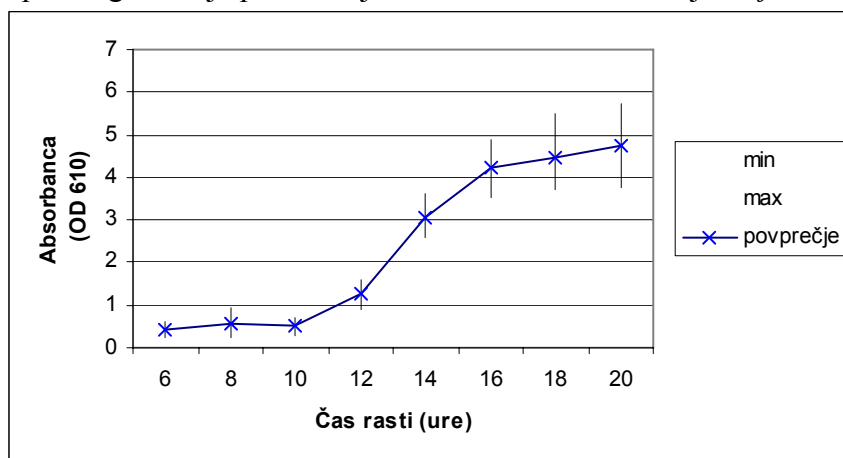
ŠT. IZOLATA	RODOVNO IN VRSTNO IME
3a	<i>Ochrobacter anthropi</i>
5a	<i>Corynebacterium jeikerum</i>
17	<i>Pediococcus sp.</i>
19	<i>Aerococcus urinae</i>
20a	<i>Alcaligenes faecalis</i>
20b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
20c	<i>Aerococcus urinae</i>
21	<i>Corynebacterium jeikerum</i>
24	<i>Streptococcus uberis</i>

4.4.2 RAST IN ESTERAZNA AKTIVNOSTI SEVA *C. JEIKERUM*

Vzorcu z največjo encimsko aktivnostjo *C. jeikerum* smo izmerili rast celic v gojišču in hitrost pretvorbe substratov. To smo uporabili za izračun encimske aktivnosti v različnih časovnih obdobjih.

4.4.3 RAST MIKROORGANIZMA *C. JEIKERUM* NA GOJIŠČU MING Z DODATKOM ETIL LIOLEATA

Optična gostota je pokazatelj rasti celic. Rastno krivuljo *C. jeikerum* prikazuje slika 27.

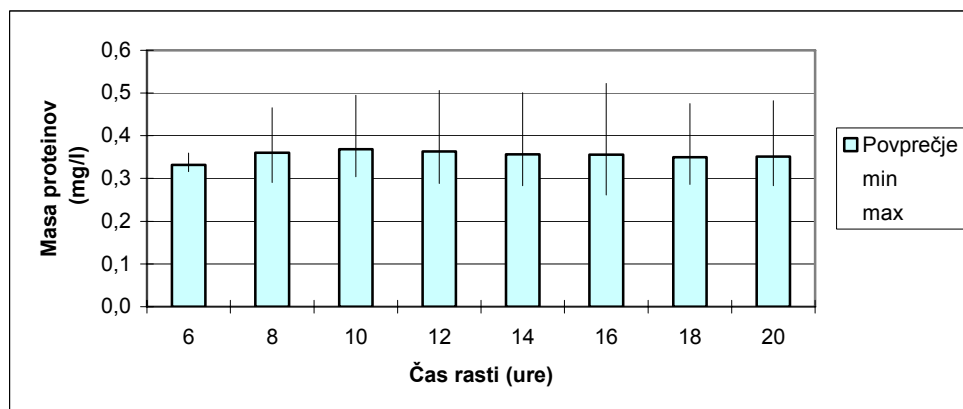


Slika 27: Rastna krivulja seva *C. jeikerum* z esteraznim encimom na gojišču MING z etil lionoleatom

Hitra delitev celice se je začela po 12. uri in dosegla maksimalno vrednost v 20. uri po inokulaciji *C. jeikerum* v gojišče (slika 27).

4.4.4 KOLIČINA IZVENCELIČNIH PROTEINOV V SUPERNATANTU VZORCA

Količino izvenceličnih proteinov v supernatantu smo merili z Bradfordovim testom. Dobljene vrednosti so prikazane na sliki 28.

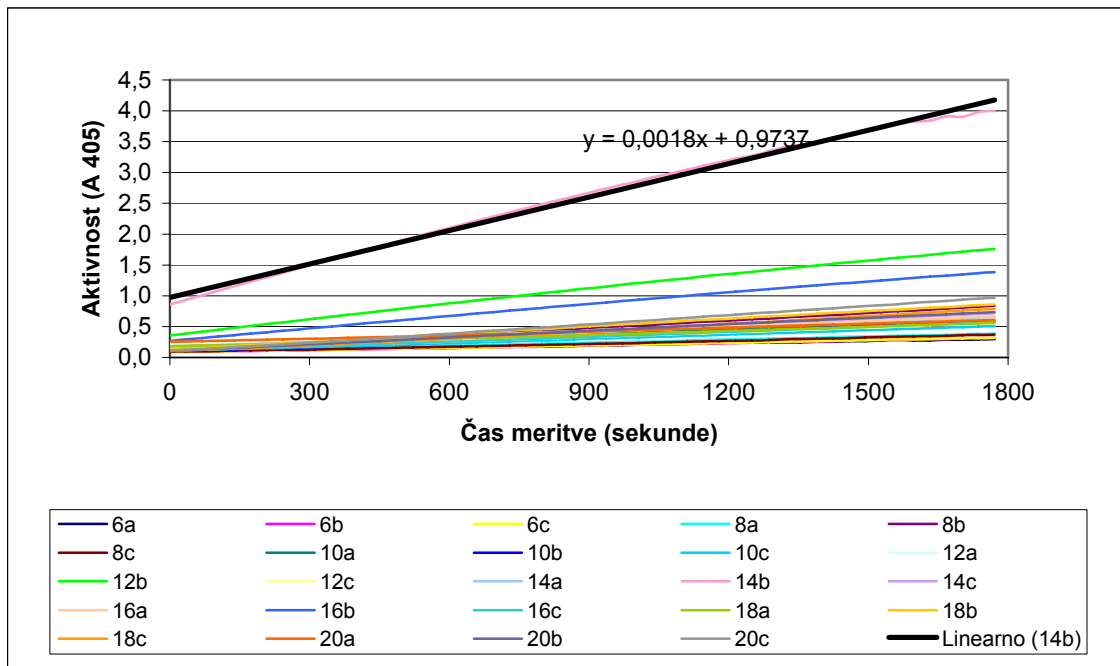


Slika 28: Količina izvenceličnih proteinov v supernatantu kulture inokulirane z *C. jeikerum*

Predpostavili smo, da je večina izmerjenih izvenceličnih proteinov v supernatantu esteraz. Opazimo rahel trend naraščanja količine proteinov do 16. ure inkubacije kulture v gojišču.

4.4.4.1 Hitrost pretvorbe substrata pri *C. jeikerum* z esterazno aktivnostjo

Spreminjanje absorbance glede na čas inkubacije mikroorganizma v gojišču.



