

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA SKUŠEK

**IZRAŽANJE IN IZOLACIJA REKOMBINANTNE ALFA-GLIKOSINTAZE IZ  
TERMOFILNE BAKTERIJE *THERMOTOGA MARITIMA* IN NJENA UPORABA  
V ENCIMSKI SINTEZI DISAHARIDOV**

**EXPRESSION AND ISOLATION OF RECOMBINANT  
ALPHA-GLYCOSYNTHASE FROM THERMOPHILIC BACTERIA  
*THERMOTOGA MARITIMA* AND ITS USE IN THE ENZYMATIC SYNTHESIS  
OF DISACCHARIDES**

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravila pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Marie Jose Hernaiz Gomez-Degano na Universidad de Complutense Madrid, Faculty of Pharmacy, Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry v Madridu.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tomažu Bratkoviču, mag. farm. za vso strokovno pomoč in usmerjanje tekom pisanja magistrske naloge.

Zahvaljujem se somentorici prof. dr. Marie Jose Hernaiz Gomez-Degano ter prof. Dr. Andrésu R. Alcántara Leónu, ki sta mi omogočila opravljanje praktičnega dela v laboratoriju na fakulteti za farmacijo v Madridu. Zahvala gre tudi Carlosu Bayonu Sanchezu za usmerjanje, potrpljenje in vso pomoč tekom izvedbe magistrskega dela.

Najlepša hvala staršema in sestri, ki so mi tekom študija stali ob strani, me podpirali in spodbujali. Zahvala gre tudi prijateljem in sošolcem, ki so poskrbeli za nepozabna študijska leta, katerih se bom z veseljem spominjala.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča in somentorstvom prof. dr. Marie Jose Hernaiz Gomez-Degano.

Špela Skušek

# VSEBINA

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 1.1 OLIGOSAHARIDI.....   | 1  |
| 1.1.2 Sinteza oligosaharidov.....  | 1  |
| 1.2 GLIKOZID HIDROLAZE (GLIKOZIDAZE).....  | 2  |
| 1.2.1 $\alpha$ -galaktozidaze.....   | 3  |
| 1.3 GLIKOSINTAZE.....  | 4  |
| 1.3.1 Načrtovanje glikosintaz.....   | 4  |
| 1.4 PRIDOBIVANJE REKOMBINANTNE $\alpha$ -D-GALAKTOSINTAZE,<br>PRIDOBLENE IZ BAKTERIJE <i>THERMOTOGA MARITIMA</i> ..... | 6  |
| 1.4.1 Dodatek polihistidinskega podaljška na skrajni C-konec proteina.....   | 6  |
| 1.4.2 Izražanje rekombinantnih proteinov v ekspresijskem sistemu<br><i>E. coli</i> BL21 (DE3).....                     | 6  |
| 1.4.3 Izolacija in čiščenje.....   | 7  |
| 1.4.4 Kvantifikacija proteinov z UV/VIS spektrofotometrijo in z metodo po<br>Bradfordu.....                            | 8  |
| 1.5 »ZELENA TOPILA«.....   | 9  |
| 1.5.1 Topila, pridobljena iz obnovljivih virov.....  | 9  |
| 1.5.2 Ionske tekočine.....   | 10 |
| 2. NAMEN DELA.....   | 12 |
| 3. EKSPERIMENTALNO DELO.....   | 13 |
| 3.1 MATERIALI.....   | 13 |
| 3.1.1 Substrati.....   | 13 |
| 3.1.2 Topila.....  | 14 |
| 3.1.3 Priprava bakterijskega gojišča.....  | 17 |
| 3.1.4 Dodatek heksahistidinskih podaljškov na skrajni C-konec encimov<br>TmGalA in TmGalA D327G.....                   | 17 |
| 3.1.5 Izražanje, izolacija, očiščenje in detekcija rekombinantnih encimov.....   | 18 |
| 3.2 NAPRAVE.....   | 19 |

|  |    |
|--|----|
| 3.3 POSTOPKI IN METODE .....   | 19 |
| 3.3.1 Dodatek heksahistidinskih podaljškov na TmGalA in TmGalA D327G z<br>usmerjeno mutagenezo .....   | 19 |
| 3.3.2 Transformacija celic <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ s plazmidoma pET24b/TmGalA-HisTag<br>in pET24b/TmGalA D327G-HisTag .....  | 20 |
| 3.3.3 Izražanje rekombinantnih proteinov v <i>E. coli</i> .....  | 20 |
| 3.3.4 Izolacija rekombinantnih encimov s kovinsko-kelatno afinitetno<br>kromatografijo (IMAC) .....  | 21 |
| 3.3.5 Preverjanje čistosti eluata s poliakrilamidno gelsko elektroforezo,<br>v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE) .....   | 22 |
| 3.3.6 Kvantitativno določanje koncentracije proteinov s pomočjo metode po<br>Bradfordu .....   | 23 |
| 3.3.7 Določanje hidrolitične aktivnosti $\alpha$ -galaktozidaze<br>(TmGalA in TmGalA-HisTag) iz <i>Thermotoga maritima</i> .....   | 24 |
| 3.3.8 Določanje substratne specifičnosti rekombinantne $\alpha$ -galaktozidaze<br>(TmGalA-HisTag) iz <i>Thermotoga maritima</i> .....  | 25 |
| 3.3.9 Reakcije transglikozilacije rekombinantne $\alpha$ -galaktozidaze (TmGalA-HisTag)<br>iz <i>Thermotoga maritima</i> .....   | 25 |
| 3.3.10 Reakcije transglikozilacije rekombinantne $\alpha$ -galaktosintaze (TmGalA<br>D327G-HisTag) iz <i>Thermotoga maritima</i> .....   | 25 |
| 3.3.11 Določanje strukture produktov gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF in<br>gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF .....   | 26 |
| 3.3.12 Reakcije transglikozilacije rekombinantne $\alpha$ -galaktosintaze<br>(TmGalA D327G-HisTag) iz <i>Thermotoga maritima</i> ob prisotnosti sotopil,<br>pridobljenih iz obnovljivih virov, ter ionskih tekočin ..... | 27 |
| 3.3.13 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z uporabo ELSD-detektorja<br>(HPLC-ELSD) .....   | 28 |
| 4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....   | 29 |
| 4.1 DODATEK HEKSAHISTIDINSKIH PODALJŠKOV NA SKRAJNI<br>C-KONEC ENCIMOV TmGalA IN TmGalA D327G .....  | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2 IZRAŽANJE IN IZOLACIJA REKOMBINANTIH ENCIMOV.....   | 30 |
| 4.3 KVANTITATIVNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV   |    |
| Z METODO PO BRADFORDU .....   | 31 |
| 4.4 DOLOČANJE HIDROLITIČNE AKTIVNOSTI REKOMBINANTNE   |    |
| $\alpha$ -GLIKOZIDAZE, TmGalA-HisTag.....   | 32 |
| 4.3.1 Določanje hidrolitične aktivnosti TmGalA in TmGalA-HisTag z uporabo   |    |
| substrata pNF- $\alpha$ -gal .....  | 32 |
| 4.5 DOLOČANJE SUBSTRATNE SPECIFIČNOSTI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE  |    |
| (TmGalA-HisTag) IZ <i>THERMOTOGA MARITIMA</i> .....   | 32 |
| 4.6 DOLOČANJE TRANSGLIKOZILACIJSKE AKTIVNOSTI   |    |
| REKOMBINANTNE $\alpha$ -GLIKOZIDAZE, TmGalA-HisTag, Z UPORABO   |    |
| DONORJA pNF- $\alpha$ -gal IN RAZLIČNIH AKCEPTORJEV .....   | 33 |
| 4.7 DOLOČANJE TRANSGLIKOZILACIJSKE AKTIVNOSTI MUTIRANE  |    |
| $\alpha$ -GLIKOSINTAZE, TmGalA D327G-HisTag, Z UPORABO  |    |
| DONORJA $\beta$ -gal-N <sub>3</sub> IN RAZLIČNIH AKCEPTORJEV .....  | 34 |
| 4.8 DOLOČANJE STRUKTURE PRODUKTOV gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF IN                                       |    |
| gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF.....   | 35 |
| 4.8.1 TLC-analiza produktov gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF in gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF..... | 35 |
| 4.8.2 Potrditev strukture produktov z NMR-spektroskopijo .....  | 36 |
| 4.9 TRANSGLIKOZILACIJSKA AKTIVNOST ENCIMA TmGalA D327G-HisTag   |    |
| OB PRISOTNOSTI TOPIL, PRIDOBLJENIH IZ OBNOVLJIVIH VIROV .....   | 37 |
| 4.9.1 Transglikozilacijske reakcije $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag                                    |    |
| z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -glc ob prisotnosti topil iz obnovljivih virov .....                           | 38 |
| 4.9.2 Transglikozilacijske reakcije $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag                                    |    |
| z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -man ob prisotnosti topil iz obnovljivih virov .....                           | 39 |
| 4.10 TRANSGLIKOZILACIJSKA AKTIVNOST ENCIMA  |    |
| TmGalA D327G-HisTag OB PRISOTNOSTI IONSKIH TEKOČIN .....  | 41 |
| 4.10.1 Transglikozilacijske reakcije $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag z                                 |    |
| uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -glc ob prisotnosti ionskih tekočin .....  | 41 |
| 4.10.2 Transglikozilacijske reakcije $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag                                   |    |
| z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -man ob prisotnosti ionskih tekočin .....                                      | 43 |

|                    |    |
|--------------------|----|
| 5. SKLEPI.....     | 45 |
| 6. LITERATURA..... | 47 |

## SEZNAM PREGLEDNIC

|  |    |
|--|----|
| <b>Preglednica I:</b> Substrati, uporabljeni pri hidrolitičnih in transglikozilacijskih reakcijah. .   | 13 |
| <b>Preglednica II:</b> Sotopila, pridobljena iz obnovljivih virov (derivati glicerola in N,N-dimetilamida), uporabljena pri transglikozilacijskih reakcijah z $\alpha$ -galaktosintazo TmGalA D327G-HisTag iz <i>Thermotoga maritima</i> (24, 26). .....                         | 14 |
| <b>Preglednica III:</b> Ionske tekočine, uporabljene kot sotopila pri transglikozilacijskih reakcijah z $\alpha$ -galaktosintazo TmGalA D327G-HisTag iz <i>Thermotoga maritima</i> . .....   | 16 |
| <b>Preglednica IV:</b> Reakcijska zmes za PCR; povzeto po (). .....  | 18 |
| <b>Preglednica V:</b> Pogoji, uporabljeni pri metodi PCR; povzeto po (39). .....   | 20 |
| <b>Preglednica VI:</b> Sestava pufrov, uporabljenih pri IMAC-kromatografiji (ekvilibracijski pufer, pufer za spiranje in elucijski pufer).....   | 21 |
| <b>Preglednica VII:</b> Reagenti, uporabljeni za pripravo zmesi za vlivanje ločevalnega in zbiralnega gela za SDS-PAGE .....   | 22 |
| <b>Preglednica VIII:</b> Priprava vzorcev standarda za kvantitativno določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi. ....   | 23 |
| <b>Preglednica IX:</b> Priprava vzorcev rekombinantnih proteinov za kvantitativno določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi.....   | 24 |
| <b>Preglednica X:</b> Sestava reakcijske zmesi in količina posameznih komponent pri transglikozilacijskih reakcijah encima TmGalA D327G-HisTag. ....   | 26 |
| <b>Preglednica XI:</b> Sestava reakcijske zmesi in posameznih komponent pri transglikozilacijskih reakcijah encima TmGalA D327G-HisTag z uporabo sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov. ....  | 27 |
| <b>Preglednica XII:</b> Sestava reakcijske zmesi in posameznih komponent pri transglikozilacijskih reakcijah encima TmGalA D327G-HisTag z uporabo ionskih tekočin kot sotopil. ....  | 28 |
| <b>Preglednica XIII:</b> Poravnava nukleotidnih zaporedij 3'-koncev genov prvotnih $\alpha$ -galaktozidaze in $\alpha$ -glikosintaze, začetnega oligonukleotida in 3'-koncev genov encimov z dodanima heksahistidinskima podaljškoma, TmGalA-HisTag in TmGalA D327G-HisTag. .... | 30 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Preglednica XIV:</b> Absorbance (A), znanih koncentracij standardnih raztopin BSA, ki smo jih spektrofotometrično izmerili pri valovni dolžini 595 nm.....  | 31 |
| <b>Preglednica XV:</b> Absorbance (A), vzorcev rekombinantnih proteinov, ki smo jih spektrofotometrično izmerili pri valovni dolžini 595 nm ter s pomočjo umeritvene premice izračunane koncentracije (c) proteinov..... | 32 |
| <b>Preglednica XVI:</b> Prikaz aktivnosti encima TmGalA-HisTag iz <i>Thermotoga maritima</i> pri uporabi različnih pNF-substratov.....   | 33 |

## SEZNAM SLIK

|  |    |
|--|----|
| <b>Slika 1:</b> Mehanizem glikozidaz. a) inverzijski mehanizem $\beta$ -glikozidaz b) retencijski mehanizem $\beta$ -glikozidaz. Povzeto po (9). .....   | 2  |
| <b>Slika 2:</b> Mehanizem delovanja $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G z uporabo donorja $\beta$ -gal- $N_3$ . Povzeto po (8).....  | 5  |
| <b>Slika 3:</b> Prikaz vezave dveh zaporednih histidinskih ostankov polihistidinskega podaljška (His-Tag) na agarozni nosilec z $Ni^{2+}$ -IDA ligandom. Povzeto po (22). .....  | 8  |
| <b>Slika 4:</b> Hidroliza pNF-glikozida z encimom $\alpha$ -glikozidazo; nastanek rumeno obarvanega p-nitrofenola.....   | 24 |
| <b>Slika 5:</b> Območje DNA, ki ustreza koncu genov encimov TmGalA in TmGalA D327G; zaključni kodon je označen z rdečo barvo. 1) Translacija aminokislinskega zaporedja v primeru izbrisa treh baz zaključnega kodona. 2) Translacija aminokislinskega zaporedja v primeru izbrisa dveh baz zaključnega kodona, označenih z rumeno barvo. ....   | 29 |
| <b>Slika 6:</b> SDS-PAGE elektroforeza za preverjanje čistosti rekombinantnih encimov TmGalA-HisTag in TmGalA D327G-HisTag. 1: Celični ekstrakti pred indukcijo z IPTG. 2: Celični ekstrakt induciran z IPTG. 3: TmGalA-HisTag po očiščenju z IMAC kromatografijo. 4: TmGalA D327G-HisTag po očiščenju z IMAC kromatografijo. 5: Standardi različnih molekulskih mas. ....   | 30 |
| <b>Slika 7:</b> HPLC- kromatogram reakcije, katalizirane z encimom TmGalA D327G-HisTag in uporabo substratov $\beta$ -gal- $N_3$ in pNF- $\alpha$ man. A) t = 0 h. B) t = 18 h. ....   | 34 |
| <b>Slika 8:</b> TLC-kromatogram sinteze gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF in gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF z encimom TmGalA D327G-HisTag z uporabo akceptorjev, gal- $\alpha$ -pNF (G) in man- $\alpha$ -pNF (M) ter donorja, $\beta$ -gal- $N_3$ . A: TLC-kromatogram transglikozilacijske reakcije pred očiščenjem s kolonsko kromatografijo. Številka 1 predstavlja pNF- $\alpha$ -glc, 2 $\beta$ -gal- $N_3$ , 3 |    |

|   |    |
|---|----|
| gal- $\alpha$ -(1-6)-glc- $\alpha$ -pNF; 4 galaktozo; 5 pNF- $\alpha$ -man in 6 gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF. B: TLC-kromatogram posameznih frakcij (1-9) sinteze gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF, zbranih med čiščenjem s kolonsko kromatografijo. Produkt je prisoten v frakcijah 4 in 5. .... | 35 |
| <b>Slika 9:</b> Reakcija sinteze gal- $\alpha$ -(1-6)-glc- $\alpha$ -pNF z $\alpha$ -glikosintazo TmGalA D327G-HisTag. Povzeto po (8). ....   | 37 |
| <b>Slika 10:</b> Reakcija sinteze gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF z $\alpha$ -glikosintazo TmGalA D327G-HisTag. Povzeto po (8). ....   | 37 |
| <b>Slika 11:</b> Izkoristki transglikozilacijskih reakcij, kataliziranih z encimom TmGalA D327G-HisTag, uporabo substratov $\beta$ -gal-N <sub>3</sub> in pNF- $\alpha$ -glc, ob prisotnosti sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov (c = 2 M).....  | 38 |
| <b>Slika 12:</b> Izkoristki transglikozilacijskih reakcij, kataliziranih z encimom TmGalA D327G-HisTag, uporabo substratov $\beta$ -gal-N <sub>3</sub> in pNF- $\alpha$ -man, ob prisotnosti sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov (c = 2 M).....  | 39 |
| <b>Slika 13:</b> Izkoristki transglikozilacijskih reakcij, kataliziranih z encimom TmGalA D327G-HisTag, uporabo substratov $\beta$ -gal-N <sub>3</sub> in pNF- $\alpha$ -glc ob prisotnosti ionskih tekočin.....  | 42 |
| <b>Slika 14:</b> Izkoristki transglikozilacijskih reakcij, kataliziranih z encimom TmGalA D327G-HisTag, uporabo substratov $\beta$ -gal-N <sub>3</sub> in pNF- $\alpha$ -man ob prisotnosti ionskih tekočin.....  | 43 |



## POVZETEK

Z uporabo glikosintaz, specifično mutiranih glikozid hidrolaz, se pri sintezi oligosaharidov izognemo slabim izkoristkom sinteznih reakcij, ki so posledica tega, da je produkt reakcije hkrati substrat glikozidaze. Uporaba organskih topil v encimskih reakcijah poveča topnost nepolarnih substratov. Z namenom zmanjšanja škodljivega vpliva na okolje, ki izhaja iz uporabe topil v kemijskih postopkih, so razvili zelena topila.

