



Uporaba encimov

Laboratorijske vaje v študijskem letu 2013/2014

Miha Pavšič
miha.pavsic@fkkt.uni-lj.si

Pregled vaj

termin	vaja	tema
četrtek, 20. 2.	1.	imobilizacija tripsina (na sefarozo, v alginatu)
petek, 21. 2.	2.	merjenje aktivnosti imobiliziranega tripsina
četrtek, 27. 2.	3.	merjenje aktivnosti imobiliziranega tripsina
petek, 28. 2.	4.	encimi v pralnih praških
četrtek, 6. 3.	5.	izdelava sira
petek, 7. 3.	6.	določevanje glukoze v hrani

Poročila, ocenjevanje ...

- Prisotost na vajah je **obvezna**.
- Rezultate oddate v obliki **poročil** (po e-pošti).
- 4 poročila:
 - 1. poročilo: 1., 2. in 3. vaja (Imobilizacija tripsina in merjenje aktivnosti imobiliziranega tripsina)
 - 2. poročilo: 4. vaja (Encimi v pralnih praških)
 - 3. poročilo: 5. vaja (Izdelava sira)
 - 4. poročilo: 6. vaja (Določevanje glukoze v hrani)
- Poročilo lahko oddate za vse vaje skupaj ("v paketu") najkasneje do petka, **21. marca 2014** (2 tedna po koncu vaj).
- Oddaja poročil je pogoj za pristop k izpitu.
- Poročila lahko prispevajo h končni oceni pri predmetu.

Poročila, ocenjevanje ...

Poročilo:

1. Uvod

- v uvodu na kratko opišete ozadje problema
- na koncu uvoda navedite namen

2. Materiali in metode

- navedete material, ki ste ga uporabljali
- na kratko opišete postopek dela

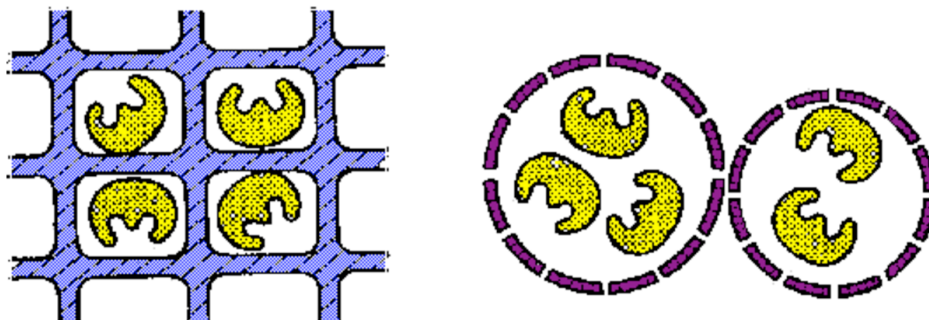
3. Rezultati

- rezultate predstavite v obliki diagramov ter jih na kratko opišete
- v diagramih ne pozabite na oznake osi

4. Diskusija

1.-3. vaja

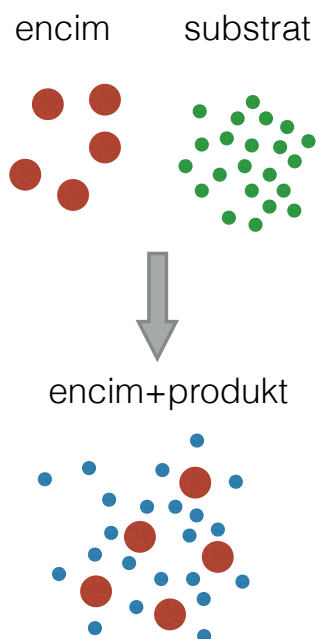
Imobilizirani encimi



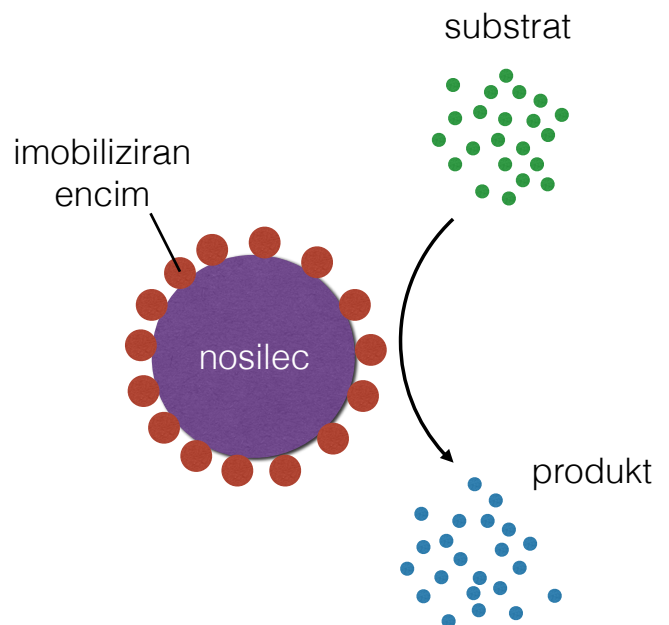
1. vaja: Imobilizacija tripsina na sefarozo in v alginatu

Encimi - biokatalizatorji v industriji

Predvsem zaradi cene je zaželjena njihova ponovna uporaba.



- potrebna je ločitev encima od produkta (lahko zahtevno)
- težko dobimo enako čist in aktiven encim, zato le-tega navadno ne uporabimo ponovno



- encim lahko enostavno odstranimo iz reakcijske zmesi in ponovno uporabimo
- imobilizacija (lahko) vpliva na stabilnost in aktivnost encima - izbira nosilca in načina imobilizacije!
- v končni fazi je takšna izvedba pogosto cenejša

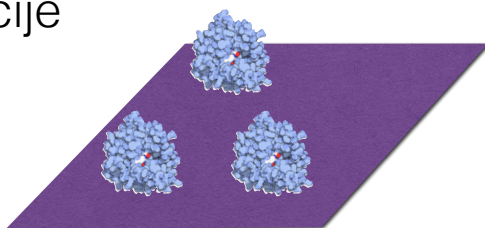
Primeri uporabe imobiliziranih encimov

encim	substrat	produkt
β -galaktozidaza	laktoza	mleko brez laktoze
lipaza	trigliceridi	nadomestki kakavovega masla
nitril hidrataza	akrilonitril	nikotinamid
aminoacilaza	D-, L-ak	L-aminokisljine
rafinaza	rafinoza	galaktoza in saharoza
invertaza	saharoza	glukozno-fruktozna mešanica
termolizin	peptidi	aspartam
glukoamilaza	škrob	D-glukoza
papain	proteini	odstranjevanje motnosti v pivovarstvu
tirozinaza	pirokatehol	L-DOPA

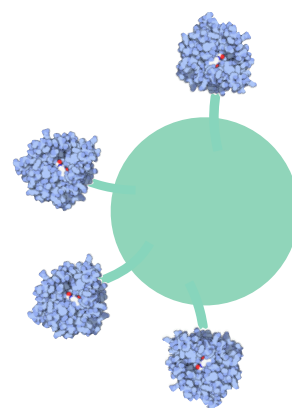
1. vaja: Imobilizacija tripsina na sefarozo in v alginatu

Načini imobilizacije

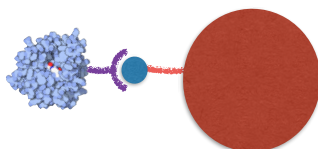
- adsorpcija



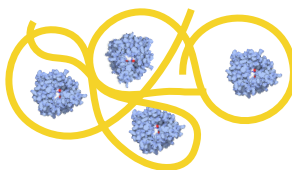
- kovalentna vezava (tudi križno povezovanje, *crosslinking*)



- afinitetna imobilizacija



- ujetje (*entrapment*)