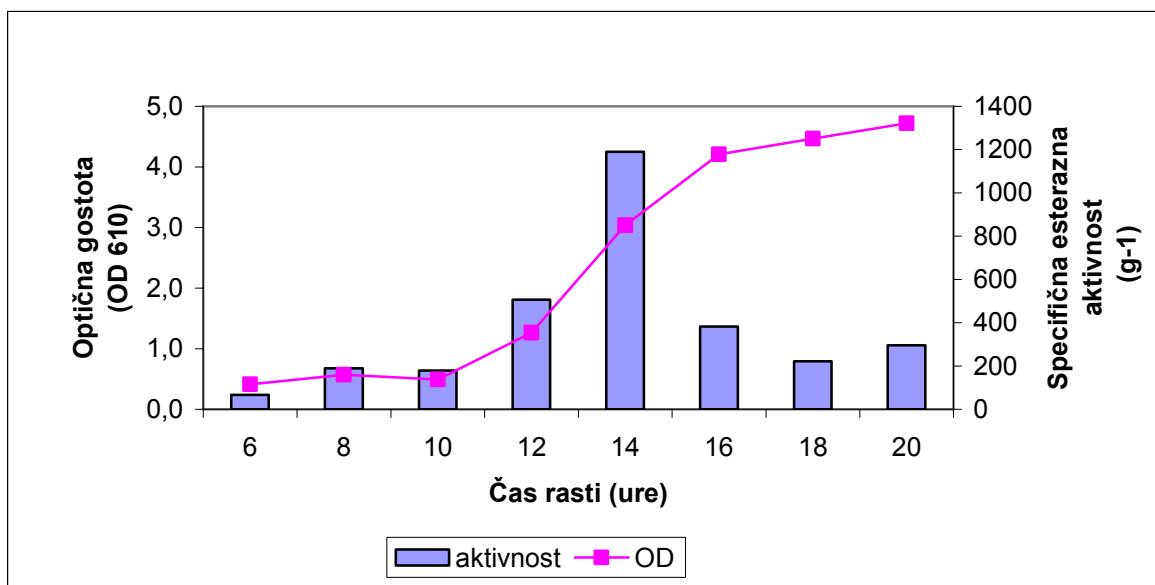
Slika 29: Pretvorba substrata med rastjo seva *C. jeikerum* z esterazno aktivnostjo

Naklon premice poda hitrost pretvorbe substrata v časovni enoti in služi za izračun specifične aktivnosti esteraznega encima prikazane na sliki 29.

4.4.4.2 Specifična esterazna aktivnost in rast seva *C. jeikerum* z esterazno aktivnostjo na gojišču MING z dodatkom etil linoleata

Izmerili smo hitrost pretvorbe substrata in količino izvenceličnih proteinov v supernatantu. Iz povprečnih vrednosti smo izračunali specifično aktivnosti esteraznega encima glede na čas rasti in količino proteinov v vzorcu.

Vrednosti specifične esterazne encimske aktivnosti in optične gostote celic smo prikazali grafično na sliki 30.



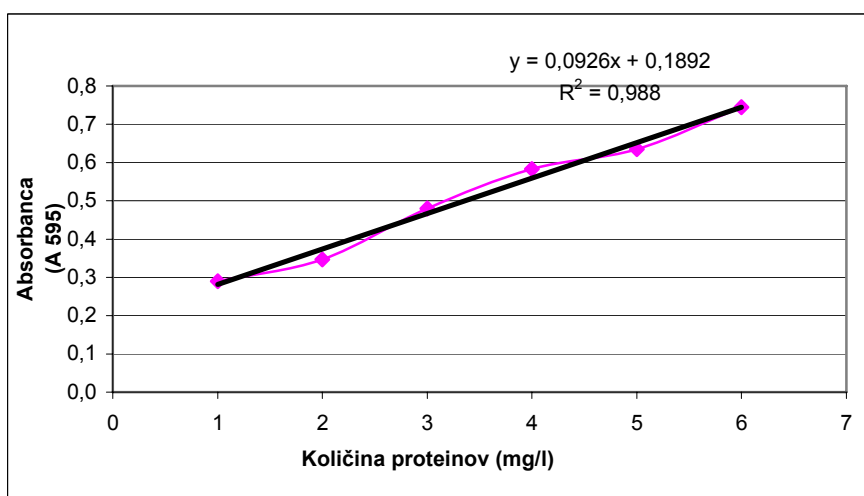
Slika 30: Specifična esterazna aktivnost in rastna krivulja *C. jeikerum* na gojišču MING z etil linoleatom. Optična gostota in specifična encimska aktivnost naraščata s časom inkubacije *C. jeikerum*. Optična gostota je največja v času eksponentne rasti, ko je prisotno veliko število celic z aktivnim metabolizmom. Preplet dejavnikov se opazi v povečani encimski aktivnosti (slika 30).

4.4.5 DOLOČANJE PROTEINOV Z BRADFORDOVIM TESTOM

Z Bradfordovim testom smo določali količino proteinov v vzorcih. Vezava reagenta in proteinov povzroči spremembo v absorpcijskem maksimumu iz 465 v 595 nm.

4.4.5.1 Umeritvena premica za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu

Neznano količino proteinov v vzorcu smo ovrednili iz umeritvene krivulje



Slika 31: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov z Bradfordovim reagentom

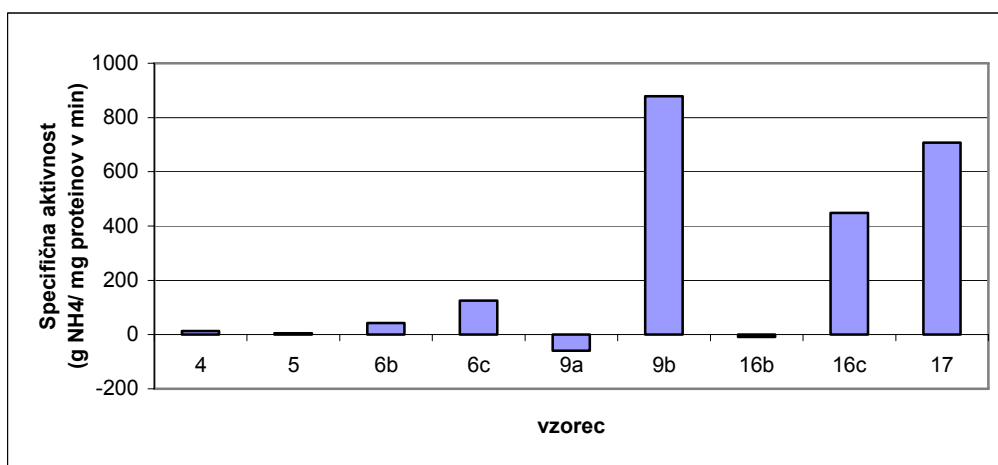
Količino proteinov v vzorcih izračunamo iz umeritvene krivulje ($y = 0,0926x + 0,1892$) na sliki 31.

4.5 NITRILAZE

Nitrilazno aktivnost smo ovrednotili s količino nastalega amoniaka.