V sklopu magistrskega dela smo izrazili in izolirali rekombinantno  $\alpha$ -glikosintazo TmGalA D327G iz termofilne bakterije *Thermotoga maritima*. Genoma za rekombinantno  $\alpha$ -glikozidazo TmGalA ter  $\alpha$ -glikosintazo TmGalA D327G smo z verižno reakcijo s polimerazo dodali heksahistidinska podaljška na skrajna C-konca, s čimer smo omogočili enostavno enostopenjsko izolacijo in čiščenje encimov s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo. Uspešnost izražanja in izolacije encimov smo potrdili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata. S spektrofotometrično kvantifikacijo sproščenega para-nitrofenola smo potrdili, da dodatek heksahistidinskih podaljškov ni vplival na hidrolitično aktivnost encimov. Pri določanju substratne specifičnosti  $\alpha$ -glikozidaze TmGalA-HisTag smo ugotovili, da je zmožna hidrolizirati  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 glikozidno vez le pri uporabi substrata para-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida.

Transglikozilacijsko aktivnost  $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag smo dosegli z uporabo donorja  $\beta$ -D-galaktopiranozil azida ter akceptorjev para-nitrofenil- $\alpha$ -glukopiranozida ter para-nitrofenil- $\alpha$ -manopiranozida. Sintezo disaharidov gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF ter gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF smo potrdili z NMR-spektroskopijo in HPLC-metodo.

Analizirali smo tudi učinek zelenih topil, pridobljenih iz obnovljivih virov (derivati glicerola z odprto verigo, derivati glicerola s ciklično strukturo ter derivati 3-N,N-dietilamida), in ionskih tekočin na transglikozilacijsko aktivnost  $\alpha$ -galaktosintaze, TmGalA D327A.

Prišli smo do zaključka, da z uporabo sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov, nismo izboljšali transglikozilacijske aktivnosti  $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G. Najboljše izkoristke reakcij smo dosegli z uporabo samega acetatnega pufra. Popolno pretvorbo substrata ter najvišje izkoristke sinteze gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF in gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF smo dosegli z uporabo 30 % sotopila, ionske tekočine, [Troma] [NTF2], akceptorja para-nitrofenil- $\alpha$ -manopiranozida ter donorja  $\beta$ -D-galaktopiranozil azida.

**Ključne besede:** oligosaharidi,  $\alpha$ -galaktozidaza,  $\alpha$ -galaktosintaza iz *Thermotoga maritima* (TmGalA D327G), transglikozilacijske reakcije, zelena topila, topila, pridobljena iz obnovljivih virov, ionske tekočine

## ABSTRACT

The use of glycosynthases (specifically mutated glycoside hydrolases) in the synthesis of oligosaccharides avoids poor yields of synthetic reactions, resulting from the reaction product simultaneously being the enzyme substrate. The use of organic solvents increases solubility of the substrates. Green solvents were developed in order to reduce the harmful environmental impact resulting from the use of organic solvents in chemical processes.

We expressed and isolated recombinant  $\alpha$ -glycosynthase TmGalA D327G from the thermophilic bacteria *Thermotoga maritima*. In order to facilitate the purification process by immobilized metal ion affinity chromatography a hexahistidine tag was added to the C-terminus of the enzyme with polymerase chain reaction. The effectiveness of expression and isolation of the enzyme was confirmed with polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. With spectrophotometrical quantification of released para-nitrophenol we confirmed that the addition of hexahistidine tags does not effect the enzyme hydrolytic activity. The results of determining the substrate specificity of  $\alpha$ -glycosidase TmGalA-HisTag showed that the enzyme is capable of hydrolyzing  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 glycoside bond only when using para-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside as a substrate.

NMR and HPLC analyses showed that the transglycosilation reaction with the  $\alpha$ -glycosynthase TmGalA D327G using  $\beta$ -D-galactopyranoside azide as a donor and para-nitrophenyl- $\alpha$ -glucopyranoside and para-nitrophenyl- $\alpha$ -mannopyranoside as acceptors led to the synthesis of gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF and gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF, respectively.

In this work, different green solvents were screened in order to evaluate their effect on TmGalA D327-HisTag activity during transglycosilation reactions: solvents derived from biomass (glycerol based solvents with cyclic structures, with open chain, 3-N,N-dimethylamide derivatives) and ionic liquids. Results showed that solvents derived from biomass were not appropriate as co-solvents in the reaction with TmGalA D327G-HisTag using  $\beta$ -D-galactopyranoside azide as a donor and para-nitrophenyl- $\alpha$ -glucopyranoside and para-nitrophenyl- $\alpha$ -mannopyranoside as acceptors. In presence of ionic liquid, 30 % [Troma] [NTF2],  $\alpha$ -glycosynthase TmGalA D327G achieves a total substrate conversion and improved yield in the synthesis of the gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF and gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF.

**Keywords:** oligosaccharides,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -glycosynthase from *Thermotoga maritima* (TmGalA D327G), transglycosilation reactions, green solvents, ionic liquids, solvents derived from biomass

## SEZNAM OKRAJŠAV

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Asp                       | asparaginska kislina   |
| BSA                       | goveji serumski albumin ( <i>ang.</i> Bovine Serum Albumin)  |
| c                         | Koncentracija  |
| ELSD                      | izparilni detektor s sipanjem svetlobe ( <i>ang.</i> Evaporative Light Scattering Detector)                            |
| GH                        | glikozid hidrolaza, glikozidaza  |
| GTF                       | glikoziltransferaza  |
| HPLC                      | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti ( <i>ang.</i> High Performance Liquid Chromatography)                     |
| IMAC                      | kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija ( <i>ang.</i> Immobilized Metal ion Affinity Chromatography)                |
| IPTG                      | izopropil-tio- $\beta$ -D-galaktopiranozid   |
| LB gojišče                | <i>ang.</i> Lysogene Broth   |
| PCR                       | verižna reakcija s polimerazo ( <i>ang.</i> Polymerase Chain Reaction)   |
| <i>Pfu</i> DNA polimeraza | termostabilna DNA-polimeraza iz hipertermofilne arheje <i>Pyrococcus furiosus</i>                                      |
| OD                        | optična gostota ( <i>ang.</i> Optical Density)   |
| pNF                       | para-nitrofenol  |
| PSA                       | amonijev persulfat   |
| SDS                       | natrijev dodecilsulfat   |
| SDS-PAGE                  | polakrilamidna gelska elektroforeza, v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata  |
| T                         | temperatura  |
| TEMED                     | N, N, N', N''-tetrametiletan-1, 2-diamin   |
| TLC                       | tankoplastna kromatografija ( <i>ang.</i> Thin-Layer Chromatography)   |
| TmGalA GH36               | alfa-D-galaktosidaza iz bakterije <i>Thermotoga maritima</i>   |
| TmGalA D327G              | alfa-D-galaktosintaza, mutanta alfa-D-galaktosidaze iz bakterije <i>Thermotoga maritima</i>                            |
| Tris-HCl                  | tris (hidroksimetil) aminometan  |
| U                         | encimska enota, opredeljena kot količina encima, ki hidrolizira 1 $\mu$ mol substrata v 1 minuti pri določenih pogojih |

# 1. UVOD

## 1.1 OLIGOSAHARIDI

Oligosaharidi so ogljikovi hidrati, sestavljeni iz najmanj dveh do največ desetih monosaharidnih enot. Monosaharidi so med seboj povezani preko N-glikozidnih ali O-glikozidnih vezi (1). Oligosaharidi v obliki glikokonjugatov opravljajo vrsto pomembnih funkcij v bioloških sistemih. V obliki glikoproteinov (proteini, kovalentno povezani s sladkorjem) ali glikolipidov (konjugati sladkorjev in lipidov) so pomembne sestavine zunanjih površin sesalskih celic. Osrednjo vlogo igrajo pri ključnih dogodkih medceličnega prepoznavanja (2), zlasti pomembni so pri oploditvi, embriogenezi, razvoju živčevja, celični proliferaciji, imunskem odzivu, virusnem razmnoževanju in metastaziranju. Z vplivom na kvartarno strukturo in proteazno odpornost proteinov določajo njihovo stabilnost (3). Oligosaharidi so potencialno uporabni tudi v terapevtske namene (zamenjava konvencionalnih antibiotikov – antiadhezivno, protimikrobno delovanje) (4), a je zaradi zapletene strukture, ki otežuje kemijsko sintezo, njihova uporaba omejena (5).

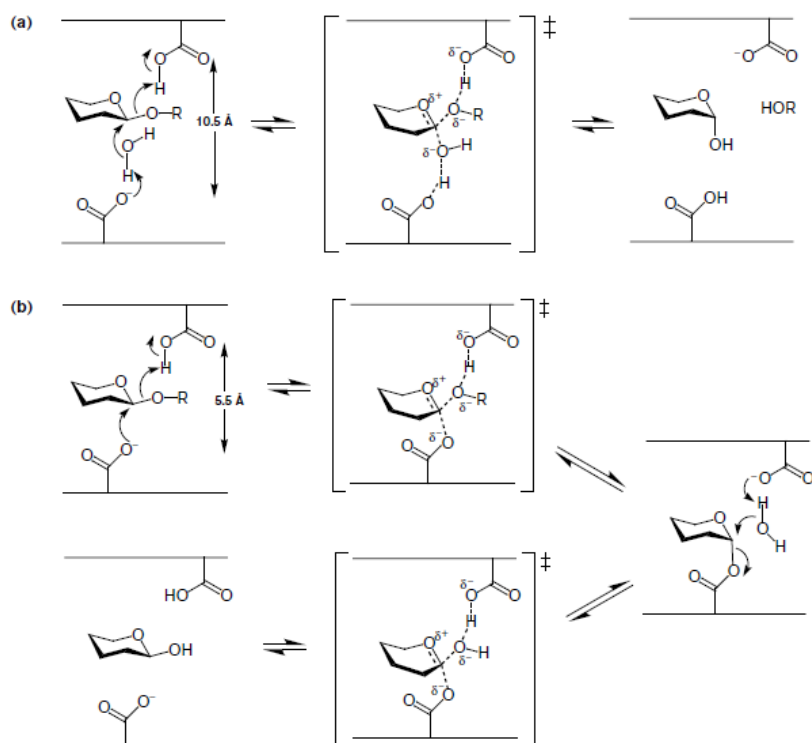
### 1.1.2 Sinteza oligosaharidov

Za pridobivanje oligosaharidov so razvili različne sintezne metode (6). Pri kemijski sintezi je vključena uporaba številnih postopkov za dodajanje in odstranjevanje zaščitne funkcionalnih skupin, kar otežuje in podaljšuje delo (5). Encimska sinteza oligosaharidov v nasprotju s tradicionalno klasično sintezo omogoča doseganje stereospecifičnosti in regiospecifičnosti, brez potrebne zaščitne funkcionalnih skupin. Možnost nadziranja regiospecifičnosti in stereospecifičnosti dopušča obsežno sintezo oligosaharidov (5).

V bioloških sistemih poteka encimska sinteza in razgradnja ogljikovih hidratov s pomočjo dveh vrst encimov, z glikozil transferazami (GTF) in glikozid hidrolazami (GH). GTF katalizirajo prenos monosaharida iz aktiviranega donorja do akceptorja (6). Uporabo encimskih sintez, ki so katalizirane s pomočjo GTF, v obsežni proizvodnji oligosaharidov omejujejo omejena dostopnost GTF in visoka cena naravnih substratov (nukleotidni sladkorji) (7). Alternativo GTF predstavljajo glikozid hidrolaze (GH), usmerjene v reakcijo transglikozilacije (8).

## 1.2 GLIKOZID HIDROLAZE (GLIKOZIDAZE)

Glikozid hidrolaze hidrolizirajo glikozidno vez na dva možna stereokemična načina, z inverzijo ali retencijo anomerne konfiguracije. Inverzijski mehanizem glikozidaz (slika 1a) deluje preko enostopenjske reakcije, kjer karboksilna ostanka delujeta kot kislinski in bazični katalizator. Karboksilna ostanka sta v tem primeru oddaljena 10,5 Å (9). Anomerna konfiguracija produkta se, v primerjavi s substratom, spremeni (5). Retencijski mehanizem (slika 1b) deluje preko dvostopenjske reakcije z vmesno tvorbo kovalentnega intermediata. Karboksilna ostanka sta pri retencijskem mehanizmu oddaljena 5,5 Å (9). Anomerna konfiguracija produkta je enaka kot pri substratu (5).



**Slika 1:** Mehanizem glikozidaz. a) inverzijski mehanizem  $\beta$ -glikozidaz b) retencijski mehanizem  $\beta$ -glikozidaz. Povzeto po (9).

Glikozidaze uporabljamo tudi pri sintezi oligosaharidov. Gre za kinetično kontrolirano reakcijo, pri kateri glikozilni doner prenese glikozilni ostanek do akceptorja, sladkorja, prisotnega v reakcijskem mediju. Uporabo encimskih sintez, kataliziranih z glikozidazami, omejujejo predvsem slabi izkoristki sinteznih reakcij, ki so posledica tega, da je produkt

reakcije hkrati substrat encima. Pristop k encimski sintezi oligosaharidov, ki vključuje uporabo glikosintaz, se tem omejitvam izogne (10).

### 1.2.1 $\alpha$ -galaktozidaze

$\alpha$ -galaktozidaze ( $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaze) katalizirajo hidrolizo  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 vezi med  $\alpha$ -D-galaktozilnim ostankom in preostalim oligosaharidom. Glede na substratno specifičnost jih delimo v dve skupini. Prva skupina hidrolizira oligosaharide z nižjo molekulsko maso, kot so melibioza, rafinoza in stahioza ter sintezno pridobljen para-nitrofenol- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (pNF- $\alpha$ -gal). Druga skupina  $\alpha$ -galaktozidaz hidrolizira polisaharide, kot sta galaktomanan in glukomanan (11).  $\alpha$ -galaktozidaze se na osnovi aminokislinskega zaporedja in strukturne podobnosti nahajajo v družinah glikozil hidrolaz: GH4, GH27, GH36 in GH57. Encimi iz evkariontskih organizmov so v večini združeni v družino GH27. Prokariontske encime (arhejskega in bakterijskega izvora) uvrščamo v družine GH4, GH36 in GH57 (12).

$\alpha$ -galaktozidaze igrajo pomembno vlogo pri ljudeh. Fabryjeva bolezen je dedna bolezen, ki je posledica mutacije v genu GLA, ki nosi zapis za  $\alpha$ -galaktozidazo. Mutiran encim je neaktiven in ni zmožen odstraniti terminalnih galaktoz, kar privede do kopičenja glikosfingolipidov v tkivih različnih organskih sistemov (12). Prvi znaki in simptomi bolezni se začnejo pojavljati v zgodnjem otroštvu in se z leti stopnjujejo (13). Najpogostejše so hude bolečine v okončinah (nevropatije), zmanjšano potenje (hipohidroza), spremembe na koži (angiokeratomi), ishemične bolezni srca, srčne kapi, hipertrofične kardiomiopatije, motnje srčnega ritma (aritmije), proteinurija, ledvična insuficienca, spremembe na roženici (cornea verticillata), težave prebavnega trakta, utrujenost in vrtočlavlavica (13, 14). Nezdravljeni bolniki imajo krajšo življenjsko dobo. Fabryjeva bolezen je neozdravljiva, vendar se je pri odpravljanju simptomov ter preprečitvi progresije bolezni pokazalo uspešno nadomestno encimsko zdravljenje z rekombinantno  $\alpha$ -galaktozidazo (13, 14).  $\alpha$ -galaktozidaze uporabljamo v biotehnoške namene pri razgradnji rafinoze (izboljšanje kristalizacije saharoze), procesu predelave sojinega mleka, izboljšanju viskoznosti in želirnih lastnosti galaktomanana in pri pretvorbi antigenov krvne skupine B do bolj univerzalno prenosljive krvne skupine 0 (12).