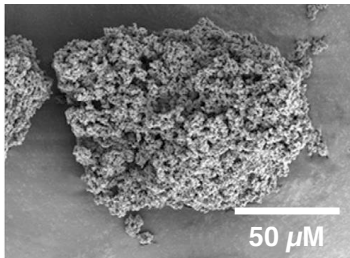
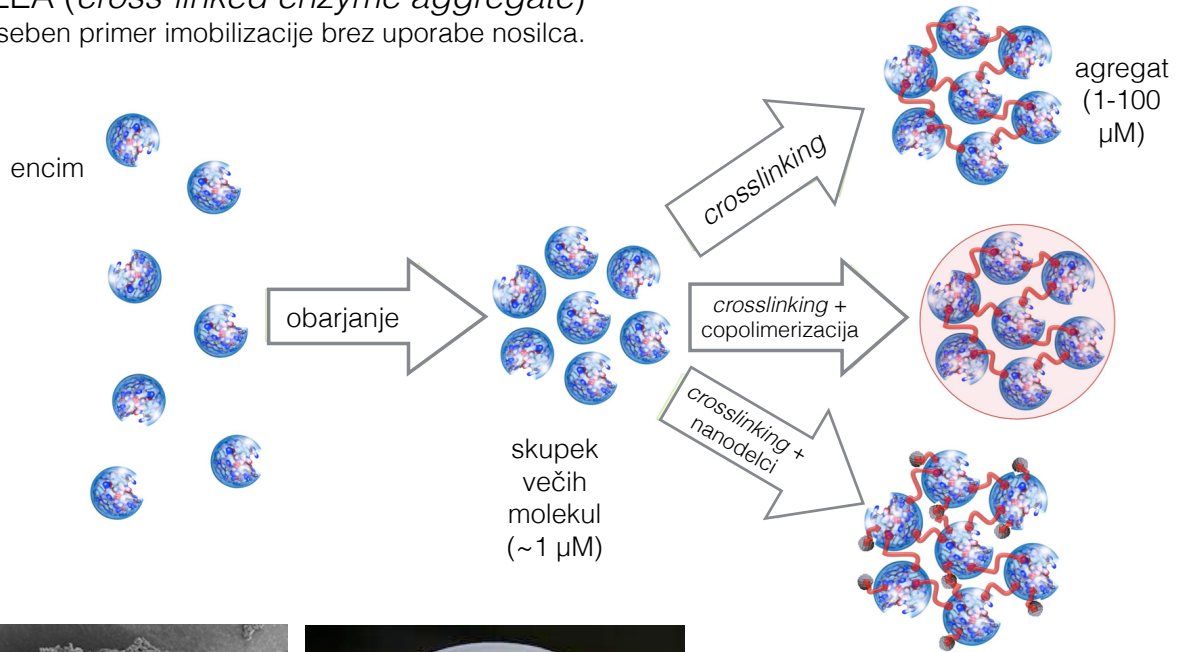


- imobilizacija na celici (*whole cell immobilization*)
- inkapsulacija

1. vaja: Imobilizacija tripsina na sefarozo in v alginatu

CLEA (*cross-linked enzyme aggregate*)

Poseben primer imobilizacije brez uporabe nosilca.



povečana slika delca



posušeni delci

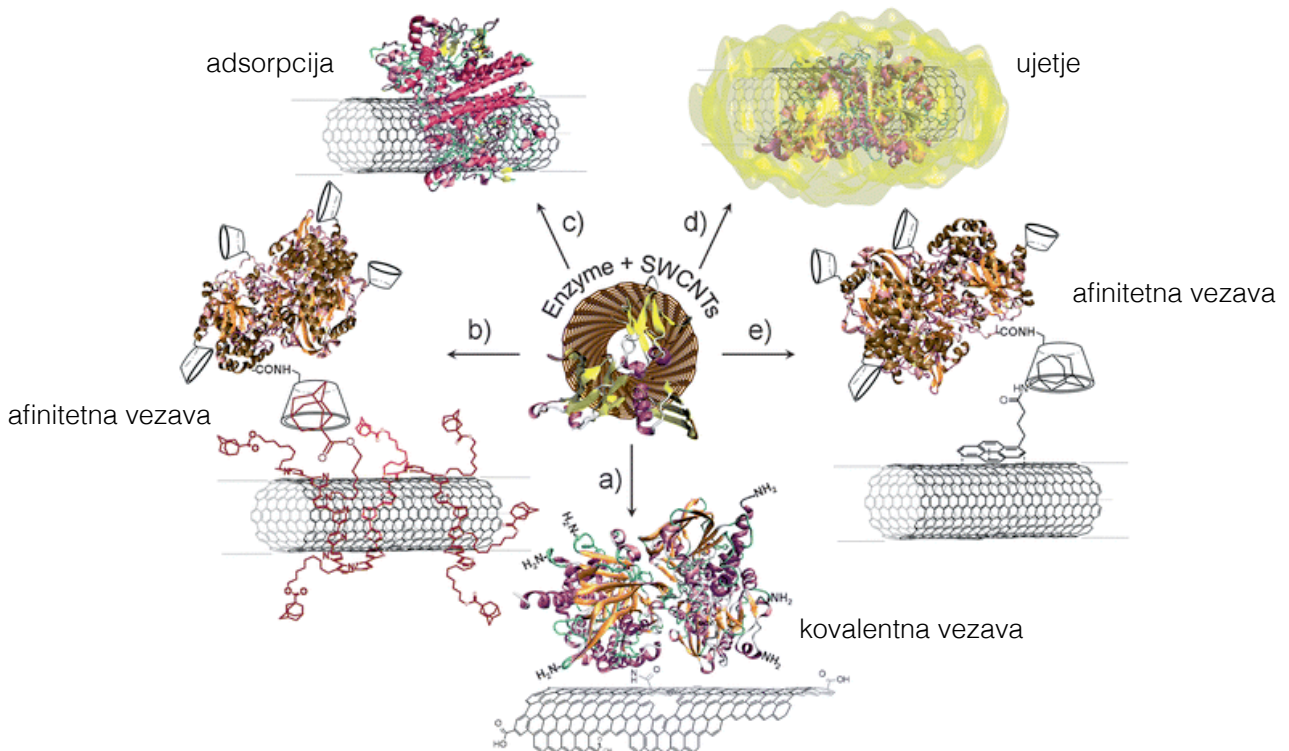
- ni nosilca
- visoka aktivnost na volumsko in utežno enoto
- ni potrebe po visoki čistosti encima
- kombinacije encimov za kaskadne reakcije

1. vaja: Imobilizacija tripsina na sefarozo in v alginatu

Poseben primer uporabe: encimski biosenzorji

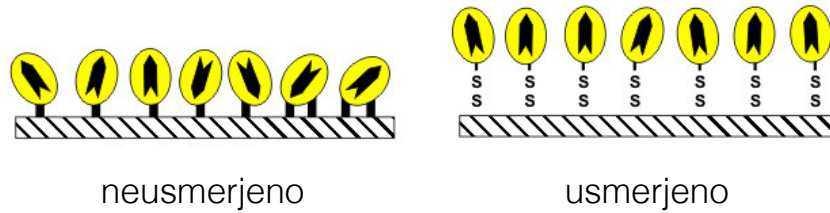
Encime imobiliziramo na površini elektrod.

Najnovejše elektrode so t.i. SWCNT (*single-walled carbon nanotubes*).

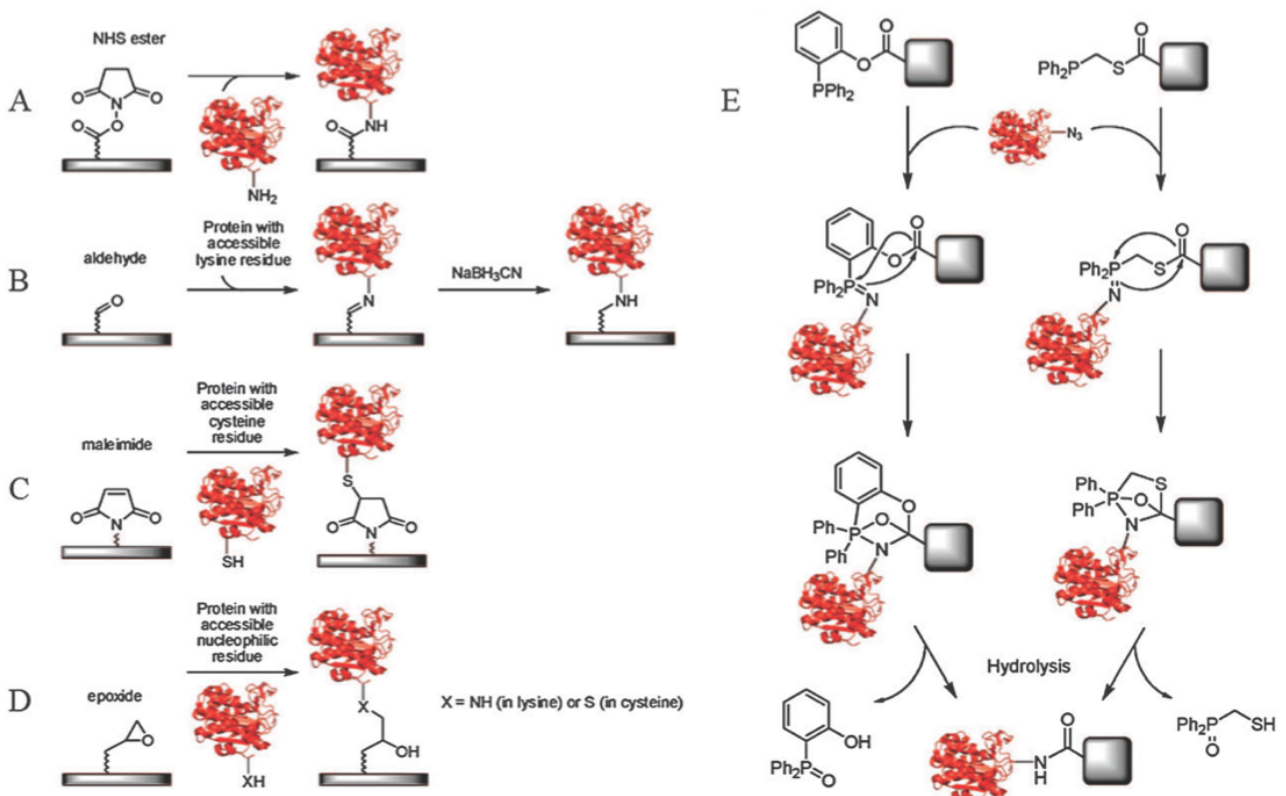


Kovalentna povezava

- preko stranskih skupin nekaterih ak (Lys, Arg, His, ...) → ponavadi ireverzibilno
- možno tudi preko Cys na površini → reverzibilno
- pomembna je usmerjenost (kje je aktivno mesto?)