4.5.1 SPECIFIČNA NITRILAZNA AKTIVNOST IZOLATOV NA RAZLIČNIH SUBSTRATIH

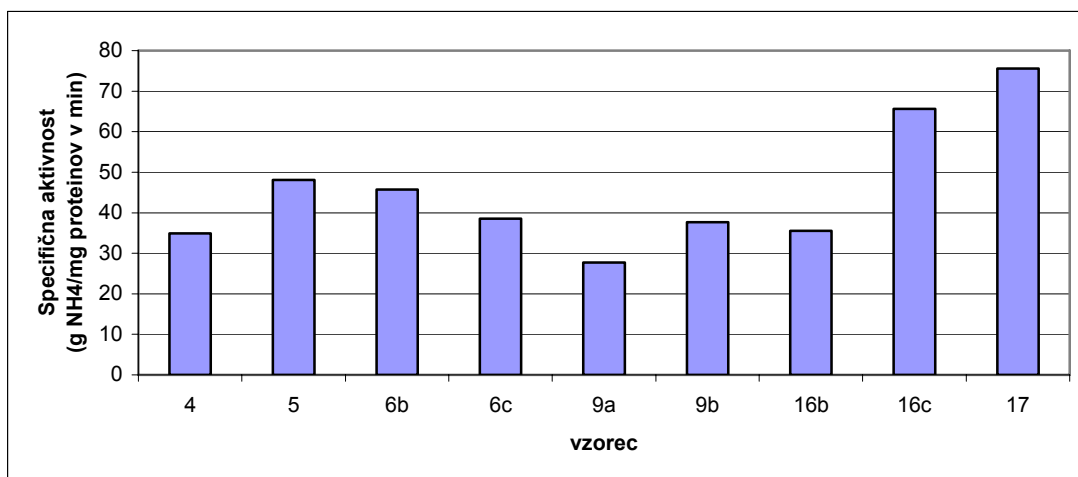
Količino nastalega amoniaka smo izmerili za 10 čistih kolonij zraslih na trdnem minimalnem gojišču z dodatkom substrata (AcN, benzN in propioN) in virom ogljika (glukoze).



Slika 32: Specifična nitrilazna aktivnost izolatov v gojišču MING z dodatkom AcN

Izolirali in precepili smo 30 kolonij in dobili 17 čistih kultur. Trije testirani sevi imajo izraženo veliko (9b: *Pseudomonas aeruginosa*, 16c: *Pseudomonas aeruginosa*, 17: *Klebsiella pneumoniae*), ostali pa neizrazito encimsko aktivnost (slika 32). Najbolj aktiven sev je *Pseudomonas aeruginosa* z specifično aktivnostjo $879,03 \text{ mg NH}_3 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteina.

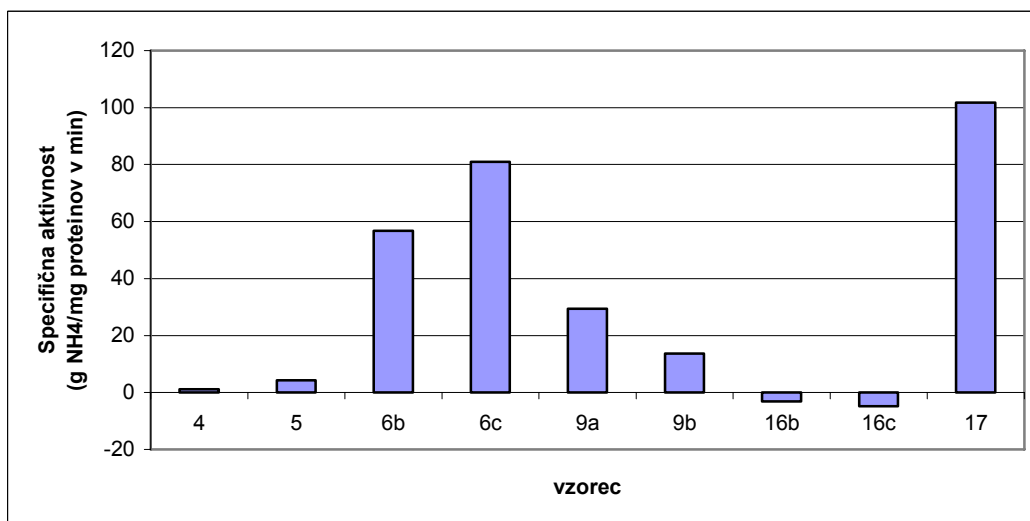
Nitrilazna aktivnosti mikroorganizmov v gojišču z benzonitrilom:



Slika 33: Specifična nitrilazna aktivnost izolatov v gojišču MING z benzonitrilom

Izolirali in precepili smo 30 kolonij in dobili 17 čistih kultur. Vsi testirani sevi imajo izraženo veliko encimsko aktivnost. Največjo specifično aktivnost ima *Klebsiella pneumoniae* in znaša $75 \text{ mg NH}_3 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteina (slika 33).

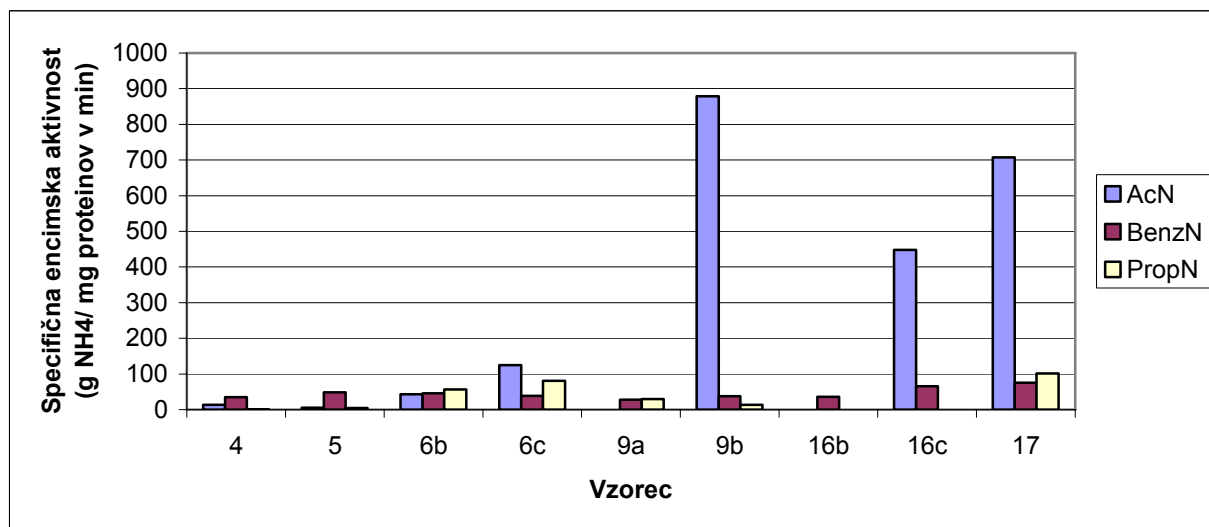
Aktivnosti mikroorganizmov v gojišču s propionitrilom prikazuje slika 34.



Slika 34: Specifična nitrilazna aktivnost izolatov v gojišču MING s propionitriom

Izolirali in precepili smo 30 kolonij in dobili 17 čistih kultur. Trije testirani sevi imajo visoko izraženo aktivnost (6c: *Klebsiella pneumoniae*, 6b: *Stenotrophomonas maltophilia*, 17: *Klebsiella pneumoniae*), ostali sevi pa imajo slabo izraženo nitrilazno aktivnost (slika 34). Največjo specifično nitrilazno aktivnost ima *Klebsiella pneumoniae*, ki je $101,77 \text{ mg NH}_3 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteina.

Primerjava specifične nitrilazne aktivnosti glede na vrsto substrata.



Slika 35: Primerjava specifične encimske aktivnosti izolatov na gojišču MING z Acn, benzN ali propN

Sevi izražajo največjo encimsko aktivnost na AcN, sledi pa mu benzN (slika 35). Ti mikroorganizmi imajo največjo zmožnost cepitve alifatskih, preprostih nitrilov. Ob prisotnosti aromatskih in kompleksnejših skupin pa se katalitična aktivnost zmanjša.