### $\alpha$ -D-galaktozidaza (TM1192), pridobljena iz bakterije *Thermotoga maritima*

Encim  $\alpha$ -D-galaktozidaza, pridobljena iz hipertermofilne bakterije *Thermotoga maritima* (TmGalA), spada v družino glikozidaz GH36. Zmožna je hidrolizirati  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 vezi galaktoznih ostankov. Zaradi dolgotrajnejše stabilnosti pri temperaturi nad 75 °C je zelo zanimiva z biotehnološkega vidika (11). Encim deluje po principu retencijskega reakcijskega mehanizma (8). Je homodimeren protein, sestavljen iz 522 aminokislin. Encim doseže maksimalno aktivnost pri T = 90-95 °C in pH 5,0-5,5 (11). Vlogo katalitičnega nukleofila odigra aminokislina Asp327, aminokislina Asp387 predstavlja kislino/bazo (12).

## 1.3 GLIKOSINTAZE

Glikosintaze so vrsta encimov, ki nastanejo s specifično mutacijo glikozidaz. Glikosintaze v povezavi z aktiviranim donorjem (z nasprotno anomerno konfiguracijo kot substrat) in ustreznim akceptorjem učinkovito sintetizirajo oligosaharide, vendar jih ne hidrolizirajo. Glikosintaze omogočajo sintezo ogljikovih hidratov z visokimi izkoristki (10).

### 1.3.1 Načrtovanje glikosintaz

Prepoznavanje ostankov, ki delujejo kot katalitični nukleofili pri  $\alpha$ - in  $\beta$ -glikozidazah z retencijskim mehanizmom delovanja, je mogoče doseči z uporabo različnih metod. Te metode vključujejo zaviralce (inhibitorje), preglede 3D-strukture encima, usmerjeno mutagenozo in podrobno encimsko opredelitev mutante (15).

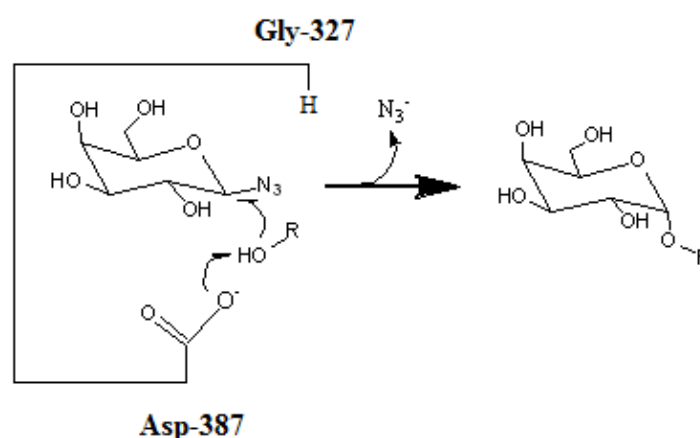
Zamenjava katalitičnega ostanka encima, tj. karboksilatnega nukleofila (aspartat, glutamat) z nenukleofilnim ostankom (nevtralno aminokislino, npr. glicinom, serinom ali alaninom), ne vpliva na zvitje encima, a je ta katalitično neaktiven (16). Preostalo aktivno mesto ostane enako, zato pričakujemo, da bo mutiran encim kataliziral vezavo aktiviranega  $\alpha$ -glikozilnega derivata na primeren sladkor (akceptor), vezan v aglikonskem žepu. Glikosintaza ni zmožna hidrolizirati tako nastalega oligosaharida (10). Mutirani encimi, glikosintaze, sintetizirajo oligosaharide na dva različna načina (inverzni in retencijski mehanizem), glede na mehanizem delovanja glikozidaze.

### 1.3.2 $\alpha$ -D-galaktosintaza (TmGalA D327G), pridobljena iz bakterije *Thermotoga maritima*

$\alpha$ -D-galaktosintazo iz bakterije *Thermotoga maritima* so pridobili z zamenjavo katalitičnega nukleofila (Asp327)  $\alpha$ -galaktozidaze (TmGalA) z glicinom. Z mutacijo so zmanjšali hidrolitično aktivnost encima v primerjavi z izhodnim encimom in povečali transglikozilacijsko aktivnost, tj. katalizo sinteze oligosaharidov (11). Mutirani encimi, pridobljeni iz termofilov ali hipertermofilov, katalizirajo reakcije pri temperaturi med 60 in 125 °C in so zelo stabilni pri visokih koncentracijah organskih topil (17). TmGalA D327G je zmožna sintetizirati disaharide z uporabo donorske azidne galaktozne skupine v  $\beta$ -položaju ( $\beta$ -gal- $N_3$ ) in z akceptorjema pNF- $\alpha$ -man ali pNF- $\alpha$ -glc (8). Poročali so od 200- do 300-kratnem zmanjšanju hidrolitične aktivnosti in katalitične aktivnosti mutiranega encima do para-nitrofenol- $\alpha$ -D-galaktopiranozida pri  $T = 37$  °C v primerjavi z izhodnim encimom TmGalA. Uporaba glikozilazidnih substratov je povzročila 30-kratno povečanje katalitične aktivnosti TmGalA D327G v primerjavi z neazidnimi derivati (12).

#### Mehanizem delovanja:

Prostor, ki je nastal z mutacijo  $\alpha$ -glikozidaze (odstranitev stranske verige Asp327), omogoča dostop do aktivnega mesta  $\beta$ -gal- $N_3$  (8). Galaktoza se prenese do akceptorja, katerega z bazično katalizo aktivira ostanek Asp387 (slika 2). Mutiran encim ni sposoben hidrolizirati novo nastale  $\alpha$ -glikozidne vezi produkta (disaharida). To omogoči kopičenje disaharidnega produkta v reakcijski mešanici.



**Slika 2:** Mehanizem delovanja  $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G z uporabo donorja  $\beta$ -gal- $N_3$ . Povzeto po( 8).



## 1.4 PRIDOBIVANJE REKOMBINANTNE $\alpha$ -D-GALAKTOSINTAZE, PRIDOBLJENE IZ BAKTERIJE *THERMOTOGA MARITIMA*

### 1.4.1 Dodatek polihistidinskega podaljška na skrajni C-konec proteina

Afinitetni podaljški omogočajo specifično prepoznavanje in interakcijo z določenimi ligandi, vezanimi na inerten nosilec stacionarne faze pri afinitetni kromatografiji. Običajno na N- ali C-konec rekombinantnega proteina pripnemo krajše peptidno zaporedje (18). Najpogosteje uporabljen pristop je podaljševanje zapisa za določen protein z zapisom za zaporedne histidinske ostanke (polihistidinski podaljšek). Polihistidinski podaljšek praviloma ne vpliva na aktivnost izraženega proteina, omogoča pa zelo učinkovito čiščenje s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo (IMAC) (19). Najučinkovitejši pristop za združevanje genov je metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) ali kasetno kloniranje.

### 1.4.2 Izražanje rekombinantnih proteinov v ekspresijskem sistemu

#### *E. coli* BL21 (DE3)

Z uporabo ekspresijskih vektorjev je omogočen prenos genske informacije. Vektorji so molekule DNA, s katerimi prenesemo želen segment DNA v gostiteljsko celico (ekspresijski sistem). Glede na velikost prenosa genske informacije ločimo: plazmide, kozmide, bakteriofage in umetne krožne kromosome kvasovk (YAC) (20).

*Escherichia coli* je gramnegativna bakterija in najpogosteje uporabljen ekspresijski sistem za izražanje rekombinantnih proteinov v biotehnologiji. Sev *E. coli* BL21 ne vsebuje funkcionalnih genov za proteazo Lon in membransko proteazo OmpT, ki bi lahko razgradili izražene proteine. Prednosti ekspresijskega sistema *E. coli* so velik izbor in enostaven vnos ekspresijskih vektorjev, hitro in enostavno gojenje ter varnost (18). Prisotnost induktorja v ekspresijskem sistemu sproži transkripcijo in nastajanje kodiranega proteina. Ekspresijski sev *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) v genomu vsebuje profag  $\lambda$ DE3 z genom za T7 RNA-polimerazo. Uporablja se za izražanje netoksičnih proteinov. Zaradi genske stabilnosti bakterij med bakterijsko rastjo morajo biti promotorji na ekspresijskih vektorjih strogo nadzorovani (pozitivna in negativna kontrola) (18). V večini primerov je negativna kontrola izražanja uravnavana s promotorjem operona *E. coli* za izrabo laktoze (*Lac*), ki se aktivira po indukciji z IPTG. Vektorji (sistem plazmidov pET) vsebujejo pozni bakteriofagni promotor T7. Do izražanja lahko pride le v bakterijskih sevih s

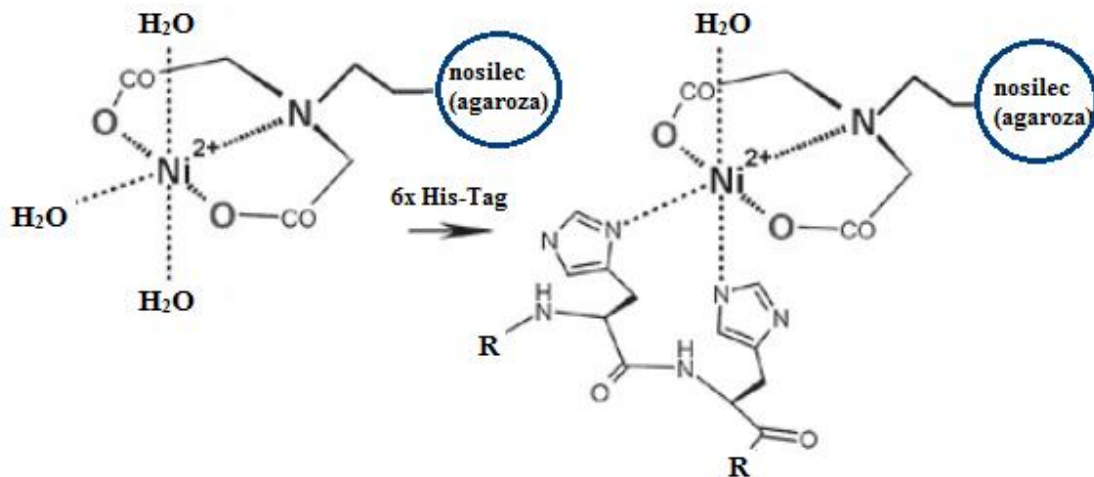
kromosomskimi sistemi za RNA-polimerazo T7 (*E. coli* BL21 (DE3)), ki je pod nadzorom *Lac*-promotorja (18).

### 1.4.3 Izolacija in čiščenje

Izolacijo in večstopenjsko čiščenje rekombinantnih proteinov razdelimo na štiri različne faze. Prva faza zajema ločitev celic od medija (centrifugiranje, filtriranje), mehansko razbitje celic ekspresijskega sistema (npr. z ultrazvokom) ter odstranitev netopnega materiala (celični ostanki) s centrifugiranjem, če je rekombinatni protein v topni obliki (19). V drugi fazi je pomembno koncentriranje rekombinantnega produkta ter odstranitev in inaktivacija proteaz (obarjanje, ekspanzijska, ionsko-izmenjevalna ali afinitetna kromatografija). Namen tretje faze čiščenja, vmesno čiščenje, je odstranitev večine nečistot (celičnih proteinov, nukleinskih kislin in endotoksinov) (ionsko-izmenjevalna ali hidrofobno interacijska kromatografija). V četrti fazi, končno čiščenje, se odstranijo nečistote v sledovih in rekombinantnemu proteinu podobne molekule (gelska filtracija, kromatografija z obrnjeno fazo). Poleg kromatografskih metod je pri čiščenju rekombinantnih proteinov včasih potrebno uporabiti tudi druge metode čiščenja: ultrafiltracijo, mikrofiltracijo, diafiltracijo, sterilizacijo (19).

#### Izolacija in čiščenje encima s pomočjo kovinsko-kelatne afinitetne kromatografije (IMAC)

Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija temelji na tvorbi koordinacijskih vezi med imobiliziranimi kovinskimi ioni in aminokislinskimi ostanki na površini tarčnega proteina. V večini primerov so uporabljeni dvovalentni ioni prehodnih kovin ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$ ), ki se s koordinacijskimi vezmi močno vežejo na dušikove atome imidazolne ali indolne skupine (21). Stacionarno fazo pri metodi IMAC predstavljajo delci agaroze s kovalentno vezanimi skupinami, ki omogočajo kompleksacijo kovinskih ionov. Običajno sta to tridentatna iminodiacetilna skupina (IDA) ali tetradentatna nitrilotriacetatna skupina (NTA) (21). Metoda je zelo učinkovita pri izolaciji proteinov z dodanimi polihistidinskimi podaljški (19). Z enim kationom ( $\text{Ni}^{2+}$ ) interagirata dva imidazolna obroča zaporednih histidinskih ostankov (slika 3) (22). Proteinsko inženirstvo omogoča dodajanje številnih zaporednih histidinskih ostankov na N- ali C-konec proteina, kar omogoča in izboljša čiščenje in izolacijo proteinov s polihistidinskimi podaljški. Prednosti metode sta visoka učinkovitost (100- do 1000-kratno očiščenje v enem koraku) ter visoka specifičnost (21).



**Slika 3:** Prikaz vezave dveh zaporednih histidinskih ostankov polihistidinskega podaljška (His-Tag) na agarozni nosilec z  $Ni^{2+}$ -IDA ligandom. Povzeto po (22).

Čiščenje z IMAC-kromatografijo zajema štiri osnovne korake :

- ekvilibracija kolone s pufrom, v katerem je raztopljen vzorec,
- nanos vzorca (vezava proteina),
- spiranje nevezanega materiala (kontaminantov),
- elucija vezanega proteina.

#### 1.4.4 Kvantifikacija proteinov z UV/VIS spektrofotometrijo in z metodo po Bradfordu

Metoda temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 na bazične in aromatske aminokislinske ostanke. Ob vezavi v kislem pride do premika absorpcijskega maksimuma barvila s 365 nm na 595 nm (sprememba barve iz rdeče v modro) (23). Za določanje koncentracije proteina merimo povečanje absorbance pri valovni dolžini 595 nm. Pri tej valovni dolžini je najvišja razlika med absorpcijskim spektrom vezane in proste oblike barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 (23). Prednosti metode so enostavnost, točnost in občutljivost. Odziv je odvisen od aminokislinskega zaporedja proteina. Točna kvantifikacija proteinov zahteva proteinski standard, ki je enak proteinu, katerega koncentracijo skušamo določiti, a to ni vedno mogoče (23). Točno kvantifikacijo proteinov onemogočajo močno alkalni vzorci in višje koncentracije površinsko aktivnih snovi.

## 1.5 »ZELENA TOPILA«

Uporaba biokatalizatorjev v kemični industriji in biotehnologiji vodi do visoke kemo-selektivnosti, regioselektivnosti in stereoselektivnosti pri milih reakcijskih pogojih. Kadar običajni substrati niso topni v vodi, je obvezna uporaba organskih topil. Uporaba organskih topil v encimskih reakcijah poveča topnost nepolarnih substratov, pomakne termodinamsko ravnotežje reakcije v smer tvorbe produktov (sinteza), zmanjša neželene stranske reakcije, poveča toplotno stabilnost encimov in izogne se možnosti mikrobiološke kontaminacije (17).

Organska topila, uporabljena v mnogih industrijskih procesih, so eden izmed glavnih razlogov za onesnaževanje okolja. Zelena topila so razvili s ciljem, da bi se zmanjšal škodljiv vpliv na okolje, zdravje in varnost, ki izhaja iz uporabe topil v kemijskih postopkih (17). Za zelena topila velja, da imajo nizko toksičnost, nizek parni tlak, dobro biorazgradljivost in ne škodujejo okolju (17). Zelena topila so razdeljena v pet glavnih kategorij: voda, ionske tekočine (nizek parni tlak, manj emisij v zrak), superkritične tekočine (okolju neškodljive), fluorna topila in topila, pridobljena iz obnovljivih virov (dobra biorazgradljivost) (24).

Veliko encimov ob prisotnosti različnih organskih topil ohrani aktivnost. Po drugi strani pa lahko prisotnost organskih topil spremeni aktivnost in specifičnost encima. Aktivnost in enantioselektivnost encima sta verjetno odvisni tudi od fizikalnih lastnosti topila (gostota, dipolni moment in hidrofobnost) (25).