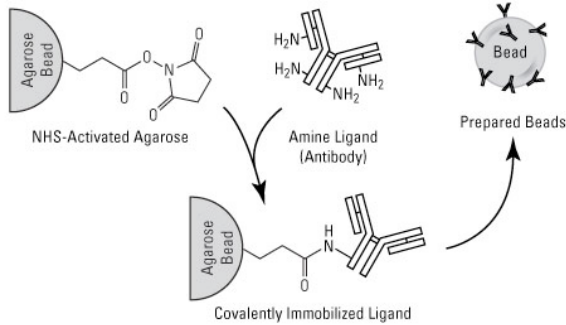


Kovalentna povezava - primeri

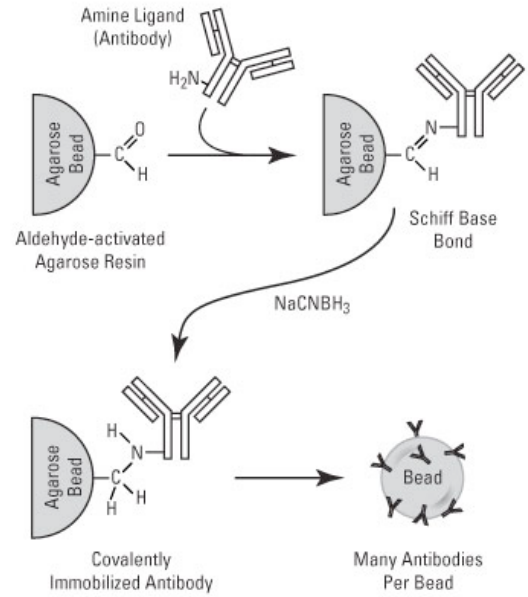


Kovalentna povezava - primeri preko NH₂ skupine

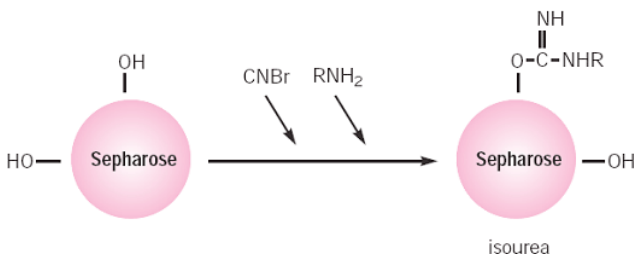
preko z NHS aktivirane agaroze ali sefaroze



preko aldehydnih skupin



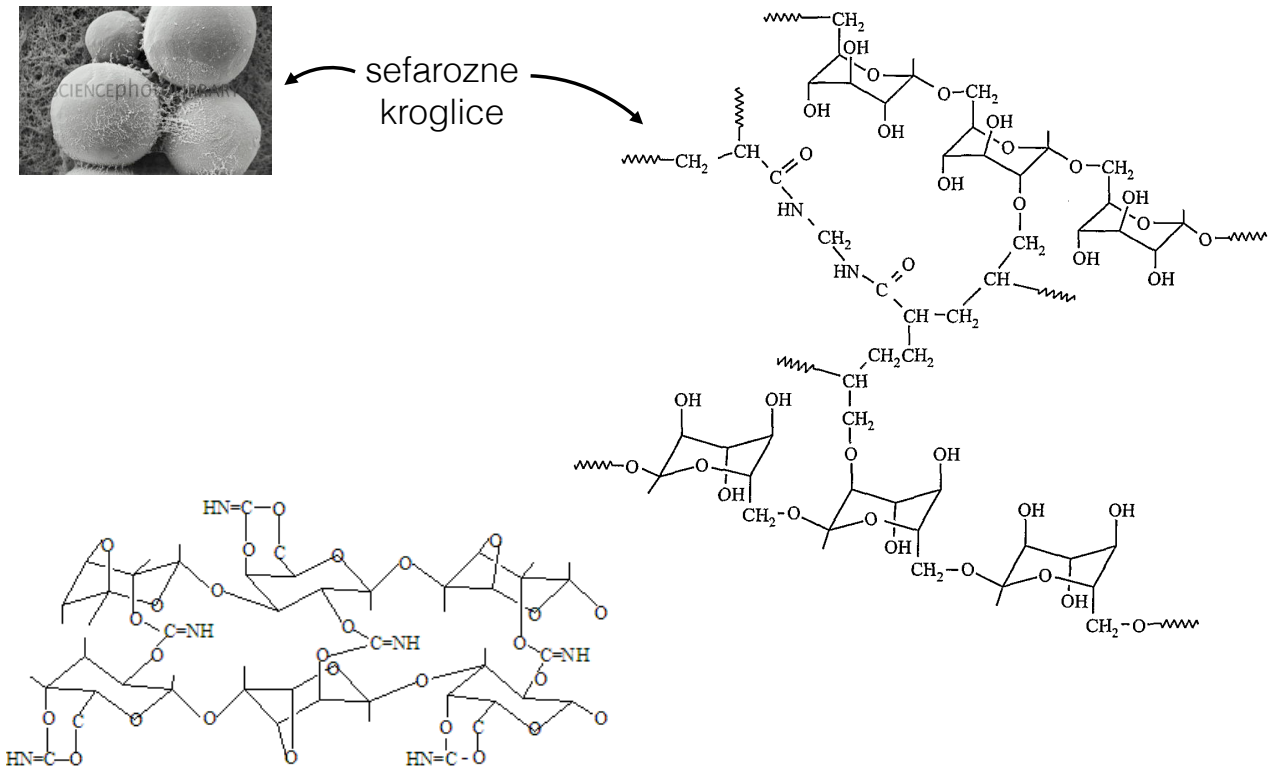
preko s CNBr aktivirane agaroze ali sefaroze