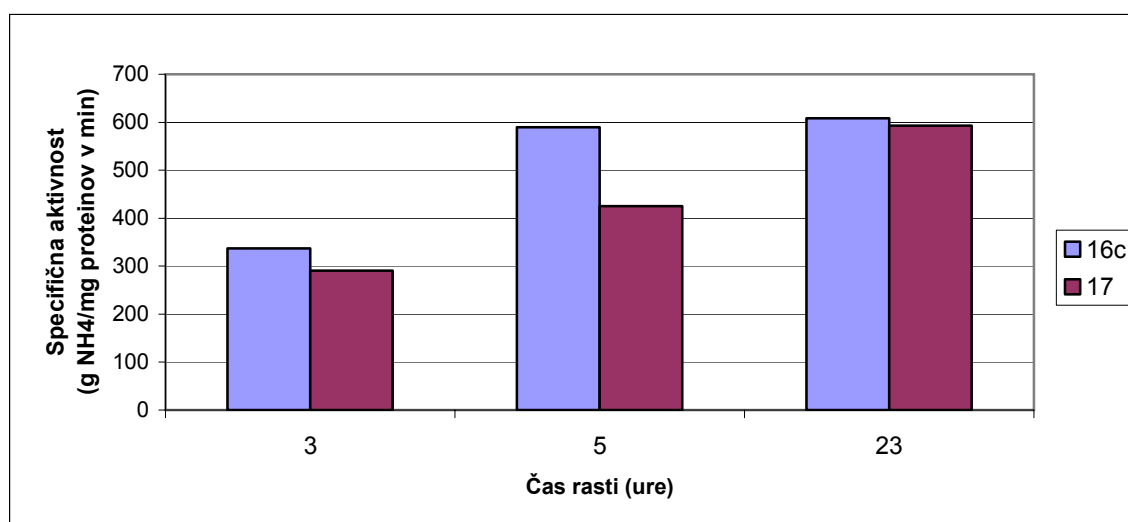
Seve z največjo specifično aktivnostjo smo določili in podali v preglednici 8:

Preglednica 8: Sevi z aktivnim nitrilaznim encimom

ŠT. IZOLATA	RODOVNO IN VRSTNO IME
5	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
7	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
6b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
6c	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

4.5.2 PRODUKCIJA AMONIAKA V MIRUJOČIH CELICAH

Amoniak je stranski produkt delovanja nitrilaz. Za izključitev dejavnikov celice (rastni faktorji, poraba in raztapljenja amoniaka, ...) in natančnejše določanje količine amoniaka smo izmerili količino amoniaka v mirujočih celicah.



Slika 36: Nitrilazna aktivnost mirujočih celic *Pseudomonas aeruginosa* in *Klebsiella pneumoniae*

Sev 16c, *Pseudomonas aeruginosa*, ima večjo specifično nitrilazno encimsko aktivnost od seva 17 (*Klebsiella pneumoniae*). Pri obeh sevih količina amoniaka narašča s časom in je največja po 23 urni inkubaciji (slika 36).

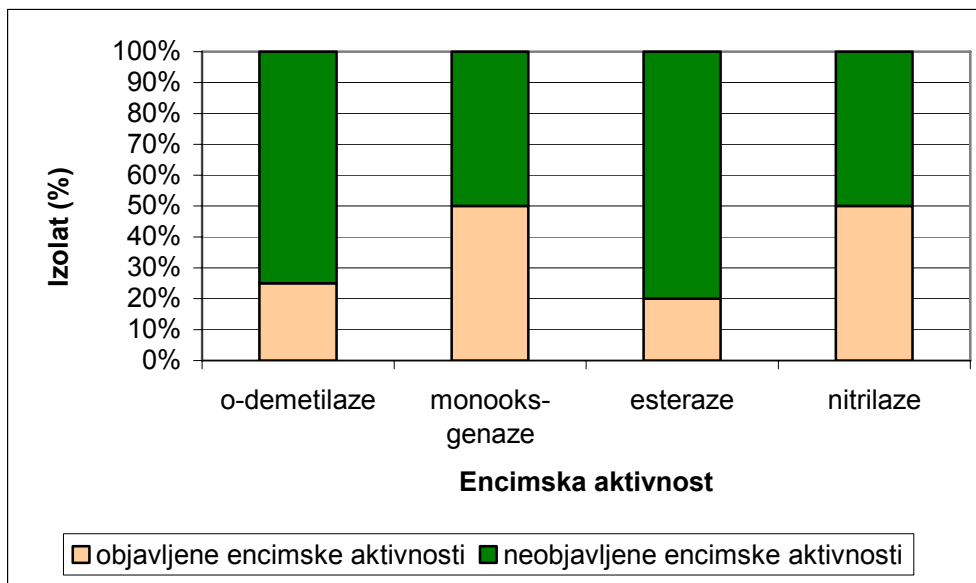
4.6 PREGLED ŠTEVILA ZNANSTVENIH OBJAV ZA IDENTIFICIRANE SEVE Z ENCIMSKO AKTIVNOSTJO

Po izolaciji in določitvi sevov je sledilo preverjanje poročanja prisotnosti o-demetilaznih, monooksigenaznih, esteraznih in nitrilaznih encimskih aktivnosti v izoliranih mikroorganizmih. Informacije smo iskali v znanstveni literaturi zbrani v podatkovni bazi Web Of Science.

Preglednica 9: Pregled identificiranih sevov in njihovo pojavljanje v znanstveni literaturi

AKTIVNOST	ŠT. KOLONIJ ZA ANALIZO	ŠT. AKTIVNIH VZORCEV	OBJAVLJENA AKTIVNOST	NEOBJAVLJENA AKTIVNOST
o-demetilaze	66	15	3	9
esteraze	30	9	4	4
monooksigenaze	34	5	1	4
nitrilaze	17	4	2	2

Encimsko aktivnost smo analizirali pri že znanih in tudi nekaterih novih mikroorganizmih (preglednica 9 in slika 37).



Slika 37: Izolirani sevi z encimskimi aktivnostmi in obstoječa poročila o njihovi aktivnosti v znanstveni literaturi

Okoljski vzorci predstavljajo velik potencial za odkritje novih mikroorganizmov z želenimi encimskimi aktivnostmi ali za odkritje novih metabolnih poti.

Odkrite encimske aktivnosti lahko pripomorejo k poenostavitvi proizvodnjih procesov, njihovi ekonomičnosti, okolju sprejemljivejši sintezi organskih snovi, uničenju nezaželenih snovi, pretvorbi substrata v bolj polarno, topno ali aktivno obliko za nadaljnje procese.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Mikroorganizmi so zelo prilagodljivi organizmi. Najdemo jih v različnih življenjskih okoljih. Živijo lahko pri visokih temperaturah, ekstremnih pH vrednostih in v razmerah povišane slanosti. Za delovanje metabolnih poti imajo v prisotne encime. To so biokatalizatorji, ki lahko pretvorijo snovi iz okolja mikroorganizma do prehrabnih, energetskih in gradbenih elementov mikrobne celice.

Encimski presejalni testi so pomembni za selekcioniranje in odkrivanje mikroorganizmov z iskanimi encimskimi aktivnostmi. Analiza encimskih funkcij temelji na fizikalnih ali kemijskih načinih zaznavanja signala ali produkta. Ta je sorazmeren z encimskim delovanjem in omogoča ovrednotenje encimske aktivnosti (Kirk in sod., 2002).