### 1.5.1 Topila, pridobljena iz obnovljivih virov

V primerjavi z organskimi topili, pridobljenimi iz nafte, so prednosti topil, pridobljenih iz obnovljivih virov, boljša biorazgradljivost, nižja toksičnost in trajnostna proizvodnja. Komercialno dostopna topila, pridobljena iz obnovljivih virov, so estri mlečnih in maščobnih kislin, derivati glicerola, 2-metiltetrahidrofuran, etanol in N,N-dimetilamidi maščobnih kislin (17).

#### Derivati glicerola

Glicerol običajno nastane kot stranski produkt transesterifikacije trigliceridov pri proizvodnji naravnih derivatov maščobnih kislin. Ni toksičen, je biorazgradljiv in mogoče ga je reciklirati (26). Glicerol in njegovi derivati imajo zanimive značilnosti kot so eno-

stavna derivatizacija, nastavljive lastnosti ter razpoložljivost (proizvodnja biodizla) (27). Imajo dobre tako fizične kot kemične lastnosti: zelo visoka temperatura vrelišča, zanemarljiv parni tlak, kompatibilnost z večino organskih in anorganskih spojin (28). Posebni pogoji shranjevanja in rokovanja niso zahtevani. Visoka temperatura vrelišča omogoča destilacijo produktov. Zaradi polarne narave se večina anorganskih spojin, kislin in baz topi v glicerolu in njegovih derivatih, prav tako pa so topne v njem organske spojine, ki so slabo topne v vodi (28). Slabost glicerola in njegovih derivatov je visoka viskoznost, ki jo je mogoče zmanjšati s povečanjem temperature nad 50 °C. Dokazali so, da večina derivatov glicerola, uporabljenih kot sotopila pri transglikozilacijskih reakcijah z encimom  $\beta$ -galaktozidazo, vpliva na popolno izgubo aktivnosti encima (27). Derivati glicerola z eno  $\text{CF}_3$ -skupino oziroma derivati z daljšimi fluoriranimi verigami nimajo vpliva na izboljšanje transglikozilacijske aktivnosti encima. Derivati glicerola z dvema  $\text{CF}_3$ -skupinama so pokazali izboljšanje v izkoristku reakcije (ni prišlo do hidrolize produkta) ter regioselektivnosti reakcije. Sklepali so, da na aktivnost encima vpliva topnost sotopila v vodi. Sotopila z dolgimi fluoriranimi verigami so netopna v vodi, pride do ločitve vodne in organske faze (27). Pri uporabi sotopil, pridobljenih iz glicerola, so dokazali, da je prisotnost sotopil, katerih koncentracija je znašala 2 M, dala najboljše izkoristke reakcij (25, 27).

### 1.5.2 Ionske tekočine

Ionske tekočine spadajo med sodobna topila in so največja skupina zelenih topil. So ionske spojine, ki so pri temperaturi pod 100 °C (v večini tudi pri sobni T) v tekočem agregatnem stanju (17). Pripisujejo jim izjemne lastnosti, kot so toplotna stabilnost (29), visoka polarnost (30), inertnost (31), zelo nizek parni tlak (32), nevnetljivost, nizka temperatura tališča (33) in široko elektrokemično okno (34). Povezava med lastnostmi in strukturo ionskih tekočin še ni znana. Izbira različnih protiionov (kationov in anionov) močno vpliva na lastnosti ionskih tekočin (35).

Glavne pomanjkljivosti ionskih tekočin so visoka cena in toksičnost. Obstaja veliko dokazov o tem, da so ionske tekočine prav tako škodljive kot konvencionalna organska topila, katera naj bi nadomestila. Poročali so o protibakterijski aktivnosti, citotoksičnosti, toksičnosti do mnogoceličnih organizmov in tudi ekotoksičnosti. Že majhne ostanke topila v produktu je potrebno odstraniti (17).

Uporaba ionskih tekočin v biokatalizi zagotavlja stabilno in optimalno okolje encimom. Encimi ohranijo svoje katalitične lastnosti. Omogočajo tudi encimsko katalizo polarnih substratov (sladkorjev, peptidov, nukleotidov, biokemičnih materialov) v ne-vodnem mediju. Bistveni prednosti uporabe ionskih tekočin sta možnost ponovne uporabe topila in izboljšave na področju očiščenja produkta, še posebno pri polarnih nehlapnih materialih (36). Uporaba ionskih tekočin pri encimski transglikozilaciji ne nadomesti le organskih topil, temveč tudi izboljša izkoristek reakcij in poveča stabilnost samega encima (37). Pri sintezi N-acetilaktosamina z  $\beta$ -galaktozidazo, je prišlo z uporabo ionskih tekočin, kot sotopila v puferskem mediju, do dvakratnega povečanja nastanka produkta v primerjavi s samim vodnim medijem. Produkt omenjene reakcije je hkrati substrat encima,  $\beta$ -galaktozidaze. Pride do sekundarne hidrolize, kar uporaba ionskih tekočin kot sotopil zavre in povzroči kopičenje produkta v reakcijski zmesi (36). Optimalna koncentracija ionskih tekočin znaša praviloma okoli 30 % (37).

Zelo verjetno je, da zaradi njihove ionske strukture prihaja do interakcij med spojinami ionskih tekočin in nabitimi skupinami encimov, kar vodi do sprememb v strukturi encima. Možno je, da so prav te interakcije razlog za spremembe v selektivnosti in stabilnosti encima (37).

## 2. NAMEN DELA

Namen magistrskega dela bo analizirati učinek zelenih topil, pridobljenih iz obnovljivih virov, in ionskih tekočin na aktivnost encima  $\alpha$ -galaktosintaze, TmGalA D327A, pridobljene iz termofilne bakterije *Thermotoga maritima*.

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) bomo encimoma  $\alpha$ -glikozidazi in  $\alpha$ -galaktosintazi, pridobljenima iz bakterije *Thermotoga maritima*, dodali heksahistidinska podaljška na skrajna C-konca proteinov. Podaljška bomo dodali z namenom lažje izolacije in čiščenja. V ekspresijskem sistemu *Escherichia coli* BL21 (DE3), bomo s pomočjo usmerjene mutageneze izrazili nativni tip encima, TmGalA-HisTag, in mutiran encim, TmGalA D327G-HisTag. Očistili in izolirali ju bomo s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo. Čistost zbranih frakcij bomo preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo, v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE). Koncentracijo proteinov bomo določili kvantitativno z metodo po Bradfordu.

Vpliv heksahistidinskih podaljškov na hidrolitično aktivnost nemutiranega encima, TmGalA-HisTag, bomo določili s spektrofotometrično kvantifikacijo para-nitrofenola (pNF), s hidrolizo sproščenega iz različnih substratov, z merjenjem absorbance pri 410 nm. Rezultate bomo primerjali z rezultati hidrolitične aktivnosti encima TmGalA brez dodanih heksahistidinskih podaljškov.

Substratno specifičnost nemutiranega encima, TmGalA-HisTag, bomo spremljali z uporabo različnih pNF-substratov. Substratno specifičnost mutiranega encima, TmGalA D327G-HisTag, bomo določali z uporabo donorja,  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub>, ter različnih akceptorjev (pNF-substrati). Potek encimskih reakcij bomo spremljali z metodama TLC in HPLC. Strukture nastalih produktov bomo analizirali z NMR-spektroskopijo.

Reakcije transglikozilacije z  $\alpha$ -galaktosintazo TmGalA D327G-HisTag bomo nato izvedli tudi z uporabo sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov (derivati glicerola in N,N-dimetilamida), ter ionskih tekočin. Produkte reakcij bomo spremljali z metodo HPLC. Izkoristke reakcij ob prisotnosti zelenih topil bomo primerjali z izkoristkom reakcije ob prisotnosti pufra samega (50 mM acetatni pufer, pH 5).

## 3. EKSPERIMENTALNO DELO

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Substrati

V preglednici I so prikazani različni substrati, uporabljeni pri hidrolitičnih in transglikozilacijskih reakcijah z encimi TmGalA, TmGalA-HisTag in TmGalA D327G-HisTag.

Proizvajalec: Sigma-Aldrich, ZDA

**Preglednica I:** *Substrati, uporabljeni pri hidrolitičnih in transglikozilacijskih reakcijah.*




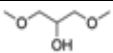
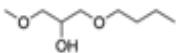
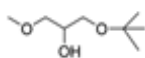
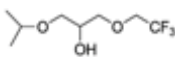
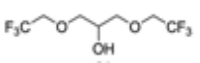
| <b>Substrat</b>  | <b>Okrajšava</b>            |
|--|-----------------------------|
| <b>D-(+)-glukoza</b>   | Glc                         |
| <b>D-(+)-manoza</b>  | Man                         |
| <b>D-(+)-galaktoza</b>   | Gal                         |
| <b>D-(+)-fukoza</b>  | Fuc                         |
| <b>D-(+)-fruktoza</b>  | Fru                         |
| <b>N-acetil-D-galaktozamin</b>                                 | GalNAc                      |
| <b>N-acetil-D-glukozamin</b>                                   | GlcNAc                      |
| <b>p-nitrofenil-<math>\alpha</math>-D-fukopiranozid</b>        | pNF- $\alpha$ -fuc          |
| <b>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-D-fukopiranozid</b>         | pNF- $\beta$ -fuc           |
| <b>p-nitrofenil-<math>\alpha</math>-D-galaktopiranozid</b>     | pNF- $\alpha$ -gal          |
| <b>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-D-galaktopiranozid</b>      | pNF- $\beta$ -gal           |
| <b>p-nitrofenil-<math>\alpha</math>-D-glukopiranozid</b>       | pNF- $\alpha$ -glc          |
| <b>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-D-glukopiranozid</b>        | pNF- $\beta$ -glc           |
| <b>p-nitrofenil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozid</b>        | pNF- $\alpha$ -man          |
| <b>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-D-manopiranozid</b>         | pNF- $\beta$ -man           |
| <b>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-N-acetil-D-galaktozamin</b> | pNF- $\beta$ -GalNAc        |
| <b>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-N-acetil-D-glukozamin</b>   | pNF- $\beta$ -GlcNAc        |
| <b><math>\beta</math>-D-galaktopiranozil azid</b>              | $\beta$ -gal-N <sub>3</sub> |

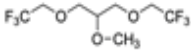
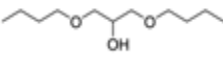
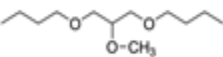

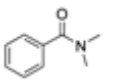
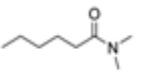


### 3.1.2 Topila

Sotopila, pridobljena iz obnovljivih virov, uporabljena pri transglikozilacijskih reakcijah  
Topila (T4-T11), pridobljena iz obnovljivih virov (derivati glicerola) nam je posredoval prof. dr. Jose I. Garcia iz inštituta Instituto de Ciencias Materiales de Aragon (38). Proizvajalec cikličnih derivatov glicerola (T1-T3) in derivatov dimetilamida (T12-T14) je podjetje COGNIS IP Mangement GmbH, Nemčija.

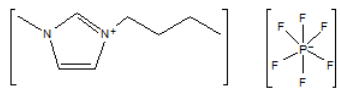

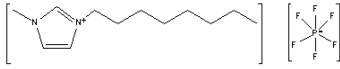
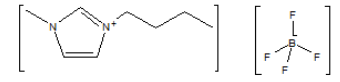
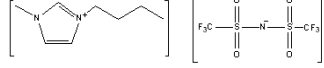
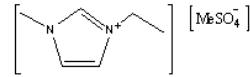
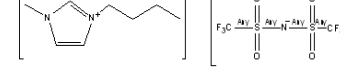
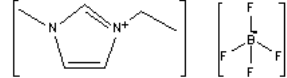
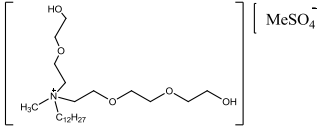
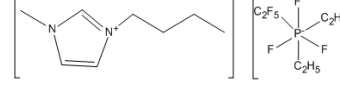
**Preglednica II:** Sotopila, pridobljena iz obnovljivih virov (derivati glicerola in *N,N*-dimetilamida), uporabljena pri transglikozilacijskih reakcijah z  $\alpha$ -galaktosintazo *TmGalA D327G-HisTag* iz *Thermotoga maritima* (25, 27).

| Topilo  | Gostota (g/ml) | log P | Sestava sistema | Struktura topila  |
|---|----------------|-------|-----------------|---|
| <b>Derivati glicerola s ciklično strukturo</b>                  |                |       |                 |   |
| <b>T1</b><br>1,3-dioksan-5-ol                                   | 1,24           | -0,57 | monofazni       |    |
| <b>T2</b><br>5-hidroksi-1,3-dioksan-2-on                        | 1,41           | -0,24 | monofazni       |  |
| <b>T3</b><br>(2,2-dimetil-1,3-dioksolan-1-il)metanol            | 1,06           | 0,03  | monofazni       |  |
| <b>Derivati glicerola z odprto verigo</b>                       |                |       |                 |   |
| <b>T4</b><br>1,3-dimetoksi-propan-2-ol                          | 1,07           | -0,60 | monofazni       |  |
| <b>T5</b><br>2-butoksi-3-metoksipropan-2-ol                     | 0,94           | 0,14  | monofazni       |  |
| <b>T6</b><br>1- <i>terc</i> -butoksi-3-metoksipropan-2-ol       | 0,91           | 0,27  | monofazni       |  |
| <b>T7</b><br>1-isopropoksi-3-(2,2,2-trifluoroetoksi)propan-2-ol | 1,12           | 1,14  | Bifazni         |  |
| <b>T8</b><br>1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoksi)propan-2-ol          | 1,36           | 1,42  | Bifazni         |  |

|   |      |       |           |   |
|---|------|-------|-----------|---|
| <b>T9</b><br>2-metoksi-1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoski)<br>propan | 1,27 | 1,71  | Bifazni   |  |
| <b>T10</b><br>1,3-dibutoksipropan-2-ol                          | 0,89 | 2,07  | Bifazni   |  |
| <b>T11</b><br>1-(3-butoksi-2-metoksipropoksi)butan              | 0,89 | 2,48  | Bifazni   |  |
| <b>Derivati 3-N, N-dimetilacetamida</b>                         |      |       |           |   |
| <b>T12</b><br>2-hidroksi-N,N-dimetilpropanamid                  | 1,06 | -0,69 | monofazni |  |
| <b>T13</b><br>N,N-dimetilbenzamid                               | 1,15 | 1,41  | monofazni |  |
| <b>T14</b><br>N,N-dimetilheksanamid                             | 0,91 | 1,42  | monofazni |  |

## Ionske tekočine, uporabljene kot sotpila pri transglikozilacijskih reakcijah

**Preglednica III:** Ionske tekočine, uporabljene kot sotpila pri transglikozilacijskih reakcijah z  $\alpha$ -galaktosintazo *TmGalA D327G-HisTag* iz *Thermotoga maritima*.

| Ime topila                                     | IUPAC ime topila  | Struktura topila   | Proizvajalec                            |
|--|---|--|---|
| <b>[BMIM][PF<sub>6</sub>]</b><br>99 % čistost  | 1-butil-3-metilimidazol<br>heksafluorofosfat                        |    | Merck                                   |
| <b>[TROMA][NTF<sub>2</sub>]</b>                | metiltrioktilamonijev bis<br>(trifluorometilsulfonil) imid          |    | Solvent<br>Innovation GmbH<br>(Nemčija) |
| <b>[OMIM][PF<sub>6</sub>]</b>                  | 1-oktil-3-metilimidazol<br>heksafluorofosfat                        |    | Solvent<br>Innovation GmbH<br>(Nemčija) |
| <b>[BMIM][BF<sub>4</sub>]</b><br>99 % čistost  | 1-butil-3-metilimidazol<br>tetrafluoroborat                         |   | Merck                                   |
| <b>[HMIM][NTF<sub>2</sub>]</b><br>99 % čistost | 1-heksil-3-metilimidazol bis<br>(trifluorometilsulfonil) imid       |  | Merck                                   |
| <b>[EMIM][SO<sub>4</sub>]</b><br>99 % čistost  | 1-etil-3-metilimidazol metil sulfat                                 |  | Merck                                   |
| <b>[BMIM][NTF<sub>2</sub>]</b><br>99 % čistost | 1-butil-3-metilimidazol bis<br>(trifluorometilsulfonil)imid         |  | Merck                                   |
| <b>[EMIM][BF<sub>4</sub>]</b>                  | 1-etil-3-metilimidazol<br>tetrafluoroborat                          |  | Solvent<br>Innovation GmbH<br>(Nemčija) |
| <b>[CPMA][MeSO<sub>4</sub>]</b>                | kokosalkil pentaetoksi metil<br>amonijev metilsulfat                |  | Solvent<br>Innovation GmbH<br>(Nemčija) |
| <b>[BMIM][FAP]</b><br>99 % čistost             | 1-butil-3-metilimidazol tris<br>(pentafluoro etil) trifluoro fosfat |  | Merck                                   |

### 3.1.3 Priprava bakterijskega gojišča

Za pripravo 1 litra gojišča LB smo uporabili:

- 10 g peptona (1 %)
- 5 g kvasnega ekstrakta (0,5 %)
- 5 g natrijevega klorida (NaCl) (0,5 %)
- 5 g glukoze (0,5 %)
- 30 mg kanamicina (kanamicin A, Sigma-Aldrich, ZDA)
- induktor: IPTG (c = 1 mM)

Zaradi slabega nadzora nad izražanjem proteinov v ekspresijskem sevu *E. coli* BL21 (DE3) in nastanku manj toksičnih reakcij tekom rasti kultur smo v gojišče dodali glukozo. Ustrezno osmolarnost medija (pH 7) uravnava dodatek NaCl v gojišče. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem (T = 121 °C, t = 20 min) ter shranili pri T = 4 °C.