S CNBr aktivirana sefaroza



sefarozne kroglice

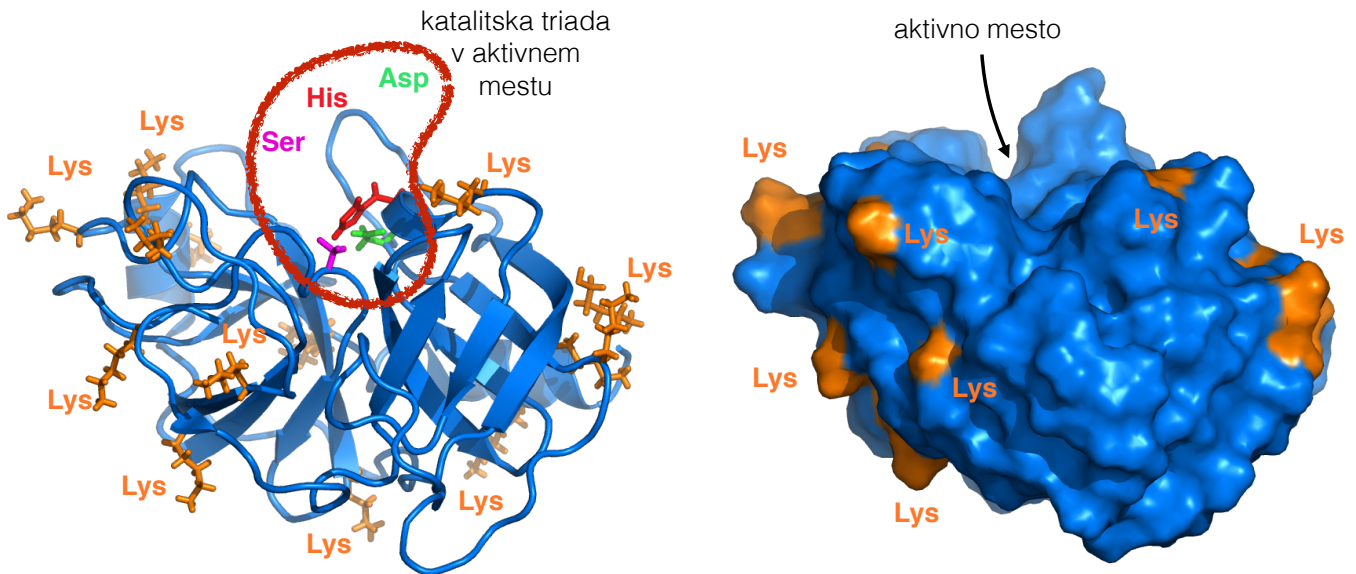


s CNBr aktivirana sefaroza

Imobilizacija tripsina na CNBr-sefarozo

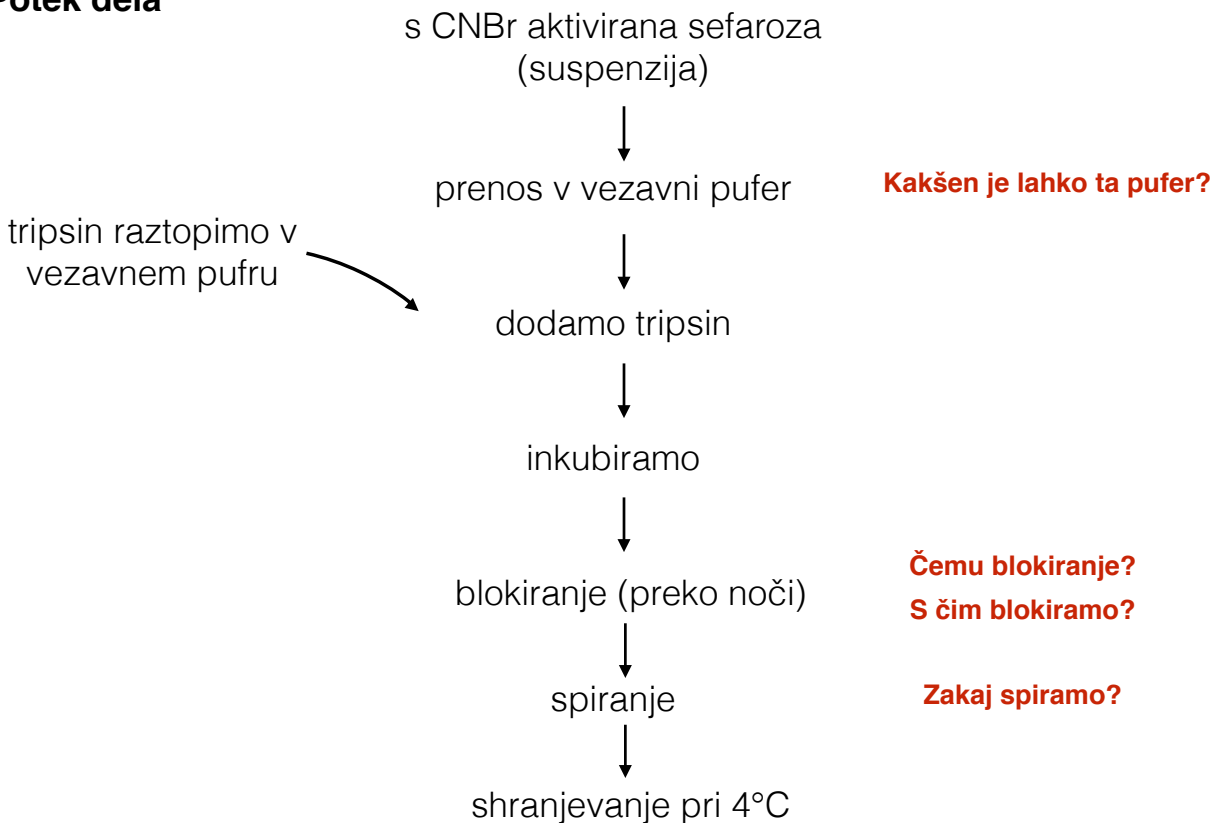
Imobilizacija tripsina na **s CNBr aktivirano sefarozo**

- kje so lizinski aminokislinski ostanki?



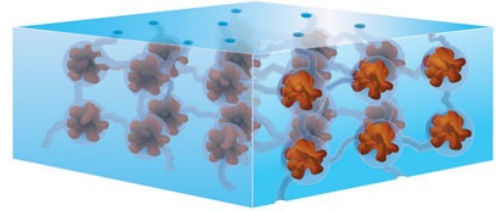
Imobilizacija tripsina na CNBr-sefarozo

Potek dela

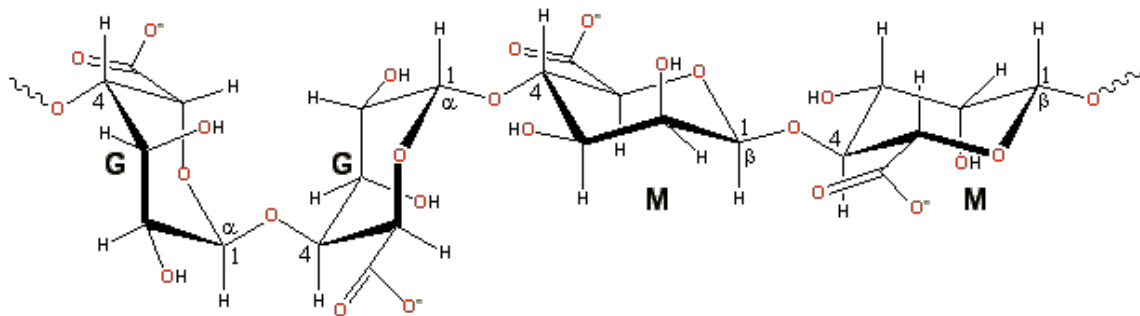


Ujetje encimov

- ujetje encimov preko kovalentnih ali nekovalentnih vezi znotraj gelov ali vlaken
- primeri nosilcev: alginat, gelatin, hitozan, silikatni materiali, ...

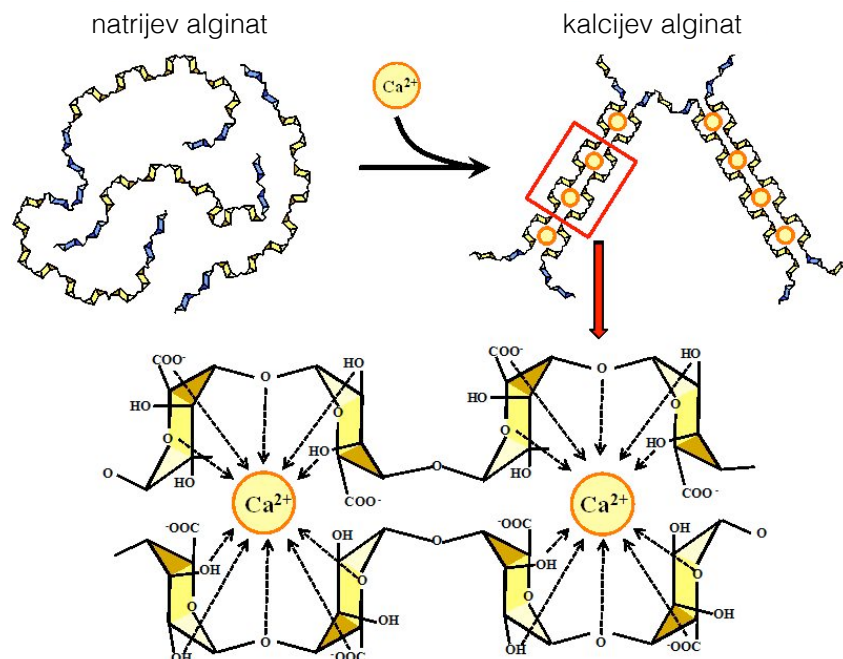


- pogosto se uporablja alginat (proizvajajo ga nekatere alge)
- alginat je kopolimer β -D-manuronske kisline in α -L-guluronske kisline (regije vzdolž polimera imajo različno sestavo)



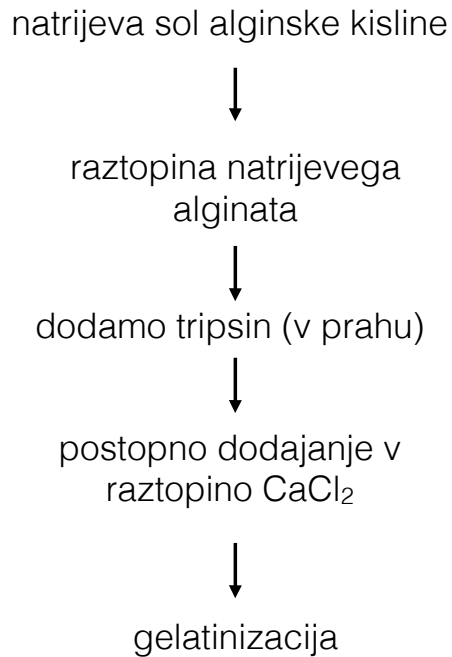
Alginati

- so topni v vodi in raztopinah monovalentnih kationov
- v prisotnosti dvovalentnih ionov (razen Mg^{2+}) tvorijo goste gele
- če so v raztopini med gelatinizacijo prisotni proteini, pride do ujetja le-teh v gel
- nežna narava gelov omogoča celo imobilizacijo celic!