Učinkovito izolacijo mikroorganizmov z iskanimi encimskimi aktivnostmi nam je omogočila uporaba novega želirnega medija Gelrite[®] gellan gum (gelrite). Gelrite je čist, naraven in prozoren medij, ki omogoča pripravo trdnega gojišča. Strjevanje je hitro, stabilen je pri visokih temperaturah in lahko zdrži avtoklaviranje. Primeren je za termofilne mikroorganizme in ne vsebuje primesi. Po segrevanju tvori ireverzibilno trd gel iz linearno zamreženih polisaharidov (glukoronske kisline, glukoze, ramnoze). Gelrite ima v primerjavi z agarjem več prednosti. Njegova sestava mu omogoča odpornost na encimsko razgradnjo. Lahko se uporablja v manjši količini. Trdnost gela je odvisna od koncentracije eno ali dvovalentnih kationov v raztopini. Ob prisotnosti topnih soli lahko uporabimo manjšo količina gela (tudi do pol manj kot pri agarju). Glede na dobljene rezultate, prikazane na sliki 17, smo se odločili, da bomo uporabljali 0,7 % gelrite in 0,1 % $MgCl_2 \times 6 H_2O$. Njegova čistost, slaba razgradnja z mikroorganizmi in manjša občutljivost na fizikalno-kemijske razmere pa preprečijo izolacijo velikega števila lažno pozitivnih sevov (Sigma-Aldrich, 2007).

V okviru diplomskega dela smo želeli izolirati mikroorganizme z o-demetilaznimi, monooksigenaznimi, esteraznimi in nitrilaznimi encimskimi aktivnostmi.

O-demetilaze so znotrajcelični encimi, ki odstranijo metilno (CH_3 -) skupino vezano z etrsko vezjo v proteinih ali drugih spojinah. Z MBA smo inducirali sintezo encima in ovrednotili njegovo delovanje. S presejalnimi metodami za o-demetilazne encime smo selekcionirali

mikroorganizme. Izolirali smo 29 sevov in izmerili njihovo aktivnost. Veliko encimsko aktivnost smo odkrili pri vrstah *Comomonas testosteroni*, *Micrococcus lutes*, *Micrococcus sedentarius*, *Streptococcus sanguis* in *Pseudomonas stutzeri* (slika 18). Največ sevov s prisotno aktivnostjo smo našli v vzorcih iz ČN IUUV, nekoliko manj iz pilotne naprave KI in ČN Domžale Kamnik.

Najbolj aktiven sev z o-demetilazno aktivnostjo je *C. testosteroni* izoliran iz čistilne naprave Cerčno. Njegova specifična aktivnost je $3,696 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ suhe snovi. Specifična aktivnost encima ter rastna krivulja *C. testosteroni* naraščata s časom inkubacije in sta največji po 18 urah inkubacije mikroorganizma v gojišču. Mikroorganizem se v tem času dobro prilagodi na substrat v okolju, začne se intenzivna sinteza encima in pospešen celični metabolizem.

V znanstveni literaturi so najpogosteje poročali o o-demetilazni encimski aktivnosti pri *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. (*P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. testosteroni*, *P. fluorescens*, *P. testosteroni*), *Streptomyces* spp., *Noecardia* sp. in *Arthrobacter* spp.

Simoni in sod. so pri *Arthrobacter* sp. o-demetilazno encimsko aktivnost inducirali s t-anetolom ter izmerili specifično aktivnost $6,40 \text{ U ml}^{-1}$. Ribbons in sod. so poročali o o-demetilazni aktivnosti *P. testosteroni* in *P. aeruginosa*, ki pretvarjata 4-metoksibenzojsko kislino. Aktivnost so merili kot porabo kisika glede na razgradnjo substrata in znaša $2,2 \text{ mmol O}_2 \text{ mol}^{-1}$ vanilata (Ribbons, 1971). Bernhar in sod. pa so pri *P. putida* inducirani z 4-metoksibenzojsko kislino izmerili o-demetilazno aktivnost 360 mU mg^{-1} proteina.

Naš sev *C. testosteroni* ima aktivnostjo $23,040 A_{405} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ suhe snovi. Način zaznave encimske aktivnosti in merjenja, nam ne omogočata kvantitativne primerjave z drugimi encimskimi vzorci podanimi z drugimi enotami.

Monooksigenaze katalizirajo prenos kisikovega atoma iz molekule kisika v substrat in redukcijo druge molekule kisikovega atoma v vodo. So pomembni znotrajcelični encimi za prenos elektronov in njihovo aktivnost (Madigan, 1997).

Monooksigenazno aktivnost smo spremljali kot količino pretvorjenega indola v modro obarvano barvilo indigo. Encim za svoje delovanje potrebuje prisotnost induktorja arginina. Ta spodbudi sintezo in ekspresijo monooksigenaznega encima. Modro obarvane kolonije smo precepljali, določili količino indiga in ovrednotili encimsko aktivnost.

Izolirali smo 16 sevov in ovrednotili njihovo encimsko aktivnost. Najbolj aktivni sevi so *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes faecalis* in *Aerococcus urinae* (slika 23). Največ sevov s prisotno aktivnostjo smo izolirali iz vzorca ČN IUUV in ČN Melamina, nekaj pa tudi iz ČN Domžale-Kamnik, Cerčno in Krka. Pri

sevih *S. uberis*, *A. faecalis*, *A. urinae* in *S. maltophilia* smo identificirali monooksigenazno aktivnost o kateri predhodno niso poročali v znanstveni literaturi.

Najbolj aktivni sev *S. maltophilia* je bil izoliran iz aktivnega blata ČN IUUV, njegova specifična encimska aktivnost znaša $2,07 \times 10^{-8} \text{ mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ suhe snovi.

V znanstveni literaturi so poročali o monooksigenazni aktivnosti pri *B. cepacia*, *P. putida*, *B. megaterium*, *Rhodococcus* sp., *Candida* spp., *T. thermophilus*, *P. mendocina*, *R. pickettii*, *P. stutzeri*, *R. pickettii*, ... (Bommarius A.S. 2004; Brouk M. in Fishman A. 2009).

Pri *Pseudomonas* sp. je prisotna stirenska monooksigenaza. Toluenska monooksigenazna aktivnost pri *B. cepacia* znaša $12.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein (Brouk, Fishman, 2009). *Aspergillus terreus* pa ima citokrom P450 monooksigenazo, ki ima največjo specifično aktivnost na substratu dimetildulfooksidu in je $9,70 \text{ U mg}^{-1}$ (Vatsyayan, 2008).

Specifično monooksigenazna aktivnost izoliranega seva *S. maltophilia* lahko primerjamo z aktivnostjo *B. cepacia*. Tu specifična aktivnost znaša $12.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein, pri *S. maltophilia* pa $0,207 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ suhe snovi. Upoštevati pa je potrebno, da smo aktivnost encima *S. maltophilia* podali glede na maso suhe snovi, ki lahko vsebuje poleg encimov tudi druge komponente celice, ter da delovanje encima nismo optimizirali glede na substrat, gojišče in pogoje rasti. Ob upoštevanju teh dejavnikov lahko ovrednotimo dobro delovanje encima iz izoliranega mikroorganizma.

Esteraze katalizirajo reakcije cepitve ali tvorbe estrske vezi v spojini. Esteraze hidrolizirajo kisikovo estrsko vez (specifično ali nespecifično) in pretvorijo širok spekter substratov. To jim omogoča proizvodnjo optično čistih sestavin za kemijsko sintezo (Bommarius, 2004).

Selektivno gojišče z dodatkom etil linoleata in izbrane presejalne metode so omogočile izolacijo sevov z esterazno aktivnostjo. Izmerili smo stopnjo pretvorbe substrata in določili encimsko aktivnost. Esterazno aktivnost smo odkrili pri 8 sevih. Največja je pri *Corynebacterium jeikerum*, *Stenotrophomonas maltophilia* in *Alcaligenes faecalis* izoliranih iz aktivnega blata ČN Domžale Kamnik, IUUV in Krka. Esterazno aktivnost smo na novo identificirali pri *S. sanguis*, *O. anthropi*, *A. urinae* in *S. uberis* (slika 26).