### 3.1.4 Dodatek heksahistidinskih podaljškov na skrajni C-konec encimov TmGalA in TmGalA D327G

Gen *galA* iz *Thermotoga maritima* MSB8 (ORFTM1192), vstavljen v plazmid pET24b, je bil osnova za pripravo mutirante TmGalA D327G s pomočjo usmerjene mutageneze (39). Plazmida pET24b/TmGalA in pET24b/TmGalA D327G sta bila pridobljena v laboratoriju Inštituta za proteinsko biokemijo, Neapelj, Italija.

Uporabili smo komercialno dostopen komplet za usmerjeno mutagenezo (QuikChange site-directed mutagenesis, Agilent Technologies, ZDA). Z uporabo kompleta QuikChange smo z metodo PCR v enem koraku odstranili zaključni kodon in premaknili bralni okvir, da smo lahko vpeljali heksahistidinski podaljšek. Z odstranitvijo vseh treh baz zaključnega kodona bi zaradi premika bralnega okvirja encima na C-koncu podaljšali za zaporedje treoninov, namesto da bi jima pripeli želeni heksahistidinski podaljšek. Odstranitev dveh baz zaključnega kodona omogoča pomik heksahistidinskega podaljška v odprt bralni okvir gena (slika 5). Začetna oligonukleotida, uporabljena pri metodi PCR (Sigma-Aldrich, ZDA):

TmGalA-HisTag-FW: 5'-acgaagagggtgagagagaaaagcttgccggc-3'

TmGalA-HisTag-RV: 5'-gccgcaagcttttctctctcaccctcttcgt-3'

**Preglednica IV:** Reakcijska zmes za PCR; povzeto po (40).

| Sestavina                                   | Prostornina   |
|---|---------------|
| reakcijski pufer 10x                        | 5 $\mu$ l     |
| <i>Pfu</i> DNA polimeraza (2,5 U/ $\mu$ l)  | 1 $\mu$ l     |
| zmes vseh štirih deoksinukleotidov          | 1 $\mu$ l     |
| začetni oligonukleotid Fw (100 ng/ $\mu$ l) | 1,25 $\mu$ l  |
| začetni oligonukleotid Rv (100 ng/ $\mu$ l) | 1,25 $\mu$ l  |
| plazmidna DNA                               | 15 ng         |
| Voda  | do 50 $\mu$ l |

### 3.1.5 Izražanje, izolacija, očiščenje in detekcija rekombinantnih encimov

- *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, ZDA)
- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Novagen, Nemčija)
- vektor pET24b(+) (Novagen, Nemčija)
- restrikcijska endonukleaza *DpnI* (New England Biolabs, ZDA)
- *Pfu* polimeraza (Promega, ZDA)
- kromatografski vložki za kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo (Bio-Scale Mini Profinity IMAC cartridges, BIO-RAD Laboratories Inc, ZDA)
- ultra centrifugalni filter (Amicon, Millipore, Nemčija)
- reagenti uporabljeni pri SDS-PAGE elektroforezi (Sigma-Aldrich, ZDA): SDS, Tris, glicin, amonijev persulfat (PSA), Page Blue 83, glicerol za uporabo v molekularni biologiji
- reagenti uporabljeni pri SDS-PAGE elektroforezi (BIO-RAD Laboratories Inc, ZDA): koncentrat barvnih reagentov (Bio-Rad Protein Assay), 40 % raztopina akrilamid/bis-akrilamid 29:1, tetrametiletilendiamin (TEMED), standardi znane molekulske mase (Kaleidoscope, Dual color)
- goveji serumski albumin (Sigma-Aldrich, ZDA)
- koncentrat barvnih reagentov (Bio-Rad Protein Assay), uporabljen pri spektrofotometričnem določanju proteinov z Bradfordovo metodo (BIO-RAD Laboratories Inc, ZDA)
- silikagel 60 F<sub>254</sub> (Sigma-Aldrich, ZDA)
- silikagel 60 Å, AC, 40-63  $\mu$ m (Sigma-Aldrich, ZDA)

## 3.2 NAPRAVE

- ciklični termostat: iCycler, BIO-RAD Laboratories Inc, ZDA
- aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo: Mini Protean II, BIO-RAD Laboratories Inc, ZDA
- HPLC kromatogram: Jasco 2000, Japonska
- HPLC kromatografska amino kolona: NH<sub>2</sub>P50-4E, notranji premer: 4,6 mm, dolžina 250 mm, velikost delcev: 5 μm; Asahipak, Japonska
- HPLC-ELSD detektor: Model 200 ELSD 200, SofTA Corporation, ZDA
- namizna centrifuga: Hettich Mikro 200, Nemčija
- sonikator: Branson sonifier 450, ZDA
- toplotna kopel
- UV-VIS spektrofotometer: UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu, Japonska
- rotacijski izparilnik
- laboratorijski stresalnik: Adolf Kühner AG, Švica
- kromatografski sistem, uporabljen pri IMAC-kromatografiji: Biologic LP System, BIO-RAD Laboratories Inc, ZDA
- liofilizator: Lyph-Lock 12, Labconco, ZDA
- NMR-spektrometer: Bruker AC 500 MHz, ZDA
- avtoklav: Presoclave II 80, J. P. Selecta, Španija

## 3.3 POSTOPKI IN METODE

Encima,  $\alpha$ -galaktozidaza in njegovo mutanto,  $\alpha$ -glikosintazo so pripravili v laboratoriju inštituta Institute of Protein Biochemistry, Neapelj, Italija, pod vodstvom prof. dr. Moracci-ja.

### **3.3.1 Dodatek heksahistidinskih podaljškov na TmGalA in TmGalA D327G z usmerjeno mutagenezo**

Da smo lahko očistili  $\alpha$ -glikozidazo TmGalA in njeno mutanto,  $\alpha$ -galaktosintazo TmGalA D327G, z IMAC-kromatografijo, smo encimoma dodali heksahistidinske podaljške. Gena za oba encima sta bila vstavljena v plazmid pET24b(+), ki vsebuje zaporedje, ki kodira heksahistidinske podaljške blizu C-konca proteina. Z uporabo kompleta QuikChange in sintezni oligonukleotidi smo encimoma TmGalA in TmGalA D327G dodali afinitetne heksahistidinske podaljške. V preglednici V so naštetih pogoji uporabe metode PCR (40).

**Preglednica V:** Pogoji, uporabljeni pri metodi PCR; povzeto po (40).

| Cikel (število ponovitev posameznega cikla) | Temperatura | Čas cikla    |
|---|-------------|--------------|
| Začetna denaturacija (1x)                   | 95 °C       | 2 min        |
| Denaturacija                                | 94 °C       | 0,5 min      |
| Prileganje (16x)                            | 55 °C       | 1 min        |
| Podaljševanje                               | 68 °C       | 1 min za kbp |
| Končno podaljševanje (1x)                   | 68 °C       | 10 min       |
| Konec reakcije (1x)                         | 4 °C        | ∞            |

Po končanju pomnoževanja s PCR metodo smo izhodno metilirano plazmidno DNA razgradili z restrikcijsko endonukleazo *DpnI*. Reakcija je potekala 2 h pri  $T = 37\text{ °C}$ . Pridobljena plazmida smo uporabili za transformacijo celic *E. coli* DH5 $\alpha$ , z namenom povečati števila plazmidov.

### 3.3.2 Transformacija celic *E. coli* DH5 $\alpha$ s plazmidoma pET24b/TmGalA-HisTag in pET24b/TmGalA D327G-HisTag

Kompetentne celice *E. coli* smo pripravili po metodi Inoue in sodelavcev (41) ter 50- $\mu$ l alikvote shranili v 1,5 ml mikrocentrifugirkah pri  $T = -80\text{ °C}$ . Transformacijo celic *E. coli* DH5 $\alpha$  s plazmidoma pET24b/TmGalA-HisTag in pET24b/TmGalA D327G-HisTag smo dosegli z metodo toplotnega šoka (41). Dodali smo jim plazmida (25 ng na 50  $\mu$ l kompetentnih celic) s prostornino, ki ne presega 5 % prostornine kompetentnih celic. Vsebino v mikrocentrifugirkah smo inkubirali na ledeni kopeli ( $T = 4\text{ °C}$ ,  $t = 30\text{ min}$ ). Epruvete smo prestavili na predhodno ogreto vodno kopel ( $T = 42\text{ °C}$ ,  $t = 90\text{ s}$ ). Po 90 s smo epruvete z vsebino ponovni ohladili na ledeni kopeli ( $T = 4\text{ °C}$ ,  $t = 1\text{-}2\text{ min}$ ) ter dodali 800  $\mu$ l gojišča LB. Vsebino smo s pomočjo vodne kopeli ogreli na  $T = 37\text{ °C}$  ter jo prenesli na stresalnik ( $T = 37\text{ °C}$ ,  $t = 2\text{ h}$ , 150 vrt./min). Bakterijsko kulturo smo razmazali na agarna gojišča LB s kanamicinom (30  $\mu$ g/ml) ter jih inkubirali pri  $T = 37\text{ °C}$ . Gen z želeno mutacijo, vstavljen v ekspresijski plazmid, smo analizirali z določitvijo nukleotidnega zaporedja.

### 3.3.3 Izražanje rekombinantnih proteinov v *E. coli*

Sev *E. coli* BL21 (DE3) smo inkubirali 16 h, aerobno, v gojišču LB, pri temperaturi  $37\text{ °C}$ , med stresanjem na stresalniku (180 vrt./min) (11). Za izboljšanje nadzora nad izražanjem proteinov smo v gojišče dodali 0,5 % glukoze. V gojišče smo dodali antibiotik kanamicin ( $c = 30\text{ mg/l}$ ). Za sprožitev transkripcije smo po 5 h inkubacije (0,8 OD<sub>600</sub>) dodali induktor,

sintezni mimetik alolaktoze, IPTG ( $c = 1 \text{ mM}$ ) (39). Po 16 h inkubacije smo vsebino prelili v centrifugirke in jo centrifugirali (14.000 vrt./min). Po 20 min centrifugiranja smo supernatant zavrgli. Usedlino (bakterijske celice) smo suspendirali v 30 ml fosfatnega pufru ( $c = 50 \text{ mM}$ , pH 7). Sledilo je ultrazvočno razbitje celic. Naredili smo deset ponovitev po 25 s z 90 % amplitudo. Za preprečitev pregretja vsebine smo imeli epruvete ves čas na ledeni kopeli. Razbitju celic je sledilo centrifugiranje (10 min, 14.000 vrt./min,  $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), usedlino (nerazbite celice in netopne nečistote) smo zavrgli. Supernatant smo za 30 min postavili v toplotno kopel, napolnjeno s polietilenglikolom ( $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ). S segrevanjem na tako visoko temperaturo večina proteinov *E. coli* precipitira (denaturira), medtem ko je rekombinanten encim pri tej temperaturi stabilen (39). S ponovnim centrifugiranjem (14.000 vrt./min, 30 min) smo odstranili precipitirane proteine (usedlino smo zavrgli). Sledila je izolacija očiščenega ekstrakta s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo.

### 3.3.4 Izolacija rekombinantnih encimov s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo (IMAC)

Izolacijo in čiščenje rekombinantnih encimov z dodanimi heksahistidinskimi podaljški smo izvedli s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo (42). Postopek smo izvedli pri sobni temperaturi. Uporabili smo 5-ml kolone. Sestava kromatografskih pufrov je predstavljena v preglednici VI.

**Preglednica VI:** Sestava pufrov, uporabljenih pri IMAC-kromatografiji (ekvilibracijski pufer, pufer za spiranje in elucijski pufer).

|                              | NaCl<br><b>c (mM)</b> | Na-fosfat (pH 8,00)<br><b>c (mM)</b> | imidazol<br><b>c (mM)</b> |
|------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| <b>Ekvilibracijski pufer</b> | 300                   | 50                                   | 1                         |
| <b>Pufer za spiranje</b>     | 300                   | 50                                   | 10                        |
| <b>Elucijski pufer</b>       | 300                   | 50                                   | 250                       |

Kromatografija je zajemala štiri korake. Najprej smo ekvilibrirali kolono z ekvilibracijskim pufrom. Sledil je nanos vzorca (topna frakcija bakterijskega lizata) s pretokom 0,5 ml/min. Po nanosu vzorca smo nadaljevali s spiranjem kolone s pufrom za spiranje. S tem smo odstranili ostale proteine, ki bi lahko imeli afiniteto do  $\text{Ni}^{2+}$ -ionov. V zadnjem koraku smo kolono sprali z elucijskim pufrom. V tej stopnji smo začeli zbirati frakcije, ki so vsebovale rekombinantna proteina s heksahistidinskimi podaljški (42).



Uporabili smo kolono (5 ml) s kovinskimi ioni ( $\text{Ni}^{2+}$ ), vezanimi na agarozni nosilec. Proteine smo detektirali z UV-detektorjem pri valovni dolžini 280 nm. Frakcije, ki so vsebovale rekombinantne proteine, smo združili, koncentrirali in razsolili z ultrafiltracijo. Čistost zbranih frakcij smo preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE).

### 3.3.5 Preverjanje čistosti eluata s poliakrilamidno gelsko elektroforezo, v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE)

S pomočjo metode SDS-PAGE smo preverili čistost frakcij, zbranih pri kromatografiji IMAC. V preglednici VII sta opisani količini posameznih reagentov, uporabljenih za pripravo zmesi za vlivanje ločevalnega in zbiralnega gela za SDS-PAGE. Nanašalni pufer: 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) (613  $\mu\text{l}$ ), 10 % SDS (773  $\mu\text{l}$ ), glicerol (400  $\mu\text{l}$ ), 2-merkaptoetanol (233  $\mu\text{l}$ ), barvilo bromfenol modro (0,8 mg). Elektroforezni pufer: SDS (30,3 g), Tris (144 g), glicin (10 g),  $\text{dH}_2\text{O}$  (1 L).

**Preglednica VII:** Reagenti, uporabljeni za pripravo zmesi za vlivanje ločevalnega in zbiralnega gela za SDS-PAGE

| 12,5 %-LOČEVALNI GEL              |                  | 3 %-ZBIRALNI GEL                  |                   |
|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------|
| 40 % akrilamid/bis-akrilamid 29:1 | 1,25 ml          | 40 % akrilamid/bis-akrilamid 29:1 | 150 $\mu\text{l}$ |
| 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)           | 1 ml             | 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)           | 1 ml              |
| 10 % amonijev persulfat           | 30 $\mu\text{l}$ | 10 % amonijev persulfat           | 15 $\mu\text{l}$  |
| 10 % SDS                          | 40 $\mu\text{l}$ | 10 % SDS                          | 18 $\mu\text{l}$  |
| TEMED                             | 10 $\mu\text{l}$ | TEMED                             | 5 $\mu\text{l}$   |
| $\text{dH}_2\text{O}$             | 1,69 ml          | $\text{dH}_2\text{O}$             | 822 $\mu\text{l}$ |

V razmerju 1:1 (% v/v) smo zmešali nanašalni pufer ter zbrane frakcije po očiščenju z IMAC kromatografijo (encima TmGalA-HisTag in TmGalA D327G-HisTag), celične lizate pred indukcijo z IPTG, celične lizate po indukciji z IPTG ter proteinski standard (označevalec velikosti). Da smo dosegli popolno denaturacijo proteinov, smo pripravljeno mešanico za 10 min segreli na 96 °C. Pred nanosom na gel smo mešanico 3 min centrifugirali. Na gel smo nanесли celoten volumen zmesi ter elektroforezno kadičko priključili na vir napetosti ( $U = 175 \text{ V}$ ).

Po končani elektroforezi smo gel prenesli v raztopino za barvanje. Uporabili smo komercialno dostopen barvni reagent Page Blue 83 (Sigma-Aldrich) ter pripravili 0,1 % raztopino (metanol : očetna kislina : voda = 5 : 4 : 1). Posodico z gelom in raztopino za barvanje smo stresali pri sobni temperaturi (50 vrt./min). Nato smo raztopino odlili ter dodali raztopino za razbarvanje (identična raztopini za barvanje, a brez dodanega barvnega reagenta Page Blue 83). Stresali smo približno 20 min, nato smo raztopino za razbarvanje dvakrat zamenjali ter ponovili postopek.