Imobilizacija tripsina v alginatu

Potek dela

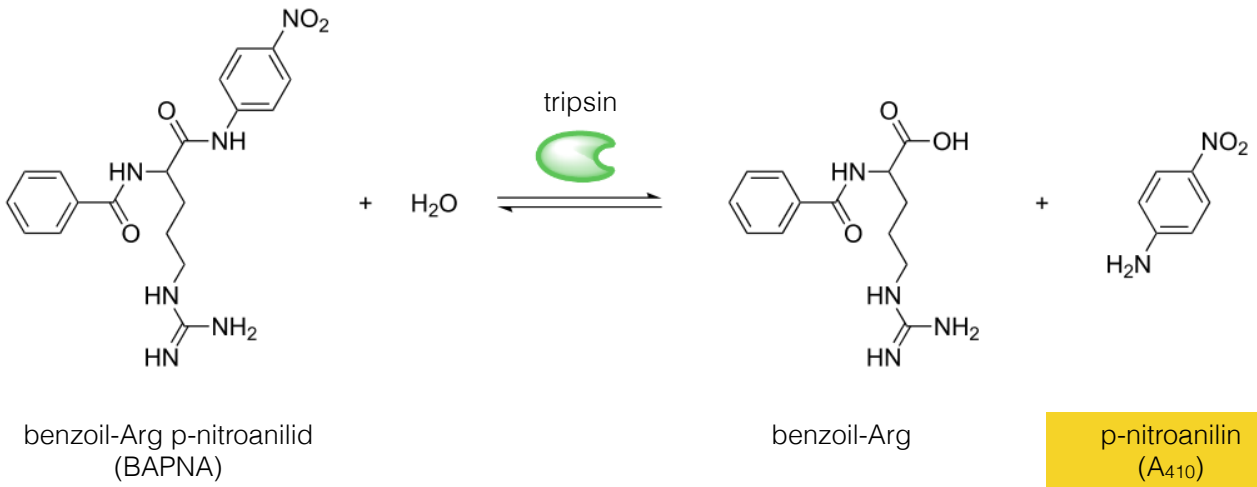


2. vaja: Lastnosti imobiliziranega tripsina

2. in 3. vaja: Lastnosti imobiliziranega tripsina

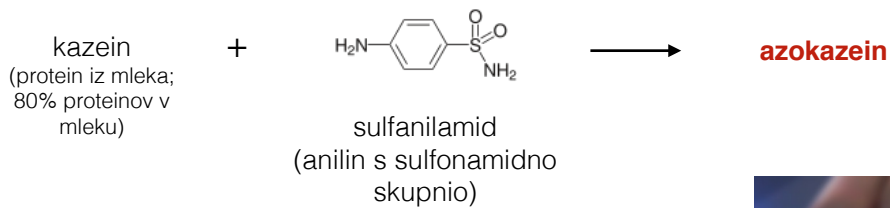
- merjenje aktivnosti s sintetičnim substratom BAPNA
 - nemodificiran tripsin
 - tripsin-sefaroza
 - tripsin-alginat
- termična stabilnost imobiliziranega tripsina
 - nemodificiran tripsin
 - tripsin-sefaroza
 - tripsin-alginat
- aktivnost tripsina na makromolekulskem substratu
 - nemodificiran tripsin
 - tripsin-sefaroza
 - tripsin-alginat

Encimski test - substrat BAPNA



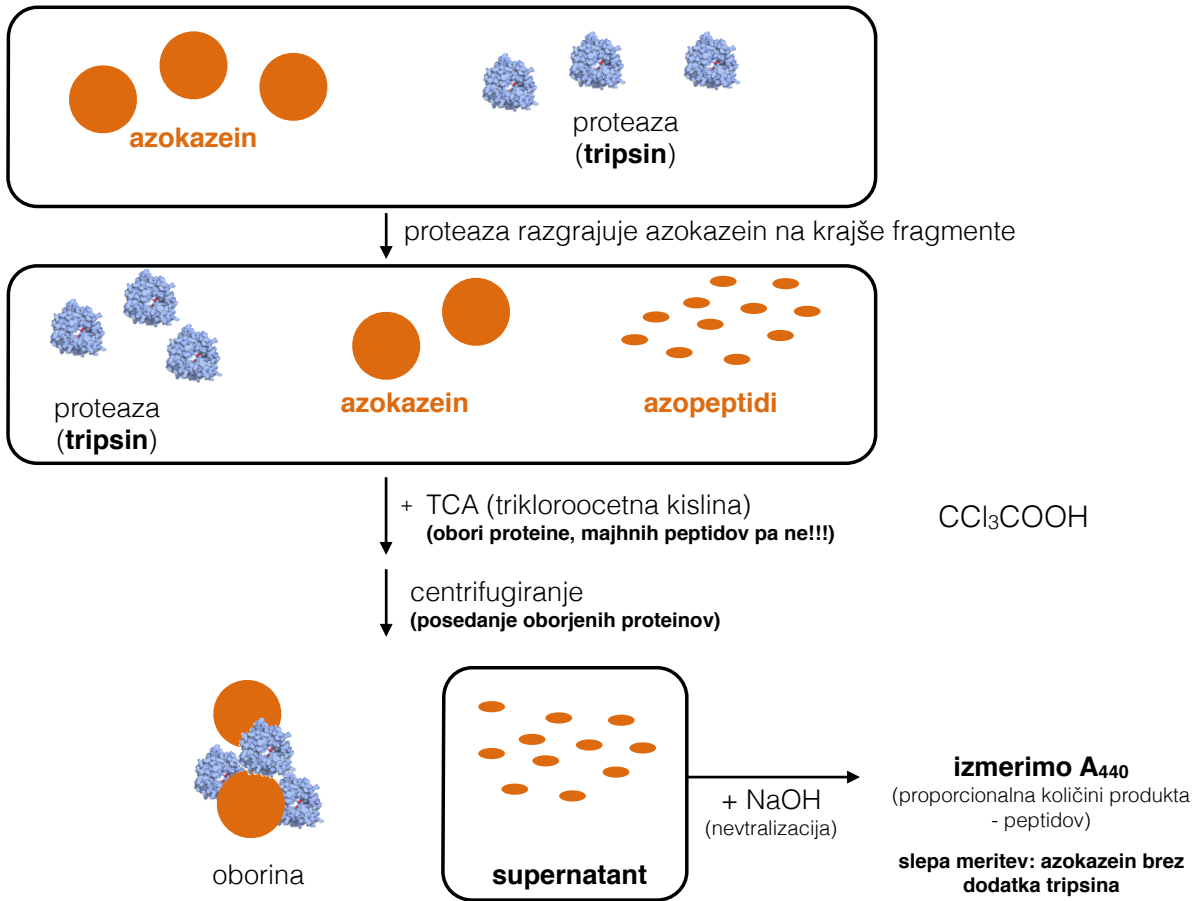
- diskontinuirni test (čas reakcije 10 min)
- reakcijo prekinemo z nakisanjem s HCl

Encimski test - substrat azokazein



raztopina azokazeina

Encimski test - substrat azokazein



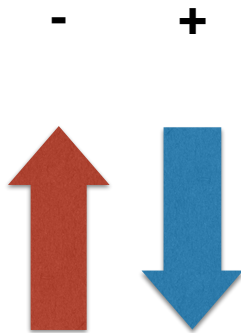
4. vaja

Encimi v pralnih praških



- Prvi patent za encime v pralnem prašku leta 1913! (encim iz živalskega pankreasa)
- Encimi v pralnih praških predstavljajo ~25% celotnega tržišča z encimi.

prisotnost
encimov v
prašku



temperatura pranja

- encimi omogočajo učinkovito odstranjevanje madežev že pri nizki temperaturi pranja
- nižja temperatura pranja pomeni tudi prihranek energije



obstojnost oblačil

- z uporabo praškov z encimi povečamo obstojnost oblačil, saj so ti praški omogočajo nežnejše čiščenje pri nižji temp. in manjši mehanski obdelavi



učinkovitost pranja

- samo z detergenti je nekatere madeže zelo težko odstraniti (npr. proteinske madeže)

Encimi v pralnih praških

PROTEAZE

- za odstranjevanje proteinskih madežev
- najpogosteje subtilizin (*Bacillus sp.*) - stabilen tudi pri 60°C v prisotnosti detergentov

PEKTINAZE

- odstranjevanje pektinskih madežev (npr. od sadja)

AMILAZE

- razgradnja škrobnih snovi in podobnih ogljikovih hidratov
- najpogosteje alfa-amilaza iz *Bacillus licheniformis*

CELULAZE

- odstranjevanje mikrovlaken s površine bombažnih oblačil → lepša barva, manj "muckanja"

LIPAZE

- razgrajevanje lipidov
- lipaze, primerne za uporabo v praških, opisane šele pred kratkim
- delno jih lahko nadomestimo z detergenti