Najbolj aktiven sev je *C. jeikerum* izoliran iz ČN Domžale Kamnik. Njegova specifična aktivnost znaša $1189,668 \text{ A min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ proteinov. Preverili smo tudi spreminjanje encimske aktivnosti s časom inkubacije v gojišču pri sevu *C. jeikerum*. Izmerili smo optično gostoto, encimsko aktivnost in količino proteinov glede na čas rasti mikroorganizma. Rastna krivulja *C. jeikerum* prikazuje faze rasti. Največja aktivnost je 20 ur po inokulaciji. Specifična

encimska aktivnost in gostota celic sta dosegli največjo vrednost po 14 urah inkubacije. Kultura se je prilagodila na okoljski substrat, intenzivneje sintentizirala encim za metabolizem in začela se je pospešena rast ter encimska aktivnost (slika 30).

Esteraze so pogost prisoten in uporaben encim v naravi. V literaturi poročajo o njegovi prisotnosti pri *P. fluorescens*, *L. plantarum*, *Trichoderma* sp., *S. thermophile*, *S. scabies*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Moraxella* sp., *B. subtilis*, *A. globiformis*, itd. Očiščen zunajcelični esterazni encim iz *Micrococcus* sp. ima specifično encimsko aktivnost $0.809 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Bommarius, 2004). Primerjava z našim izoliranim encimom in esteraznim encimom *Micrococcus* sp. ni možna, saj naš način zaznave encimske aktivnosti in merjenja ne omogočata kvantitativne primerjave.

Nitrilaze so razred encimov, ki katalizirajo hidrolizo organonitrilnih sestavin v ustrezno karboksilno kislino pri milih pogojih (Mueller, 2006; Martínková, 2008). Stranski produkt pri pretvorbi nitrilov z nitrilazami je amoniak. Ta ovrednoti aktivnost nitrilaz. Amoniak je plin in je v gojišču težko določljiv. V gojišču se lahko raztaplja, celice ga lahko porabljajo v nadaljnjih procesih kot vir dušika, del pa se ga veže s sestavinami v gojišču. To privede do preverjanja nastajanja amoniaka v mirujočih celicah. Tako se zmanjša vpliv okolja, presnovnih funkcij in potreb celic. Količino amoniaka smo poizkusili ovrednotiti z več metodami. Kolorimetrična metoda z CoCl_2 ioni je premalo specifična in ne omogoča zaznavanje majhne količine plina, ki ga celice izločijo. Fluorimetrična metoda uporablja ftalaldehid. To je nestabilna molekula, ki v okolju hitro razpada. V reakcijski mešanici lahko reagira z drugimi snovmi in ne omogoča zanesljive zaznave amoniaka v gojišču. Za določanje količine nastalega amoniaka smo uporabili komercialni test za določanje amoniaka. Selekcijo mikroorganizmov smo naredili na gojišču z AcN . Za nadaljnje teste pa smo čiste izolirane seve testirali tudi na benzN in propN . S temi substrati smo preverili prisotnost in delovanje alifatskih, aromatskih in akrilnih nitrilaz (Kobayashi, 1990).

Nitrilazno aktivnost smo odkrili pri 9 mikroorganizmih. Velika aktivnost je prisotna pri *Corynebacterium jeikeium*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, ki so bili izolirani iz ČN IUUV, Krka in Melamin. Nitrilazno encimsko aktivnost smo na novo odkrili pri *C. jeikeium* in *S. maltophila*. Največjo nitrilazno encimsko aktivnost imajo sevi izolirani iz ČN Krka. Na acetonitrilu kot viru dušika ima *P. aeruginosa* (specifična aktivnost $879,03 \text{ mg NH}_3 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteina), na benzonitrilu in propionitrilu pa *K. pneumoniae* (na benzonitrilu $75 \text{ mg NH}_3 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteina, na

propionitrilu pa $101,77 \text{ mg NH}_3 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ proteina}$). Veliko aktivnost smo izmerili tudi pri *C. jeikeium* in *S. maltophilia* iz ČN IUV (slike 32, 33 in 34).

Vpliv dejavnikov celice smo zmanjšali z merjenjem količine nastajanja in aktivnosti encima v mirujočih celicah. Količina amoniaka je s časom naraščala, specifična aktivnost pa v času 23 dosegla nitrilazno aktivnost $608,50 \text{ mg NH}_3 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ proteina}$ (slika 36).

V literaturi poročajo o prisotnosti nitrilaznega encima pri *P. putida*, *M. paraoxydans*, *M. liquefaciens*, *F. lateritium*, *P. stutzeri*, *R. rhodochrous*, itd. Specifična nitrilazna aktivnost *P. putida* znaša 0.43 to 2.17 U mg^{-1} (Banerjee, 2003).

Aktivni sevi so izhajali iz različnih vzorcev. Velika aktivnost pri sevih iz nekaterih ČN je posledica pestrosti odpadnih vod, prisotnosti industrije in predelovalnih obratov, ki tja odvajajo svoje odplake. Prisotnost kemijskih komponent omogoča obogatitev in selekcijo mikroorganizmov sposobnih preživetja in razgradnje prisotnih snovi. Sestava aktivnega blata je poznana le za ČN Melamin. Tu prevladujejo vrste *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* in *Trichosporon* spp., ki so bile oblikovane za razgradnjo fenolov, naftalenov, ligninosulfatov in betaina. Mi smo med aktivnimi sevi izoliranimi iz tega vzorca odkrili aktivnost pri primarni kulturi kot tudi drugih mikroorganizmih (*S. maltophilia* in *C. jeikerum*).

Iz okoljskih vzorcev nam je uspelo izolirati številne seve z o-demetilaznimi, monooksigenaznimi, esteraznimi in nitrilaznimi encimskimi aktivnostmi. Izolaciji in identifikaciji sevom je sledil pregled znanstvenih objav encimskih aktivnosti pri osamljenih mikroorganizmih. Informacije smo iskali v znanstveni literaturi zbrani v podatkovni bazi Web Of Science (preglednica 9). Encimsko aktivnost smo izolirali pri velikem številu sevov, za katere niso predhodno poročali o prisotnosti iskanih encimov, je največ za o-demetilazno in esterazno aktivnostjo. Pri monooksigenazah in nitrilazah pa je razmerje med poznanimi in novo odkritimi sevi enako. Pridobljeni podatki kažejo na veliko biokatalitično aktivnost in evolucijsko prilagodljivost mikroorganizmov prisotnih v preprostih okoljskih vzorcih. Encimske aktivnosti izoliranih mikroorganizmov bi lahko v nadaljnjih raziskavah natančneje preučili in optimizirali s preverjanjem najustreznejših pogojev za rast (temperatura, pH, sestava gojišča), optimizirane encime pa uporabili na industrijskih gojiščih. Tako bi ovrednotili in natančneje analizirali ter izkoristili velik potencial, ki nam ga ponujajo izolirani mikroorganizmi in njihovi encimi. To bi omogočilo lažjo, hitrejšo, natančnejšo ter okolju prijaznejšo sintezo zelenih komponent uporabnih v kemijski sintezi in predelovalnih industrijah.