### 3.3.6 Kvantitativno določanje koncentracije proteinov s pomočjo metode po Bradfordu

Količino proteinov, prisotnih v vzorcu, smo določili z uporabo metode po Bradfordu (23). Bradfordov reagent smo pripravili v skladu z navodili proizvajalca komercialno dostopnega koncentrata barvnih reagentov (Bio-Rad Protein Assay, BIO-RAD, ZDA).

Pri standardni metodi smo koncentrat (Bradfordov reagent) redčili v razmerju 1:5 z destilirano vodo (1 ml koncentrata in 4 ml destilirane vode). Merili smo absorbanco standardne raztopine govejega serumskega albumina različnih koncentracij (preglednica VIII) v acetatnem pufru (pH 5, c = 50 mM) pri valovni dolžini 595 nm.

**Preglednica VIII:** Priprava vzorcev standarda za kvantitativno določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi.

| Številka standarda | BSA, 750   |                     | Bradfordov reagent (μl) |
|--------------------|------------|---------------------|-------------------------|
|                    | μg/mL (μl) | acetatni pufer (μl) |                         |
| 0                  | 0          | 10                  | 490                     |
| 1                  | 1,25       | 8,75                | 490                     |
| 2                  | 2,5        | 7,5                 | 490                     |
| 3                  | 3,75       | 6,25                | 490                     |
| 4                  | 5          | 5                   | 490                     |
| 5                  | 6,25       | 3,75                | 490                     |
| 6                  | 7,5        | 2,5                 | 490                     |
| 7                  | 8,75       | 1,25                | 490                     |
| 8                  | 10         | 0                   | 490                     |

Po meritvah standarda smo izmerili absorbance vzorcem z encimom. Pripravili smo šest različnih vzorcev, tri vzorce s 3  $\mu\text{l}$  vzorca in tri s 5  $\mu\text{l}$  vzorca (preglednica IX). Pri računanju koncentracije proteina smo vzeli povprečje absorbanc treh vzorcev.

**Preglednica IX:** Priprava vzorcev rekombinantnih proteinov za kvantitativno določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi.

| številka vzorca | vzorec z encimom ( $\mu\text{l}$ ) | acetatni pufer ( $\mu\text{l}$ ) | Bradfordov reagent |
|-----------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| 0               | 0                                  | 10                               | 490                |
| 1               | 3                                  | 7                                | 490                |
| 2               | 5                                  | 5                                | 490                |

S pomočjo izmerjenih absorbanc standarda smo izračunali umeritveno premico.

Koncentracijo encima v vzorcu smo določili po enačbi 1:

$$c = (A - n) / k$$

enačba 1

c ..... koncentracija vzorca (mg/ml)

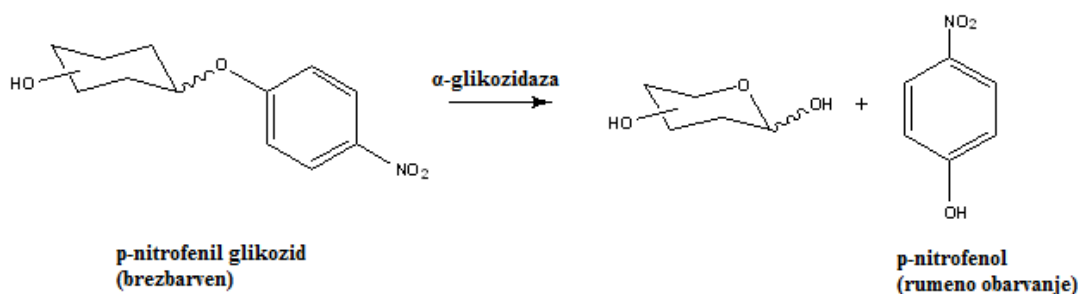
A ..... povprečje izmerjenih absorbanc vzorca

n ..... presek z y osjo

k ..... koeficient umeritvene premice (mg/ml)

### 3.3.7 Določanje hidrolitične aktivnosti $\alpha$ -galaktozidaze (TmGalA in TmGalA-HisTag) iz *Thermotoga maritima*

Hidrolitično aktivnost nemutiranih encimov TmGalA in TmGalA-HisTag smo določili s spektrofotometrično kvantifikacijo sproščenega p-nitrofenola (slika 4).



**Slika 4:** Hidroliza pNF-glikozida z encimom  $\alpha$ -glikozidazo; nastanek rumeno obarvanega p-nitrofenola.

Substrat pNF- $\alpha$ -gal ( $c = 5 \text{ mM}$ ) smo raztopili v acetatnem pufri ( $c = 50 \text{ mM}$ , pH 5) (11). Pripravljeni raztopini (300  $\mu\text{l}$ ) smo pri  $T = 65 \text{ }^\circ\text{C}$  dodali 10  $\mu\text{g}$  encima (TmGalA oz. TmGalA-HisTag). Po 10 min smo z dodatkom 300  $\mu\text{l}$  natrijevega karbonata ( $c = 0,5 \text{ M}$ ) prekinili reakcijo ter raztopini izmerili absorbanco pri valovni dolžini 410 nm (11).

### **3.3.8 Določanje substratne specifičnosti rekombinantne $\alpha$ -galaktozidaze**

#### **(TmGalA-HisTag) iz *Thermotoga maritima***

Za določitev substratne specifičnosti encima smo uporabili različne monosaharidne derivate p-nitrofenola: pNF- $\alpha$ -fuc, pNF- $\beta$ -fuc, pNF- $\alpha$ -gal, pNF- $\beta$ -gal, pNF- $\alpha$ -glc, pNF- $\beta$ -glc, pNF- $\alpha$ -man, pNF- $\beta$ -man, pNF- $\beta$ -GalNAc in pNF- $\beta$ -GlcNAc. Reakcije smo izvedli v enakih reakcijskih pogojih kot pri določanju hidrolitične aktivnosti encimov TmGalA in TmGalA-HisTag (11). Vsak vzorec z različnim substratom smo analizirali trikrat.

### **3.3.9 Reakcije transglikozilacije rekombinantne $\alpha$ -galaktozidaze (TmGalA-HisTag)**

#### **iz *Thermotoga maritima***

Pri nemutiranem encimu, TmGalA-HisTag, smo za reakcije transglikozilacije kot donor uporabili pNF- $\alpha$ -gal ( $c = 14 \text{ mM}$ ) in kot akceptor različne substrate ( $c = 14 \text{ mM}$ ): glc, man, gal, fuc, fru, GalNAc, GlcNAc, pNF- $\alpha$ -fuc, pNF- $\beta$ -fuc, pNF- $\alpha$ -gal, pNF- $\beta$ -gal, pNF- $\alpha$ -glc, pNF- $\beta$ -glc, pNF- $\alpha$ -man, pNF- $\beta$ -man, pNF- $\beta$ -GalNAc in pNF- $\beta$ -GlcNAc (8). Donor pNF- $\alpha$ -gal in različne akceptorje smo raztopili v 250  $\mu\text{l}$  acetatnega pufra ( $c = 50 \text{ mM}$ , pH 5). Reakcijo smo sprožili z dodatkom 10  $\mu\text{g}$  encima TmGalA-HisTag raztopini substratov (11). Potekala je 18 h pri  $T = 65 \text{ }^\circ\text{C}$  (11). Vzorce smo vzeli ob 1 h, 5 h in 18 h, jih desetkrat razredčili z metanolom in analizirali s HPLC.

### **3.3.10 Reakcije transglikozilacije rekombinantne $\alpha$ -galaktosintaze (TmGalA D327G-HisTag) iz *Thermotoga maritima***

Pri mutiranem encimu, TmGalA D327G-HisTag, smo za reakcije transglikozilacije kot donor uporabili  $\beta$ -gal- $\text{N}_3$  ( $c = 14 \text{ mM}$ ) (8) in kot akceptor različne substrate ( $c = 14 \text{ mM}$ ): glc, man, gal, fuc, fru, GalNAc, GlcNAc, pNF- $\alpha$ -fuc, pNF- $\beta$ -fuc, pNF- $\alpha$ -gal, pNF- $\beta$ -gal, pNF- $\beta$ -glc, pNF- $\alpha$ -man, pNF- $\beta$ -man, pNF- $\beta$ -GalNAc in pNF- $\beta$ -GlcNAc. Substrate smo raztopili v 250  $\mu\text{l}$  acetatnega pufra ( $c = 50 \text{ mM}$ , pH 5) (11). Reakcijsko zmes smo pred pričetkom ogreli na  $T = 65 \text{ }^\circ\text{C}$  in reakcijo sprožili z dodatkom 10  $\mu\text{g}$  encima (TmGalA D327G-HisTag) v pripravljeno raztopino substratov (11). Potekala je 18 h pri  $T = 65 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Po 18 urah smo reakcijo ustavili z dodatkom 400  $\mu$ l metanola in vzorce shranili v zamrzovalniku pri  $T = -20$  °C. Produkta smo analizirali s pomočjo metode HPLC. Za detekcijo produktov smo uporabili ELSD-detektor.

### 3.3.11 Določanje strukture produktov gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF in gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF

Za določanje in potrditev strukture produktov smo reakcije transglikozilacije encima TmGalA D327G-HisTag z uporabo substratov pNF- $\alpha$ -glc in pNF- $\alpha$ -man izvedli tudi v večjem volumnu (35 ml) (8). Kot donor smo uporabili  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub>. V preglednici X je razvidno, koliko posameznih sestavin smo dodali reakcijski zmesi.

**Preglednica X:** Sestava reakcijske zmesi in količina posameznih komponent pri transglikozilacijskih reakcijah encima TmGalA D327G-HisTag.

| pNF- $\alpha$ -glc ali pNF- $\alpha$ -man<br>(c = 14 mM) | $\beta$ -gal-N <sub>3</sub><br>(c = 14 mM) | encim (TmGalA<br>D327G-HisTag) | acetatni pufer<br>(c = 50 mM, pH 5) |
|--|--|--------------------------------|-------------------------------------|
| 100 mg   | 68 mg                                      | 3,5 mg                         | 35 ml                               |

Reakcija je potekala 18 h pri  $T = 65$  °C (11). Prekinili smo jo z dodatkom devetkratne količine metanola. Ostanke topila (metanola) smo odstranili z rotacijskim izparilnikom. Vzorec smo zamrznili in ga liofilizirali pri  $T = -80$  °C.

S pomočjo kromatografske kolone smo izolirali obogatene frakcije disaharidov. Mobilno fazo so sestavljali etilacetat, metanol, voda v razmerju 70 : 20 : 10 (8). Stacionarno fazo je predstavljal silikagel z velikostjo por 60 Å in velikostjo delcev 40-63  $\mu$ m. Prisotnost produkta v posameznih frakcijah smo preverjali s TLC-analizo (8). Očiščene frakcije disaharidov smo posušili z rotacijskim izparilnikom.

Opravili smo TLC-analizo (8) komponent reakcije pred in po kolonski kromatografiji. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel 60 F<sub>254</sub> (Sigma-Aldrich). Mobilno fazo so sestavljali etilacetat, metanol, voda v razmerju 70 : 20 : 10. Kot orositveni reagent za detekcijo komponent smo uporabili 10 % žveplovo kislino v etanolu. TLC-kromatogram smo detektirali pod UV svetlobo ( $\lambda = 254$  nm). Strukturo produkta smo določili z NMR-spektroskopijo s snemanjem <sup>1</sup>H-NMR in <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) spektrov (8).

### 3.3.12 Reakcije transglikozilacije rekombinantne $\alpha$ -galaktosintaze

(TmGalA D327G-HisTag) iz *Thermotoga maritima* ob prisotnosti sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov, ter ionskih tekočin

Sledile so transglikozilacijske reakcije  $\alpha$ -galaktosintaze (TmGalA D327G-HisTag) z uporabo donorja  $\beta$ -gal- $N_3$  ( $c = 14$  mM) in akceptorjev ( $c = 14$  mM) pNF- $\alpha$ -gal in pNF- $\alpha$ -man, ob prisotnosti sotopil iz obnovljivih virov ter ionskih tekočin. Razmerje koncentracije akceptorja in donorja je bilo 1:1 (8). Reakcije so potekale pri enakih reakcijskih pogojih, kot je opisano v poglavju 3.3.8. V reakcijah, kjer smo kot sotopilo uporabili topila, pridobljena iz obnovljivih virov, smo dodali toliko topila, da je bila končna koncentracija raztopine 2 M (25, 27). V reakcijah, kjer smo kot sotopilo uporabili ionske tekočine, smo dodali toliko topila, da je koncentracija sotopila znašala 30 % (37). Potek reakcij in produkte reakcij smo spremljali s HPLC-metodo. V preglednicah XI in XII je prikazana sestava reakcijske zmesi ter posameznih komponent transglikozilacijskih reakcij.

**Preglednica XI:** Sestava reakcijske zmesi in posameznih komponent pri transglikozilacijskih reakcijah encima TmGalA D327G-HisTag z uporabo sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov.

|            | <b>koncentracija<br/>raztopine<br/>(M)</b> | <b>volumen<br/>reakcije<br/>(<math>\mu</math>l)</b> | <b>sotopilo<br/>(<math>\mu</math>l)</b> | <b>encim<br/>(<math>\mu</math>l)</b> | <b>raztopina<br/>substratov<br/>(<math>\mu</math>l)</b> | <b>pufer<br/>(<math>\mu</math>l)</b> |
|------------|--|---|---|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| <b>T1</b>  | 2  | 100   | 16,86                                   | 35                                   | 25  | 23,14                                |
| <b>T2</b>  | 2  | 100   | 16,81                                   | 35                                   | 25  | 23,19                                |
| <b>T3</b>  | 2  | 100   | 24,87                                   | 35                                   | 25  | 15,13                                |
| <b>T4</b>  | 2  | 100   | 22,50                                   | 35                                   | 25  | 17,50                                |
| <b>T5</b>  | 2  | 100   | 34,44                                   | 35                                   | 25  | 5,56                                 |
| <b>T6</b>  | 2  | 100   | 38,65                                   | 35                                   | 25  | 1,35                                 |
| <b>T7</b>  | 2  | 100   | 38,57                                   | 35                                   | 25  | 1,43                                 |
| <b>T8</b>  | 2  | 100   | 37,70                                   | 35                                   | 25  | 2,3                                  |
| <b>T9</b>  | 1,90                                       | 100   | 40,42                                   | 35                                   | 25  | 0                                    |
| <b>T10</b> | 1,75                                       | 100   | 40,04                                   | 35                                   | 25  | 0                                    |
| <b>T11</b> | 1,65                                       | 100   | 40,48                                   | 35                                   | 25  | 0                                    |
| <b>T12</b> | 2  | 100   | 22,04                                   | 35                                   | 25  | 17,96                                |
| <b>T13</b> | 2  | 100   | 26,01                                   | 35                                   | 25  | 13,99                                |
| <b>T14</b> | 2  | 100   | 31,65                                   | 35                                   | 25  | 8,35                                 |

**Preglednica XII:** Sestava reakcijske zmesi in posameznih komponent pri transglikozilacijskih reakcijah encima *TmGalA D327G-HisTag* z uporabo ionskih tekočin kot sotopil.

|                        | <b>volumen reakcije</b>    | <b>sotopilo</b>            | <b>encim</b>               | <b>raztopina substratov</b> | <b>puffer</b>              |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                        | <b>(<math>\mu</math>l)</b> | <b>(<math>\mu</math>l)</b> | <b>(<math>\mu</math>l)</b> | <b>(<math>\mu</math>l)</b>  | <b>(<math>\mu</math>l)</b> |
| <b>Ionske tekočine</b> | 100                        | 30                         | 35                         | 25                          | 10                         |

### 3.3.13 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z uporabo ELSD-detektorja (HPLC-ELSD)

Pretok skozi kolono (NH<sub>2</sub>P50-4E, Asahipak) smo uravnali na 0,8 ml/min. Uporabili smo mobilni fazi A in B, ki smo ju mešali v volumskem razmerju A : B = 80 % : 20 %. Kot mobilno fazo A smo uporabili acetonitril, mobilno fazo B je predstavljala voda. Temperatura na koloni je znašala 60 °C ter na ELSD-detektorju 54 °C. Vzorec (20  $\mu$ l) smo za analizo s HPLC-ELSD pripravili tako, da smo ga desetkrat redčili z destilirano vodo ter ga filtrirali. Nanesli smo 25  $\mu$ l tako pripravljene raztopine.