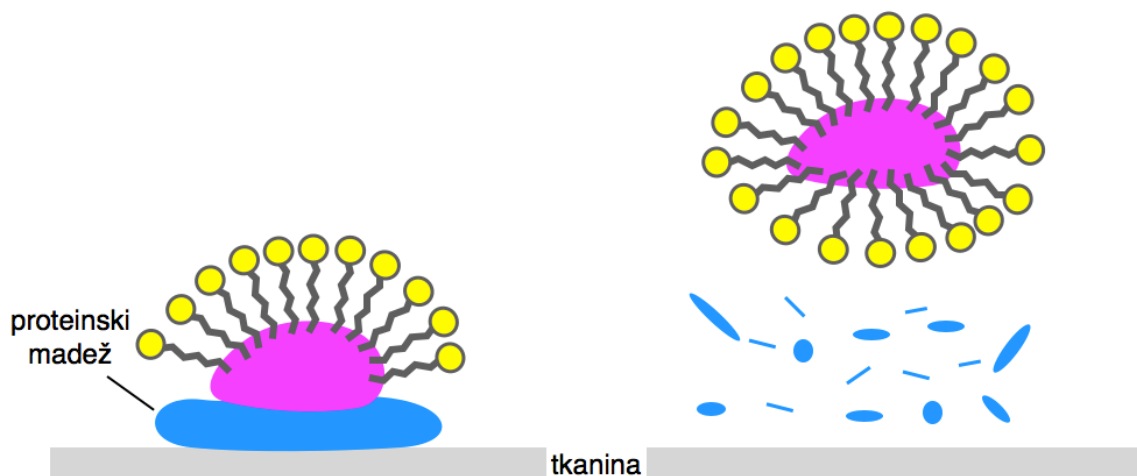
Sestava encimskega tekočega pralnega "praška" (primer)

komponenta	namen	%
Na-tripolifosfat*	mehča vodo, olajša odstranjevanje madežev	38
Na-alkansulfonat	detergent	25
Na-alkankarboksilati	detergent	3
Na-perborat tetrahidrat	oksidant	25
Na-sulfat	polnilo, mehča vodo	2,5
Na-karboksimetilceluloza	dispergiranje umazanije	1,6
Na-metasilikat	vezivo, olajša odstranjevanje madežev	1
subtilizin (3% aktiven)	odstranjevanje proteinskih madežev	0,8
fluorescentne spojine	videz bolj čistega perila	0,3
dišave		sledovi
voda		do 100%

* se vse manj uporablja (okoljski razlogi); nadomestimo ga lahko z natrijevim karbonatom + dodatno količino encima

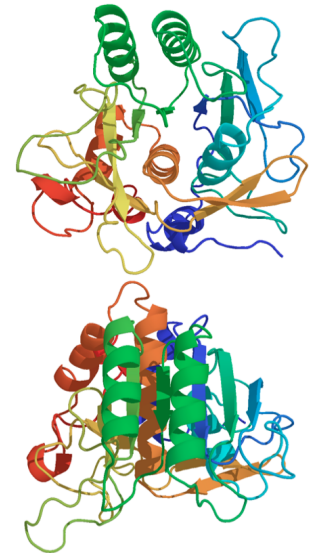
Proteinski madeži

- delujejo kot "lepilo"
- preprečujejo tudi odstranitev druge asociirane umazanije
- proteaze jih razgradijo na peptide



Proteaze v pralnih praških

- večinoma gre za **serinske proteaze** iz bakterij rodu *Bacillus*
- večino teh proteaz proizvajata dve podjetji:
 - Novo Industri A/S proizvaja:
 - alkalazo (iz *B. licheniformis*)
 - esperazo (iz alkalofilnega seva *B. licheniformis*)
 - savinazo (iz alkalofilnega seva *B. amyloliquefaciens*)
 - GistBrocades proizvaja:
 - maksatazo (iz *B. licheniformis*)
- vsi ti encimi so dejansko **subtilizin**
- alkalaza in maksataza pri temp. do 65 °C in pH 7-10,5
- savinaza in esperaza tudi pri pH 11-12



subtilizin

Zakaj ne druge proteaze? Druge ne bi bile aktivne:

- cisteinske proteaze - oksidacija Cys
- metaloproteaze - kompleksacija ionov s sredstvi za mehčanje vode

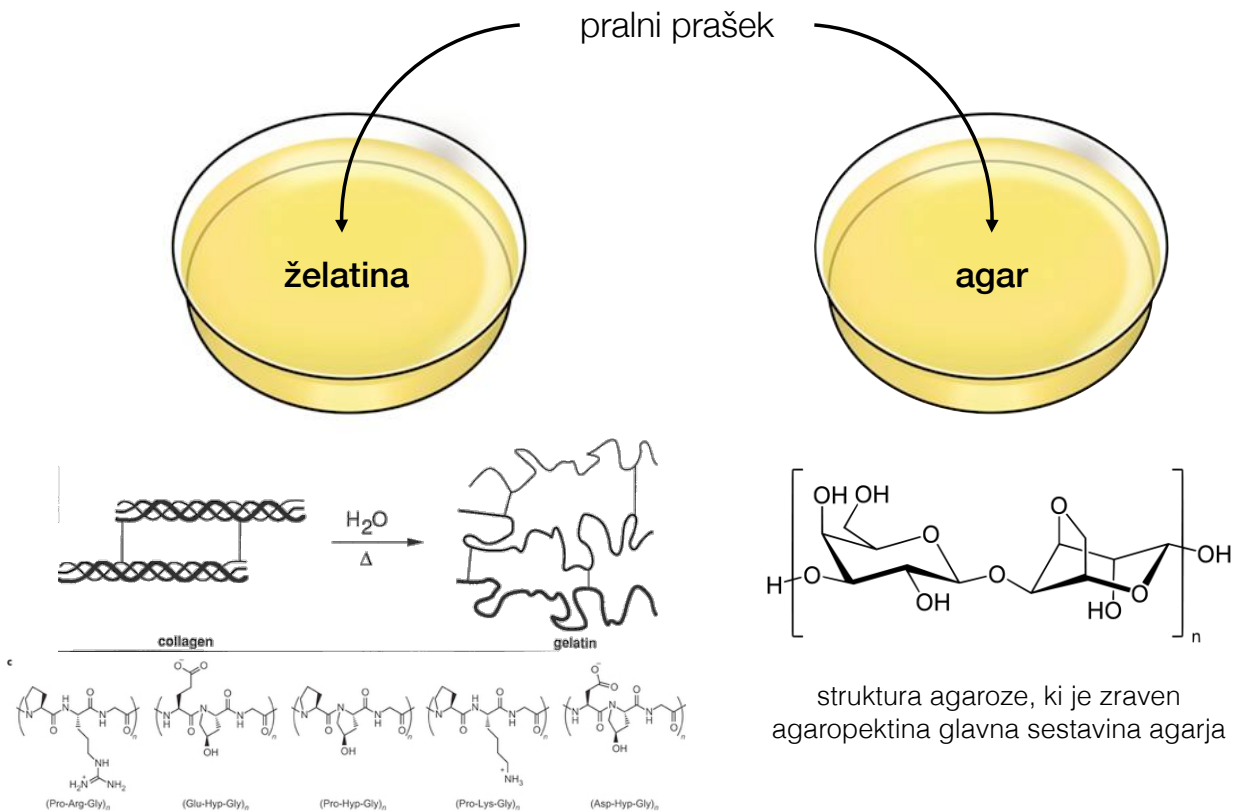
Kako “zapakirati” encim v pralnem prašku?

- v **granulah** (premer ~0,5-1 mm)
- encim v granulah je v jedru
 - jedro vsebuje še soli in sladkorje (prezervativi)
 - vezivno sredstvo je npr. karboksimetilceluloza
- jedro je prekrito z voščenim materialom (iz parafinskega olja ali PEG + hidrofilna veziva, ki se raztopijo v vodi)
- pomembno je, da:
 - **ohranimo aktivnost** encima
 - **zmanjšamo nastajanje prahu**, ki vsebuje encime
- granule so pogosto obarvane (trgovski “prijemi”)



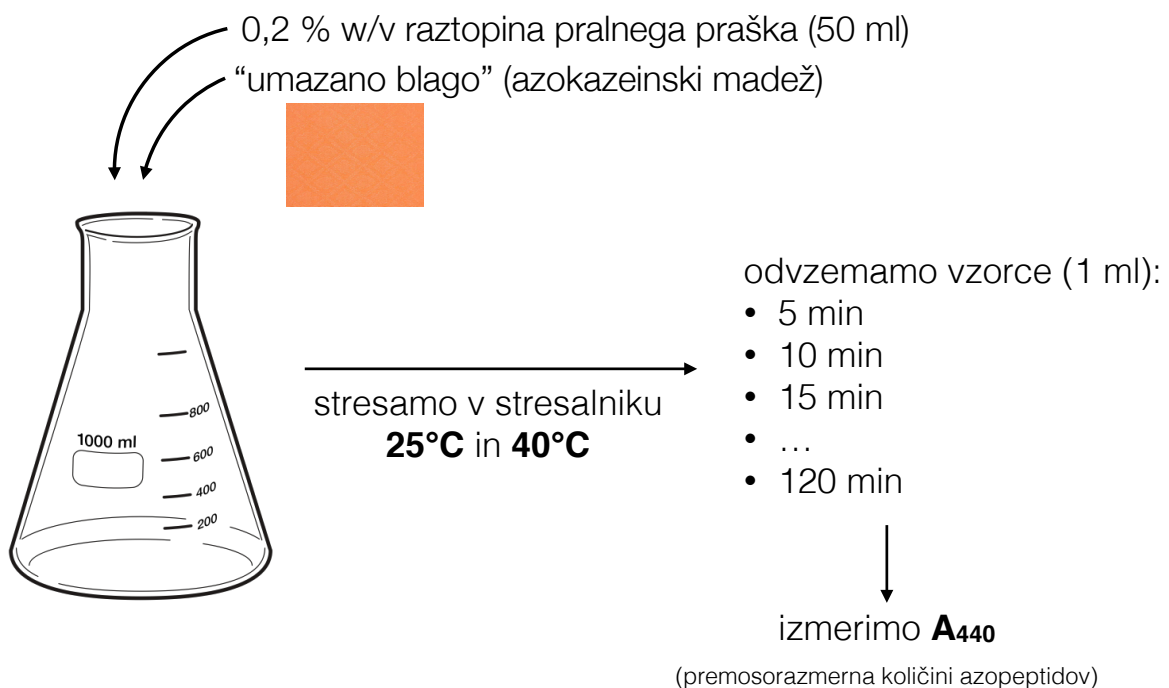
Izvedba vaje

Del A: Prisotnost proteaz v pralnih praških



Izvedba vaje

Del B: Učinkovitost odstranjevanja proteinskega madeža



Kontrole:

- namesto detergenta uporabimo vodo
- za "slepo" stresamo raztopino detergenta brez blaga

5. vaja

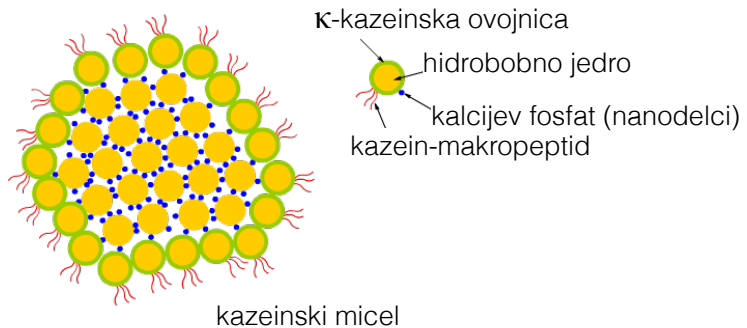
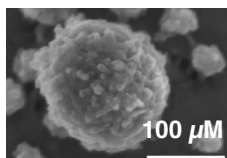
Izdelava sira



5. vaja: Izdelava sira

Mleko in sir

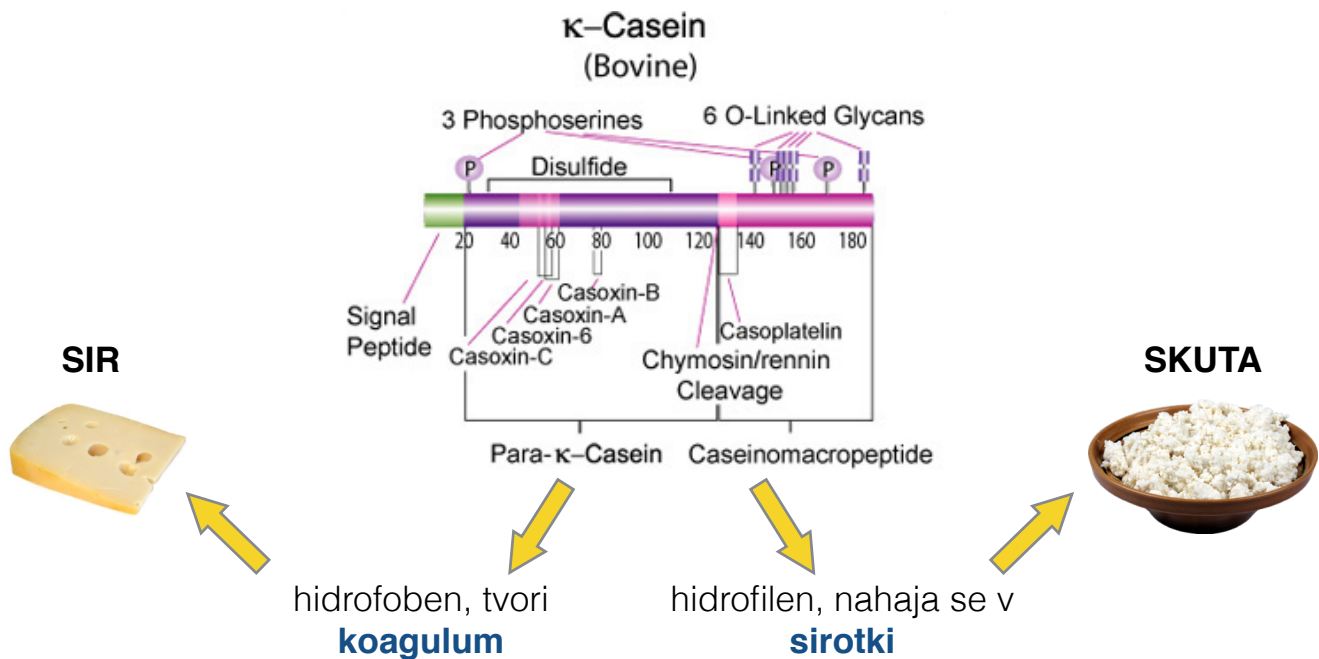
- osnovna surovina za sir je mleko - **emulzija/koloid** lipidov in proteinov v raztopini nizkomolekulskih snovi (minerali, soli, vitamini, ...)
- 30-50 g proteinov / liter mleka (80% v obliki **kazeinskih micel**)
- sir nastane s koagulacijo proteinov v mleku



- kazeini: α , β , γ in κ
- **κ -kazein** predstavlja 10% kazeina v mleku

κ -kazein

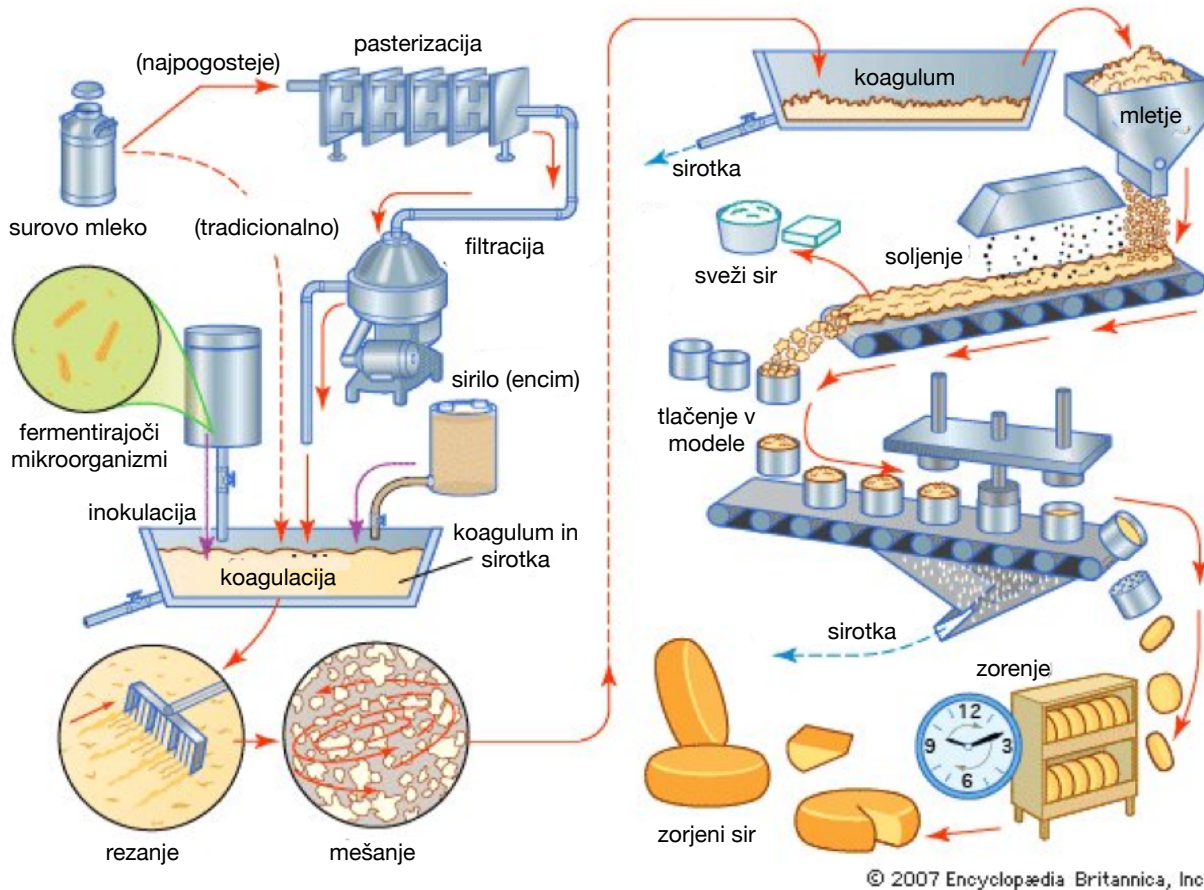
- edini kazein, ki je topen v vodi v prisotnosti Ca^{2+} -ionov
- v procesu nastajanja sira pride do **cepitve (renin/kimozin)** tega kazeina na p-kazein in kazeinski makropeptid