5.2 SKLEPI

- Mikroorganizmi imajo v svojih strukturah prisotne encime, ki lahko pretvorijo hranila in sestavine okolja. Encimski presejalni testi na osnovi selekcije z dodatkom substrata omogočajo selekcioniranje in odkrivanje mikroorganizmov z iskanimi encimskimi funkcijami.
- Preizkusili smo nov medij za pripravo gojišč. Želirno sredstvo gelrite je čist, prozoren medij. Stabilen je pri visokih temperaturah, zdrži pogoje avtoklaviranja in ne vsebuje primesi. Strjevanje je hitrejše, za ustrezno trdnost pa je potreben dodatek kationov (0,1 % $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$).
- S presejalnimi metodami za o-demetilazne encime smo izolirali 29 sevov. Najbolj aktivni so *Comomonas testosteroni*, *Micrococcus lutes*, *Micrococcus sedentarius*, *Streptococcus sanguis* in *Pseudomonas stutzeri*. Specifična encimska aktivnost narašča s časom inkubacije in količino mikroorganizmov v gojišču.
- Monooksigenaze ob prisotnosti arginina pretvorijo indol v indigo. Najbolj aktivni sevi so *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes faecalis* in *Aerococcus urinae*.
- Esterazno aktivnost so izražali *Ochrobacter anthropi*, *Corynebacterium jeikerum* in *Stenotrophomonas maltophilia*. Specifična encimska aktivnost in gostota celic *C. jeikerum* (najbolj aktivnega seva) sovpadata.
- Izražanje nitrilaznih aktivnosti smo odkrili pri *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium jeikeium* in *Stenotrophomonas maltophilia*. Vpliv dejavnikov celice smo zmanjšali z merjenjem količine nastalega amoniaka in izračunom aktivnosti encima v mirujočih celicah. Izolirali smo mikroorganizme z alifatskimi, aromatskimi in akrilacetonitrilnimi nitrilazami.
- Uspelo nam je izolirati mikroorganizme z encimskimi aktivnostmi, o katerih v literaturi še niso poročali. *M. luteus*, *M. sedentarius*, *C. aquaticum*, *S. sanguis*, *E. aerogenes*, *S. spiritivorum*, *S. pneumoniae*, *S. maltophilia*, *P. stutzeri* in *A. denitrifikans* z o-demetilazno, *S. sanguis*, *O. anthropi*, *A. urinae* in *S. uberis* z esterazno, *S. uberis*, *A. faecalis*, *A. urinae* in *S. maltophilia* z monooksigenazno ter *C. jeikeium* in *S. maltophilia* z nitrilazno encimsko aktivnostjo. To omogoča odkritje novih tipov encimov in encimskih funkcij ter njihovo uporabo v okolju prijaznejši katalizi.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Mikroorganizmi so majhni in zelo prilagodljivi organizmi. Najdemo jih v različnih življenjskih okoljih. Potek njihovih metabolnih poti jim omogočajo encimi. Ti pretvorijo sestavine celice in okolja do sestavin uporabnih kot prehrabeni, energetski in gradbeni viri celice. Delovanje encimov je lahko inducirano ali inaktivirano s snovmi iz okolja.

Presejalni testi temeljijo na različnih fizikalnih ali kemijskih principih, ki omogočajo odkrivanje sevov z aktivnim encimom. Uporabili smo selekcijo s prehranskimi substrati. Izbrani substrat predstavlja vir hranil za mikroorganizem. Zmožnost izrabe substrata in njegova pretvorba v enostavnejše sestavine je pokazatelj prisotnosti encimov.

Okoljske vzorce smo gojili na minimalnih gojiščih z dodatkom substratov za selekcioniranje in obogatitev mikroorganizmov z želenimi aktivnostmi. Encim razgradi substrat in ga pretvori v preprostejšo sestavino, ki služijo kot hranila in sestavine gradbenih elementov za celico. Tako smo izolirali mikroorganizme z vsebnostjo o-demetilaznih, esteraznih, monooksigenaznih in nitrilaznih encimov. Uspelo nam je izolirati mikroorganizme z želenimi encimskimi aktivnostmi, tudi nekatere seve za katere predhodno ni znanstvenih objav o prisotnosti izoliranih encimskih aktivnosti.

O-demetilazno aktivnost smo odkrili pri *Comomonas testosteroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium aquaticum*, *Streptococcus sanguis*, *Enterobacter aerogenes*, *Sphingomonas spiritivorum* in *Stenotrophomonas maltophilia*. Esterazno aktivnost so imeli *Streptococcus sanguis*, *Corynebacterium jeikeium*, *Pediococcus sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobacter anthropi*, *Aerococcus urinae* in *Streptococcus uberi*. Mikroorganizmi z monooksigenazno aktivnostjo so *Pseudomonas putida*, *Streptococcus uberis*, *Alcaligenes faecalis*, *Aerococcus urinae* in *Stenotrophomonas maltophilia*. Prisotnost nitrilaz smo idetificirali pri *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium jeikeium* in *Stenotrophomonas maltophilia*.

Okoljski vzorci skrivajo velik neodkrit potencial novih mikroorganizmov z izbranimi encimskimi aktivnostmi in novimi metabolnimi potmi. Te encimske aktivnosti lahko pripomorejo k poenostavitvi proizvodnjih procesov, ekonomičnejši in okolju sprejemljivejši sintezi organskih snovi, uničenju nezaželenih snovi, pretvorbi substrata v bolj polarno, topno ali aktivno obliko za nadaljnje procese.

6.2 SUMMARY

Biocatalysts are important enzymes that lead to the development of many promising and efficient methods since their discovery. They are used in wide range of organic reactions but it is important to identify the most suitable enzyme candidates. Isolation of enzymes allows cultivation, enrichment and screening of pure strains of microorganisms.

Environment samples were used for simple screening test based identification. Use of small substrate concentrations in growth media allows a selective induction of o-demethylase, monooxygenase, esterase and nitrilase enzymes. Carefully selected substrates result in enrichment, colorimetric or fluorometric detection of products. Based on detected products we were able to identify microorganisms with the enzyme activities that we looked for.

We have discovered o-demethylase enzyme activity in *Comomonas testosteroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium aquaticum*, *Streptococcus sanguis*, *Enterobacter aerogenes*, *Sphingomonas spiritivorum* and *Stenotrophomonas maltophilia*. Esterase activity has been found in *Streptococcus sanguis*, *Corynebacterium jeikeium*, *Pediococcus sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobacter anthropi*, *Aerococcus urinae* and *Streptococcus uberis*. Monooxygenase activity has been identified in *Pseudomonas putida* *Streptococcus uberis*, *Alcaligenes faecalis*, *Aerococcus urinae* and *Stenotrophomonas maltophilia*. Additionally the presence of a nitrilase enzyme has been discovered in *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium jeikeium* and *Stenotrophomonas maltophilia*.

We managed to isolate microorganisms in which tested enzyme activities previously have not been published in science publications. Classic cultivation-based methods and simple environment samples allow discoveries of new microorganisms with enzyme activities, identification of new enzyme types and new metabolic pathways. The power of this method is creating the ideal biocatalysts for the majority of applications used in industry and various science fields.

7 VIRI

Banerjee A., Sharma R., Banerjee U.C. 2003. A rapid and sensitive fluorometric assay method for the detection of nitrilase activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37: 289-293.

Bernhardt F.H., Erdin A., Staudingearnd S., Ullrich V. 1988. Interactions of substrates with a purified 4-methoxybenzoate monooxygenase system (0-demethylating) from *Pseudomonas putida*. *Methods in Enzymology*, 161: 281-294.

Bitton G. 1994. *Wastewater microbiology*. 3rd ed. Hoboken, Wiley-Liss: 746 str.

Boczar B.A., Forney L.J., Begley W.M., Larson R.J., Federle T.W. 2001. Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Water Research*, 35,17: 4208-4216.

Bommarius A.S. 2004. *Biocatalysis: fundamentals and applications*. 1st ed. Weinheim, Wiley-VCH: 634 str.

Bornscheuer U.T., Altenbuchner J., Meyer H.H. 1999. Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7: 2169–2173.

Boyer R. 2005. *Temelji biokemije*. 1.izdaja. Ljubljana, Študentska založba: 126-140.