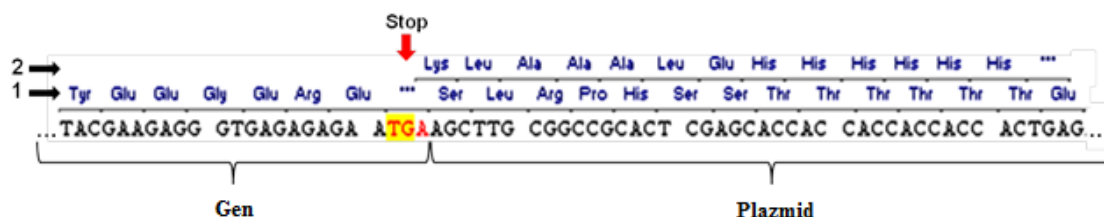
Kromatograme nastalih produktov, disaharidov, smo obdelali z uporabo zunanjih standardov (absolutna kvantifikacija). Sprva smo izmerili kromatograme standardnih raztopin disaharidov (gal- $\alpha$ -(1-6)-glc-pNF in gal- $\alpha$ -(1-6)-man-pNF) znane koncentracije. Pri enakih pogojih smo izmerili signale vzorcem. Določili smo kalibracijsko premico spojine glede na koncentracijo spojine. Podatke smo obdelali s polinomsko regresijo prve stopnje in ocenili vrednosti R<sup>2</sup>.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 DODATEK HEKSAHISTIDINSKIH PODALJŠKOV NA SKRAJNI

#### C-KONEC ENCIMOV TmGalA IN TmGalA D327G

Vektor pET24b(+), kamor sta bila vstavljena gena za encima (8), navzdol od območja z več mesti za kloniranje vsebuje zaporedje nukleotidov, ki kodira heksahistidinski podaljšek. Zaradi prisotnosti zaključnega kodona na 3'-koncu gena se je translacija ustavila pred afinitetno oznako. Z uporabo kompleta QuikChange smo z metodo PCR v enem koraku odstranili zaključni kodon in premaknili bralni okvir, da smo lahko vpeljali heksahistidinski podaljšek. Zaporedje 1 na sliki 5 predstavlja prvotno zaporedje, pri katerem bi z odstranitvijo vseh treh baz zaključnega kodona (na sliki 5 označeno z rdečo), zaradi premika bralnega okvirja encima na C-koncu podaljšali za zaporedje treoninov, namesto da bi jima pripeli želeni heksahistidinski podaljšek. Odstranitev dveh baz zaključnega kodona (na sliki 5 označeno z rumeno) omogoča pomik heksahistidinskega podaljška v odprt bralni okvir gena.



**Slika 5:** Območje DNA, ki ustreza koncu genov encimov TmGalA in TmGalA D327G; zaključni kodon je označen z rdečo barvo. 1) Translacija aminokislinskega zaporedja v primeru izbrisa treh baz zaključnega kodona. 2) Translacija aminokislinskega zaporedja v primeru izbrisa dveh baz zaključnega kodona, označenih z rumeno barvo.

Z usmerjeno mutagenezo smo dobili nova plazmida, pET24b/TmGalA-HisTag in pET24b/TmGalA D327G-HisTag. Celice *E. coli* DH5 $\alpha$  smo transformirali z novima plazmidoma. Posamezno kolonijo iz agarne gojišča smo precepili v tekoče gojišče LB ter iz namnoženih celic izolirali plazmida. Določili smo nukleotidno zaporedje vstavljenih genov, da smo lahko potrdili uspešnost mutacije. V preglednici XIII vidimo poravnavo nukleotidnih zaporedij genov prvotnih encimov TmGalA in TmGalA D327G z encimoma TmGalA-HisTag in TmGalA D327G-HisTag in z začetnim oligonukleotidom (uporabljen pri mutagenezi z metodo PCR). Odstranitev dveh baz zaključnega kodona je bila uspešna.



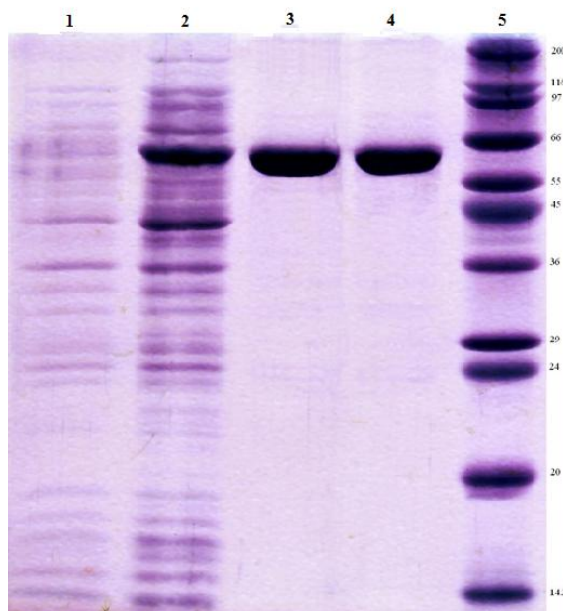
**Preglednica XIII:** Poravnava nukleotidnih zaporedij 3'-koncev genov prvotnih  $\alpha$ -galaktozidaze in  $\alpha$ -glikosintaze, začetnega oligonukleotida in 3'-koncev genov encimov z dodanima heksahistidinskima podaljškoma, *TmGalA-HisTag* in *TmGalA D327G-HisTag*.

|   |   |
|---|---|
| <b><math>\alpha</math>-galaktozidaza</b>        | ACTTCTACGAAGAGGGTGAGAGAGAATGAAGCTTGCGGCCGCACT |
| <b><math>\alpha</math>-galaktosintaza</b>       | ACTTCTACGAAGAGGGTGAGAGAGAATGAAGCTTGCGGCCGCACT |
| <b>začetni oligonukleotid</b>                   | -----ACGAAGAGGGTGAGAGAGAA--AAGCTTGCGGC-----   |
| <b><math>\alpha</math>-galaktozidaza-HisTag</b> | ACTTCTACGAAGAGGGTGAGAGAGAA--AAGCTTGCGGCCGCACT |
| <b><math>\alpha</math>-galaktosintaza-HiTag</b> | ACTTCTACGAAGAGGGTGAGAGAGAA--AAGCTTGCGGCCGCACT |

Celice *E. coli* BL21 (DE3) smo transformirali s plazmidoma pET24b/*TmGalA-HisTag* in pET24b/*TmGalA D327G-HisTag*.

## 4.2 IZRAŽANJE IN IZOLACIJA REKOMBINANTNIH ENCIMOV

Rekombinantne proteine smo izrazili v sevu *E. coli* BL21 (DE3). Po lizi bakterijskih celic in toplotni precipitaciji celičnih proteinov je sledila izolacija rekombinantnega encima z IMAC kromatografijo. Končno smo z ultrafiltracijo koncentrirali in razsolili združene eluirane frakcije. Izražanje rekombinantnih proteinov in čistost končnega produkta smo preverili s SDS-PAGE-elektroforezo.



**Slika 6:** SDS-PAGE elektroforeza za preverjanje čistosti rekombinantnih encimov *TmGalA-HisTag* in *TmGalA D327G-HisTag*. 1: Celični lizat pred indukcijo z IPTG. 2: Celični lizat bakterij po indukciji z IPTG.

3: TmGalA-HisTag po očiščenju z IMAC kromatografijo. 4: TmGalA D327G-HisTag po očiščenju z IMAC kromatografijo. 5: Proteinski standard (označevalec velikosti).

Na sliki 6 pod številko 1 vidimo lise celičnega lizata pred indukcijo z IPTG, kar pomeni, da ni prišlo do izražanja rekombinantnega encima. Pod številko 2 je nanešen celični lizat po indukciji z IPTG. Tokrat opazimo, da je prišlo do izražanja rekombinantnega produkta (lisa v območje 55-66 kDa). Na obe progi smo nanesli neočiščena lizata. Pod številko 3 vidimo le eno liso (55-66 kDa), ki pripada  $\alpha$ -glikozidazi TmGalA-HisTag po očiščenju z IMAC kromatografijo. Na progi 4 je prav tako vidna ena lisa (55-66 kDa), ki pripada  $\alpha$ -glikosintazi TmGalA D327G-HisTag po očiščenju z IMAC kromatografijo. Na progah 1 in 2 opazimo veliko različnih lis, za katere lahko sklepamo, da pripadajo nečistotam (celični proteini). Zaključimo lahko, da sta bila izbira kromatografske metode in postopek očiščenje uspešna.

#### 4.3 KVANTITATIVNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV Z METODO PO BRADFORDU

Koncentracijo proteinov, prisotnih v vzorcu, smo določili z metodo po Bradfordu. S pomočjo izmerjenih absorbanc standarda smo izračunali umeritveno premico.

**Preglednica XIV:** Absorbance (A), znanih koncentracij standardnih raztopin BSA, ki smo jih spektrofotometrično izmerili pri valovni dolžini 595 nm.

| Koncentracija<br>BSA ( $\mu\text{g/ml}$ ) | A     |
|---|-------|
| 0   | 0     |
| 2,5                                       | 0,047 |
| 5   | 0,179 |
| 7,5                                       | 0,210 |
| 10  | 0,251 |
| 12,5                                      | 0,356 |
| 15  | 0,371 |
| 17,5                                      | 0,444 |
| 20  | 0,468 |

Enačba umeritvene premice:  $A = 0,0231 \cdot c + 0,0304$

Determinacijski koeficient,  $R^2 = 0,9656$

S pomočjo enačbe umeritvene premice, smo izračunali koncentracije vzorcev rekombinantnih proteinov, ki so predstavljene v preglednici XV.

**Preglednica XV:** Absorbance (A), vzorcev rekombinantnih proteinov, ki smo jih spektrofotometrično izmerili pri valovni dolžini 595 nm ter s pomočjo umeritvene premice izračunane koncentracije (c) proteinov.

| številka<br>vzorca | A     | C<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|--------------------|-------|---------------------------|
| 0                  | 0     | 0                         |
| 1                  | 0,309 | 12,1                      |
| 2                  | 0,468 | 18,9                      |

#### 4.4 DOLOČANJE HIDROLITIČNE AKTIVNOSTI REKOMBINANTNE $\alpha$ -GLIKOZIDAZE, TmGalA-HisTag

##### 4.4.1 Določanje hidrolitične aktivnosti TmGalA in TmGalA-HisTag z uporabo substrata pNF- $\alpha$ -gal

Po dodatku heksahisitidinskih podaljškov na skrajni C-konec encima smo preverili, da dodatek polihistidinskih podaljškov ni vplival na hidrolitično aktivnost encimov. Po izolaciji in določitvi koncentracije proteinov smo hidrolitično aktivnost encimov TmGalA in TmGalA-HisTag določili s spektrofotometrično kvantifikacijo p-nitrofenola.

Aktivnost nemutiranega encima, TmGalA, je znašala 45,4 U/mg. Aktivnost encima TmGalA-HisTag je bila 44,6 U/mg. Opažena razlika v aktivnosti obeh encimov je v okviru eksperimentalne napake. Sklepamo lahko, da dodatek heksahistidinskega podaljška na skrajni C-konec encima TmGalA ne vpliva na njegovo aktivnost. V predhodno opisanih delih, so poročali o aktivnosti encima, ki je pri enakih pogojih znašala 48,2 U/mg (11).

#### 4.5 DOLOČANJE SUBSTRATNE SPECIFIČNOSTI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE (TmGalA-HisTag) IZ *THERMOTOGA MARITIMA*

Hidrolitično aktivnost encima smo določili s spektrofotometrično kvantifikacijo sproščenega pNF, ki je nastal ob hidrolizi substrata. Vsak vzorec z različnim substratom smo analizirali trikrat, s standardnim odklonom pod 5 % povprečja vzorcev. V preglednici XVI so prikazani rezultati, tj. aktivnost encima TmGalA-HisTag pri uporabi različnih substratov.

**Preglednica XVI:** Prikaz aktivnosti encima *TmGalA-HisTag* iz *Thermotoga maritima* pri uporabi različnih pNF-substratov.

| Substrati            | Aktivnost <i>TmGalA-HisTag</i><br>(U/mg) |
|----------------------|--|
| pNF- $\alpha$ -fuc   | /  |
| pNF- $\beta$ -fuc    | /  |
| pNF- $\alpha$ -gal   | 216,3                                    |
| pNF- $\beta$ -gal    | /  |
| pNF- $\alpha$ -glc   | /  |
| pNF- $\beta$ -glc    | /  |
| pNF- $\alpha$ -man   | /  |
| pNF- $\beta$ -D-man  | /  |
| pNF- $\beta$ -GalNAc | /  |
| pNF- $\beta$ -GlcNAc | /  |

Kot je razvidno iz preglednice XVI, smo encimsko aktivnost zaznali le pri reakciji s substratom pNF- $\alpha$ -gal, znašala je 216,3 U/mg. Izmerjena aktivnost je skladna s predhodno pridobljenimi rezultati (225 U/mg) (11). Potem ko smo potrdili hidrolitično aktivnost encima le ob uporabi substrata pNF- $\alpha$ -gal, smo se odločili preveriti tudi transglikozilacijsko aktivnost encima z različnimi akceptorji in donorjem pNF- $\alpha$ -gal.

#### 4.6 DOLOČANJE TRANSGLIKOZILACIJSKE AKTIVNOSTI

##### REKOMBINANTNE $\alpha$ -GLIKOZIDAZE, *TmGalA-HisTag*,

##### Z UPORABO DONORJA pNF- $\alpha$ -gal IN RAZLIČNIH AKCEPTORJEV

Transglikozilacijsko aktivnost encima *TmGalA-HisTag* smo testirali z uporabo donorja pNF- $\alpha$ -gal in različnih akceptorjev: glc, man, gal, fuc, fru, GalNAc, GlcNAc, pNF- $\alpha$ -fuc, pNF- $\beta$ -fuc, pNF- $\alpha$ -gal, pNF- $\beta$ -gal, pNF- $\alpha$ -glc, pNF- $\beta$ -glc, pNF- $\alpha$ -man, pNF- $\beta$ -man, pNF- $\beta$ -GalNAc in pNF- $\beta$ -GlcNAc. Pri tovrstnih reakcijah, kjer je pNF- $\alpha$ -gal odigral vlogo donorja, nismo zaznali encimske aktivnosti. Do sinteze disaharidov ni prišlo, kar je v skladu s predhodno pridobljenimi rezultati (43).

## 4.7 DOLOČANJE TRANSLIKOZILACIJSKE AKTIVNOSTI

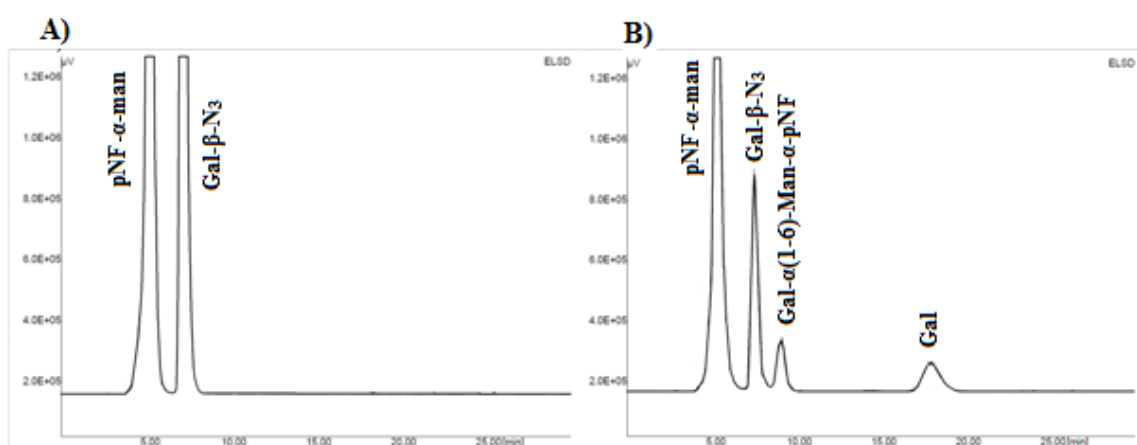
### MUTIRANE $\alpha$ -GLIKOSINTAZE, TmGalA D327G-HisTag,

### Z UPORABO DONORJA $\beta$ -gal-N<sub>3</sub> IN RAZLIČNIH AKCEPTORJEV

Produce transglikozilacijske aktivnosti mutirane glikozidaze,  $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag, smo analizirali s HPLC-metodo in uporabo ELSD-detektorja. Disaharidni produkti so nastali izključno v reakcijah, pri katerih smo kot akceptorja uporabili pNF- $\alpha$ -glc in pNF- $\alpha$ -man (8). Pri reakciji, kjer smo kot akceptor uporabili pNF- $\alpha$ -glc, je nastal produkt gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF (8). Pri reakciji z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -man, je nastal produkt gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF (8).