Koagulacija mlečnih proteinov (kazeina)

- sprožimo jo z dodatkom koagulanta:
 - sirišče (encimska koagulacija): cepitev kapa-kazeina
 - kislinska koagulacija: izguba naboja kazeinskih micel
 - koagulacija preko mlečne kisline, ki jo proizvajajo dodani mikroorganizmi
- najpogosteje se uporablja encimska koagulacija - encim renin (danes ponavadi rekombinanten iz mikroorganizmov)

Proizvodnja sira

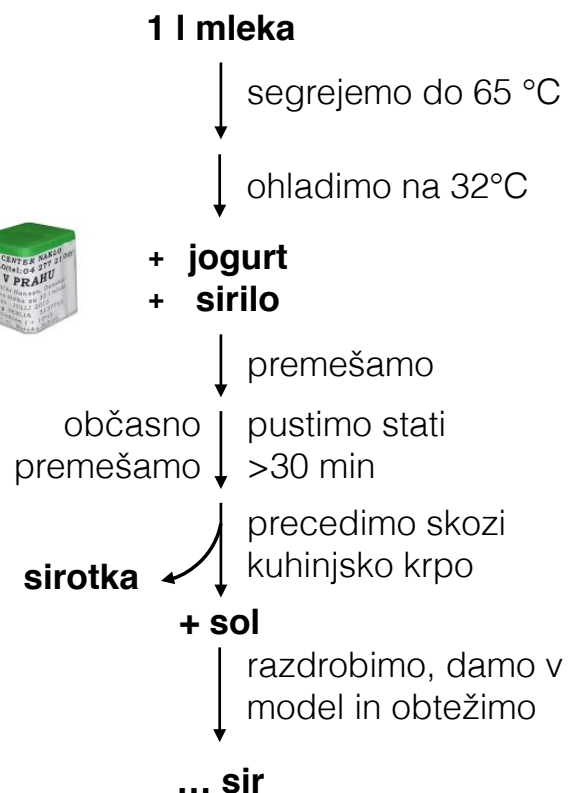


Izvedba vaje

kislinska koagulacija

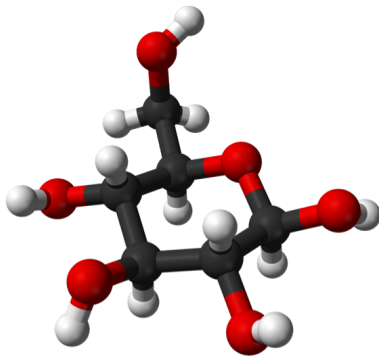


encimska koagulacija



6. vaja

Določevanje glukoze v hrani



6. vaja: Določevanje glukoze v hrani

Encimski testi

- visoka specifičnost, reproducibilnost in občutljivost
- omogočajo hitro detekcijo in kvantifikacijo neke snovi v vzorcu
- ponavadi ni potrebna predpriprava vzorca

- primeri encimskih testov za določevanje ogljikovih hidratov:

Brand	Cat. No.	Kit	Pack Size	Detection method & wavelength
Sigma	SCA20	Sucrose Assay Kit	Sufficient for ~20 assays	NADH; 340 nm
Sigma	GAGO20	Glucose (GO) Assay Kit	Sufficient for ~20 assays	H ₂ O ₂ ; 540 nm
Sigma	GAHK20	Glucose (HK) Assay Kit	Sufficient for ~20 assays	NADH; 340 nm
Sigma	FA20	Fructose Assay Kit	Sufficient for ~20 assays	NADH; 340 nm
Sigma	STA20	Starch (GO/P) Assay Kit	Sufficient for ~20 assays	H ₂ O ₂ ; 540 nm
Sigma	SA20	Starch (HK) Assay Kit	Sufficient for ~20 assays	NADH; 340 nm

Test za določevanje glukoze na osnovi heksokinaze (HK)

1. stopnja

D-glukoza + ATP $\xrightarrow{\text{heksokinaza}}$ D-glukoza-6-fosfat + ADP

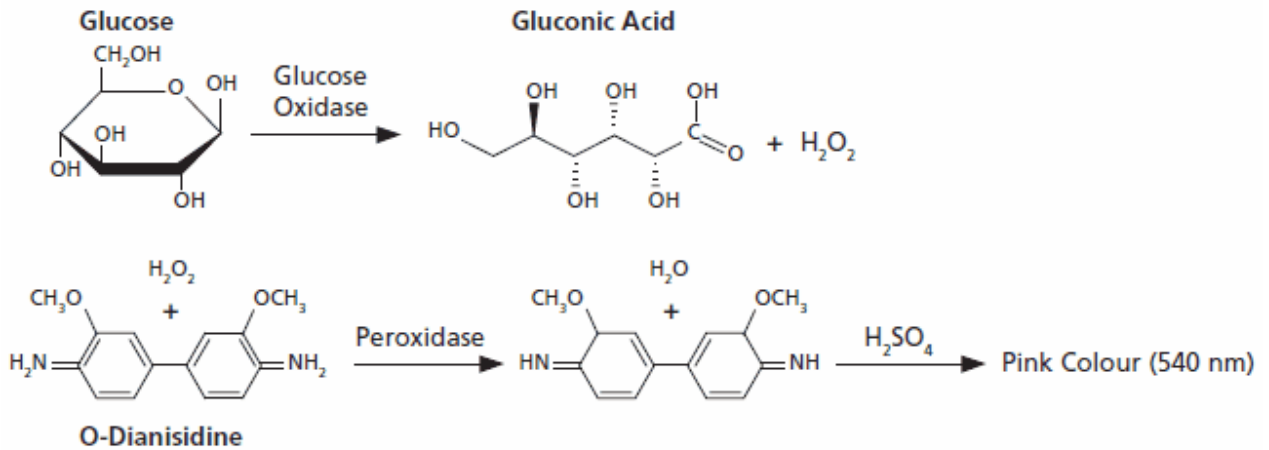
2. stopnja

D-glukoza-6-fosfat + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{glukoza-6-fosfat dehidrogenaza}}$ 6-fosfoglukonat + NADH

umeritvena premica ALI direktn izračun (Beer-Lambertov zakon)

spektrofotometrična detekcija (A₃₄₀)

Test za določevanje glukoze na osnovi glukoza oksidaze (GO)

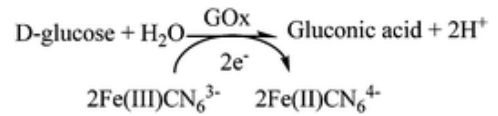


Določevanje saharoze

- dodatna encimska stopnja, v kateri saharozo hidroliziramo do glukoze in fruktoze z encimom invertaza

Glukometri

- testna ploščica (papirček) je prepojen z encimom (glukoza oksidaza ali glukoza dehidrogenaza)
- elektrokemijska detekcija (lahko preko vmesne redoks reakcije) → Pt-elektroda:
 - generiran naboj na elektrodi je premosorazmeren s količino glukoze ali
 - detekcija toka (amperometrična metoda)



Izvedba vaje

Material:

- reagent, ki vsebuje heksokinazo, glukoza-6-fosfat dehidrogenazo, ATP in NAD
- standardna raztopina glukoze (1,0 mg/ml v benzojski kislini)

vzorec $\left\{ \begin{array}{l} \text{tekočina (0,05-5 mg glukoze/ml)} \\ \text{trdna snov - raztopimo (0,05-5 mg glukoze/ml)} \end{array} \right.$

Tube	Glucose Assay Reagent (ml)	Sample Volume (μl)	Volume of Deionized Water (ml)
Sample Blank	---	Same as for Test	0,6
Reagent Blank	0,6	---	Same as Sample Volume for Test
Test	0,6	200	---

15 min na sobni temp.

A_{340} proti dH₂O

izračun

Bodite pozorni na območje linearnosti!
 $n(\text{glukoza}) \leq n(\text{ATP oz. NAD}^+)$

Izvedba vaje

$$A_{\text{Total Blank}} = A_{\text{Sample Blank}} + A_{\text{Reagent Blank}}$$

$$\text{mg glucose/ml} = \frac{(\Delta A) (TV) (\text{Glucose Molecular Weight}) (F)}{(\epsilon)(d)(SV)(\text{Conversion Factor for } \mu\text{g to mg})}$$

$$\text{mg glucose/ml} = \frac{(\Delta A) (TV) (180.2) (F)}{(6.22) (1) (SV) (1,000)}$$

$$\text{mg glucose/ml} = \frac{(\Delta A) (TV) (F) (0.029)}{(SV)}$$

$$\Delta A = A_{\text{Test}} - A_{\text{Total Blank}}$$

TV = Total Assay Volume (ml)

SV = Sample Volume (ml)

Glucose MW = 180.2 g/mole or equivalently
180.2 $\mu\text{g}/\mu\text{moles}$

F = Dilution Factor from Sample Preparation

ϵ = Millimolar Extinction Coefficient for NADH at 340 nm
Millimolar $^{-1} \text{cm}^{-1}$ or equivalently (ml/ μmoles)(1/cm)

d = Light path (cm) = 1 cm

1,000 = Conversion Factor for μg to mg