Brouk M., Fishman A. 2009. Protein engineering of toluene monooxygenases for synthesis of hydroxytyrosol. *Food Chemistry*, 116, 1: 114–121.

Cimerman A.1992. *Delo industrijskega mikrobiologa*. V: *Biotehnologija*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 7-15.

Doble M., Kumar K.A., Gajanan G.V. 2004. *Biotransformations and bioprocesses*. 1st ed. New York, Marcel Dekker: 406 str.

Faber K. 1999. *Biotransformation in organic chemistry*. 4th ed. Graz, Springer: 454 str.

Fermentas. 2007. Bradfordov reagent, ready-to-use #R1271. Burlington, Fermentas
<http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/bradford.htm> (4.8.2008): 3 str.

Gasparič A., Grabnar M. 1992. Metode izboljšanja delovnih mikroorganizmov. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 99-110.

Genome.net. 2007. GenomeNet Database Resources. Kyoto, Kanehisa Laboratories
<http://www.genome.ad.jp/kegg/> (4.8.2008): 5 str.

Gillam E.M.J., Aguinaldo A.M., Notley M.L., Kim D., Mundkowski G.R., Volkov A.A., Arnold H.F., Souček P., DeVoss J.J., Guengerich F.P. 1999. Formation of indigo by recombinant mammalian cytochrome p4501. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265: 469–472.

Herman L.P., Behrens M., Chakraborty S., Chrastil B.M., Barycki J., Weeks P.D. 2005. A three-component dicamba o-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, Strain DI-6. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 26: 24759–24767.

Hibi M., Sonoki T., Mori H. 2005. Functional coupling between vanillate-O-demethylase and formaldehyde detoxification pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 253: 237–242.

Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 4: 345-351

Kobayashi M., Yanaka N., Nagasawa T., Yamada H. 1990. Purification and characterization of a novel nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* K22 that acts on aliphatic nitriles. *Journal of Bacteriology*, 172, 9: 4807-4815.

Lehninger A., Nelson D. L., Cox M. M. 1993. Principles of biochemistry. 2nd ed. New York, Worth Publishers: 1011 str.

Li L., Liu X., Yang W., Xu F., Wang W., Feng L., Bartlam M., Wang L., Rao Z. 2008. Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme

FMN: Unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *Journal of Molecular Biology*, 376, 2: 453-465.

Liese A., Seelbach K., Wandrey C. 2006. *Industrial biotransformations*. 2nd ed. Weinheim, Wiley-VCH: 570 str.

Lieberman R.L., Rosenzweig A.C. 2005. The quest for the particulate methane monooxygenase active site. *Dalton Transactions*, 21: 3390-3396.

Lorenz P., Liebeton K., Niehaus F., Eck J. 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 6: 572-577.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. *Brock biology of microorganisms*. 8th ed. New Jersey, Prentice-Hall Inc: 986 str.

Martínková L., Vejvoda V., Křen V. 2008. Selection and screening for enzymes of nitrile metabolism. *Journal of Biotechnology*, 133, 3: 318-326.

Martínez-Martínez I., Montoro-García S., Lozada-Ramírez J. D., Sánchez-Ferrer A. García-Carmona F. 2007. A colorimetric assay for the determination of acetyl xylan esterase or cephalosporin C acetyl esterase activities using 7-amino cephalosporanic acid, cephalosporin C, or acetylated xylan as substrate. *Analytical Biochemistry*, 369, 2: 210-217.

Mueller P., Egorova K., Vorgias C.E., Boutou E., Trauthwein H., Verseck S., Antranikian G. 2006. Cloning, overexpression and characterization of a thermoactive nitrilase from the hyperthermophilic archaeon. *Protein Expression and Purification*, 47: 672-681.

O'Connor K.E., Dobson A.D. W., Hartmans S. 1997. Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 11: 4287-4291.

Plummer D.T. 1987. *An introduction to practical biochemistry*. 3th ed. Berkshire, McGraw Hill: 302-304.

Raspor P. 1992. Imobilizacija biokultur. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 147-158.

Reymond J.L. 2006. Enzyme assays: high-throughput screening, genetic selection and fingerprinting. 1st ed. Weinheim, Wiley-vch: 386 str.

Qing Z., Ao F., Yuanshan W., Xiaoqin Z., Zhao W., Minghuo W., Yuguo H. 2007. A novel sensitive high-throughput screening strategy for nitrilase producing strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 19: 6053-6057.

Sandoval G., Marty A. 2007. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 3: 390-393.

Sharma N.N, Sharma M., Kumar H., Bhalla T.C. 2006. *Nocardia globerula* NHB-2: Bench scale production of nicotinic acid. *Process Biochemistry*, 42, 9: 2078-2081

Shimoni E., Baasov T., Ravid U., Shoham Y. 2002. The trans-anethole degradation pathway in an *Arthobacter* sp. *Jurnal Of Biological Chemistry*. 227, 14: 11866-22872.

Shungu D., Valiant M., Tutlane V., Weinberg E., Weissberger B., Koupal L., Gadebusch H., Stapley E. 1983. GELRITE as an agar substitute in bacteriological media. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 4: 840–845.

Sigma-Aldrich. 2007. GELRITE[®] gellan gum for microbiological applications, St. Louis, Sigma-Aldrich

http://www.appliedbioscience.com/docs/Gelrite_Spec_Sheet.pdf (1.7.2008): 7 str.

Sigma-Aldrich. 2008. Product information: Ammonia Assay Kit. St. Louis, Sigma-Aldrich

<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/aa0100bul.pdf> (4.8.2008): 2 str.

Sonoki T., Obi T., Kubota S., Higashi M., Masai E., Katayama Y. 2000. Coexistence of two different o demethylation systems in lignin metabolism by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6: Cloning and sequencing of the lignin biphenyl-specific o-demethylase (LigX) gene. *Applied And Environmental Microbiology*, 66, 5: 2125–2132.

Tee L.K., Dmytrenko O., Otto K., Schmid A., Schwaneberg U. 2008. A p-nitrothiophenolate screening system for the directed evolution of a two-component epoxygenase (StyAB). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 50: 121–127.

Vatsyayan P., Kumar A.K., Goswamin P., Goswami P. 2008. Broad substrate cytochrome P450 monooxygenase activity in the cells of *Aspergillus terreus* MTCC 6314. *Bioresource Tehnology*, 99: 68-75.

Wahler D., Reymond J.L. 2001. Novel methods for biocatalyst screening. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 2: 152-158.

Xie Z., Feng J., Garcia E., Bernett M., Yazbeck D., Tao J. 2006. Cloning and optimization of a nitrilase for the synthesis of (3S)-3-cyano-5-methyl hexanoic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41, 3-4: 75-80.

Zhu U., Fan A., Wang Y., Zhu X., Wang Z., Wu M., Zheng Y. 2007. Novel sensitive high-throughput screening strategy for nitrilase-producing strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6053–6057.

ZAHVALE

Hvala,

mentorici prof. Romani Marinšek Logar
za strokovne nasvete in kritike pri pisanju diplomskega dela

mentorju dr. Alešu Gaspariču
za omogočenje izvedbe diplomske naloge

recenzentu prof. dr. Tomu Turku
za recenzijo in pregled diplomskega dela

Gordanu in Petri
za čas, vse odgovore, nasvete, spodbude, ideje in trike, ki so mi zmanjšali število neprespanih noči, ter razsvetlili biosintetske poti

zaposlenim v Krki d.d. na oddeleku za biokemijo
za vse nasvete in nasmeh, ki so mi jih dali

vsem, ki so prispevali vzorce za delo

vsem sošolcem in prijateljem
za mikrobiološki in socialni razvoj

mami in Brankotu
za potrpljenje, ljubezen in spodbudo