#### Ovrednotenje uspešnosti transglikozilacijske reakcije

Na sliki 7 je prikazan HPLC-kromatogram transglikozilacijske reakcije encima TmGalA D327G-HisTag z uporabo substratov pNF- $\alpha$ -man in  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub>. Takoj ob dodatku encima k raztopini substratov ( $t = 0$  h) smo vzeli alikvot in ga analizirali s HPLC-metodo in ELSD-detektorjem (slika 7A). Na kromatogramu vidimo dva vrhova, ki pripadata substratoma, pNF- $\alpha$ -man in  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub>. Ob koncu reakcije ( $t = 18$  h) smo vzeli alikvot ter ga ponovno analizirali (slika 7B). Na kromatogramu vidimo 4 vrhove. Prva dva vrhova pripadata substratoma (pNF- $\alpha$ -man in  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub>). Tretji vrh je produkt reakcije, gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF. Četrti vrh predstavlja galaktozo, stranski produkt hidrolize produkta.



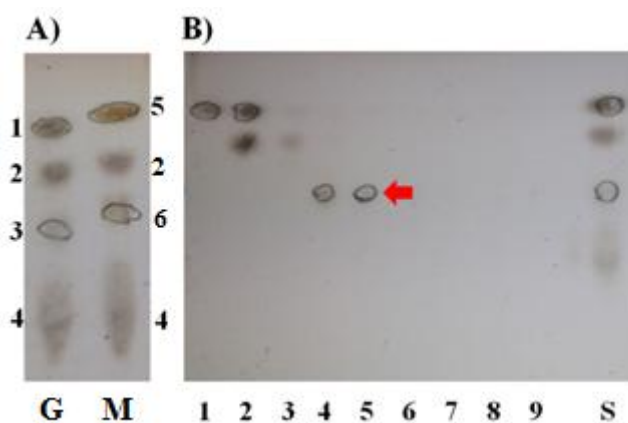
**Slika 7:** HPLC- kromatogram reakcije, katalizirane z encimom TmGalA D327G-HisTag in uporabo substratov  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub> in pNF- $\alpha$  man. A)  $t = 0$  h. B)  $t = 18$  h.

## 4.8 DOLOČANJE STRUKTURE PRODUKTOV gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF IN gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF

Ker smo le pri uporabi akceptorjev pNF- $\alpha$ -glc in pNF- $\alpha$ -man zaznali nastanek produkta, smo reakcijo izvedli v večjem volumnu, 35 ml. Izvedli smo jo z namenom določitve struktur produktov. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (8).

### 4.8.1 TLC-analiza produktov gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF in gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF

Na sliki 8 sta prikazana TLC-kromatograma reakcije transglikozilacije z encimom TmGalA D327G-HisTag pred (slika 8A) in po (slika 8B) izolaciji s kolonsko kromatografijo. Lise predstavljajo komponente pod UV svetlobo (8). Na sliki 8A prvi stolpec (označen s črko G) predstavlja sintezo gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF z uporabo substratov  $\beta$ -gal- $N_3$  in pNF- $\alpha$ -glc, lisa 1 predstavlja pNF- $\alpha$ -glc, lisa 2  $\beta$ -gal- $N_3$ , lisa 3 gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF in lisa 4, produkt hidrolize, galaktozo. V drugem stolpcu, označenim s črko M, smo z uporabo substratov  $\beta$ -gal- $N_3$  in pNF- $\alpha$ -man sintetizirali gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF. Lisa 5 predstavlja akceptor pNF- $\alpha$ -man, lisa 2 donor  $\beta$ -gal- $N_3$ , lisa 6 produkt gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF in lisa 4 produkt hidrolitične reakcije, galaktozo. Na sliki 8B, je produkt, gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF označen z rdečo puščico. Vidimo, da je produkt prisoten v frakcijah 4 in 5.



**Slika 8:** TLC-kromatogram sinteze gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF in gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF z encimom TmGalA D327G-HisTag z uporabo akceptorjev, gal- $\alpha$ -pNF (G) in man- $\alpha$ -pNF (M) ter donorja,  $\beta$ -gal- $N_3$ . A: TLC-kromatogram transglikozilacijske reakcije pred očiščenjem s kolonsko kromatografijo. Številka 1 predstavlja pNF- $\alpha$ -glc, 2  $\beta$ -gal- $N_3$ , 3 gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF; 4 galaktozo; 5 pNF- $\alpha$ -man in 6 gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF. B: TLC-kromatogram posameznih frakcij (1-9) sinteze gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF, zbranih med čiščenjem s kolonsko kromatografijo. Produkt je prisoten v frakcijah 4 in 5.

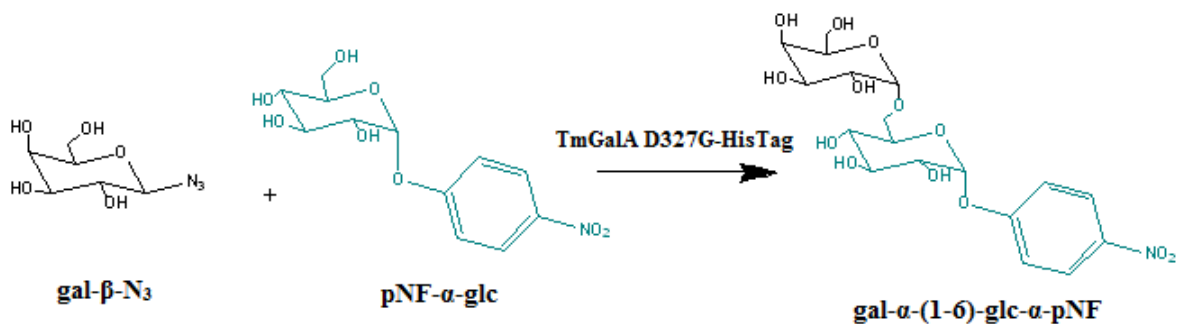
#### 4.8.2 Potrditev strukture produktov z NMR-spektroskopijo

Spektri, pridobljeni z NMR-spektroskopijo, so pokazali, da sta produkta transglikozilacijskih reakcij z encimom TmGalA D327G-HisTag, pri kateri smo kot donor uporabili  $\beta$ -gal- $N_3$  in kot akceptor pNF- $\alpha$ -glc oziroma pNF- $\alpha$ -man, vodila do nastanka produktov gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF oziroma gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF. Dobljeni  $^1\text{H}$  NMR in  $^{13}\text{C}$  spektri so se ujemali s predhodno določenimi referenčnimi spektri (8).

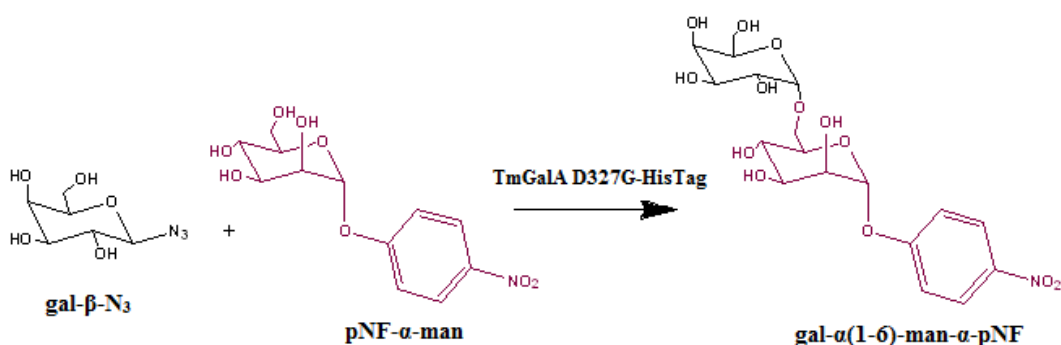
**gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF.**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  5,87 (d, 1H,  $J_{\text{H-1,H-2}} = 3,6$  Hz, H-1A), 4,88 (d, 1H,  $J_{\text{H-1,H-2}} = 3,7$  Hz, H-1B), 3,95 (t, 1H, H-3A), 3,93 (d, 1H, H-4B), 3,90 (t, 1H, H-5A), 3,87 (d, 1H, H-6aA), 3,87 (d, 1H, H-5B), 3,82 (dd, 1H, H-2A), 3,75 (d, 1H, H-6aB), 3,74 (d, 1H, H-2B), 3,72 (d, 1H, H-6bB), 3,71 (d, 1H, H-6bA), 3,58 (dd, 1H, H-3B), 3,56 (t, 1H, H-4A);  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  99,2 (C-1B), 97,7 (C-1A), 74,5 (C-3A), 73,2 (C-5B), 72,2 (C-2A), 72,2 (C-5A), 70,8 (C-4A), 70,8 (C-3B), 70,5 (C-4B), 69,6 (C-2B), 66,9 (C-6A), 62,4 (C-6B).

**gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF.**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  5,87 (bs, 1H, H-1A), 4,95 (d, 1H,  $J_{\text{H-1,H-2}} = 3,8$  Hz, H-1B), 4,30 (dd, 1H, H-2A), 4,14 (dd, 1H, H-3A), 4,00 (d, 1H, H-4B), 3,98 (t, 1H, H-5A), 3,97 (dd, 1H, H-6aA), 3,90 (t, 1H, H-5B), 3,89 (t, 1H, H-4A), 3,82 (dd, 1H, H-6aB), 3,81 (dd, 1H, H-2B), 3,78 (dd, 1H, H-6bB), 3,74 (dd, 1H, H-6bA), 3,66 (dd, 1H, H-3B);  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  99,3 (C-1B), 99,2 (C-1A), 73,8 (C-5B), 72,3 (C-5A), 72,0 (C-3A), 71,1 (C-2A), 71,0 (C-3B), 70,6 (C-4B), 69,8 (C-2B), 68,0 (C-4A), 67,0 (C-6A), 62,4 (C-6B).

Na spodnjih dveh slikah je prikazana reakcija transglikozilacije  $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag z uporabo donorja  $\beta$ -gal- $N_3$  in akceptorjev pNF- $\alpha$ -glc (slika 9) ali pNF- $\alpha$ -man (slika 10).



Slika 9: Reakcija sinteze gal- $\alpha$ -(1-6)-glc- $\alpha$ -pNF z  $\alpha$ -glikosintazo TmGalA D327G-HisTag. Povzeto po (8).



Slika 10: Reakcija sinteze gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF z  $\alpha$ -glikosintazo TmGalA D327G-HisTag. Povzeto po (8).

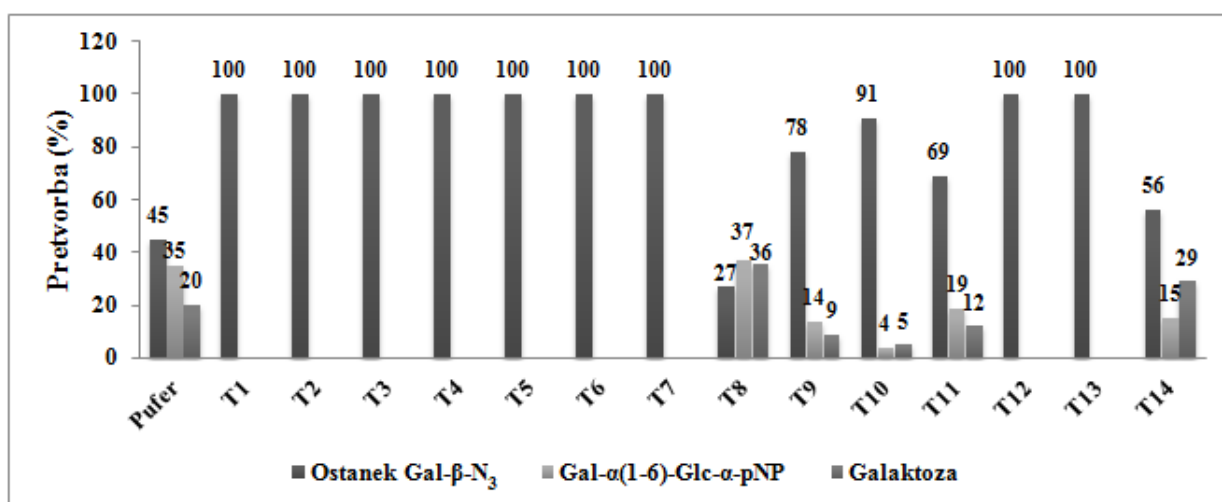
#### 4.9 TRANSGLIKOZILACIJSKA AKTIVNOST ENCIMA TmGalA D327G-HisTag OB PRISOTNOSTI TOPIL, PRIDOBLJENIH IZ OBNOVLJIVIH VIROV

Da smo lahko preračunali učinek sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov, na transglikozilacijsko aktivnost encima TmGalA D327G-HisTag, smo uporabili topila iz treh različnih skupin: topila, pridobljena iz glicerola s ciklično (T1-T3) ali odprto verigo (T4-T11), in derivate 3-N,N-dimetilamida (T12-T14). Izvedli smo tudi kontrolno reakcijo, kjer smo kot topilo uporabili le acetatni pufer brez dodanih sotopil. Koncentracija topil, pridobljenih iz obnovljivih virov, je znašala 2 M, kar je optimalna koncentracija takšnih topil za encimske reakcije, katalizirane z glikosintazami (27). Reakcije smo nadzorovali in analizirali s HPLC-metodo.



#### 4.9.1 Transglikozilacijske reakcije $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -glc ob prisotnosti topil iz obnovljivih virov

Pri kontrolni reakciji je prišlo do 55 % pretvorbe začetnega substrata,  $\beta$ -gal- $N_3$ , 45 % substrata je ostalo nezreagirane. Izkoristek reakcije, sinteze produkta gal- $\alpha$ -(1-6)-glc- $\alpha$ -pNF, je znašal 35 %, medtem ko je nastalo 20 % hidrolitičnega produkta, galaktoze. Pridobljeni rezultati za vsako soto pilo posebej (T1-T14) in uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -glc so prikazani na sliki 11.



**Slika 11:** Izkoristki transglikozilacijskih reakcij, kataliziranih z encimom TmGalA D327G-HisTag, uporabo substratov  $\beta$ -gal- $N_3$  in pNF- $\alpha$ -glc, ob prisotnosti soto pil, pridobljenih iz obnovljivih virov ( $c = 2 M$ ).

Pri reakcijah z dodatkom soto pil od T1 do T7 ter T12 in T13 ni prišlo do pretvorbe substrata  $\beta$ -gal- $N_3$  in do sinteze produkta gal- $\alpha$ -(1-6)-glc- $\alpha$ -pNF. Sklepamo lahko, da je prišlo do popolne izgube aktivnosti encima oziroma inhibicije encima.

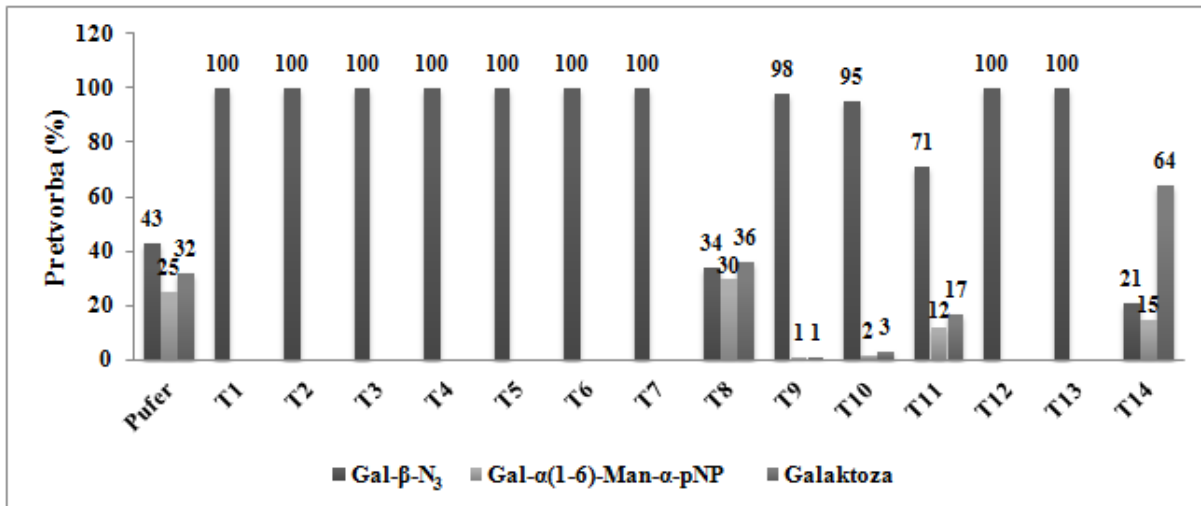
Soto pila T9, T10, T11 in T14 niso popolnoma inhibirala encima, prišlo je do sinteze produkta, vendar so izkoristki reakcij slabši kot pri kontrolni reakciji. Pri topilu T9 je nastalo 14 %, pri topilu T10 4 %, pri topilu T11 19 % in pri topilu T14 15 % produkta gal- $\alpha$ -(1-6)-glc- $\alpha$ -pNF.

Z uporabo soto pila T8 smo zaznali največjo (73 %) pretvorbo substrata  $\beta$ -gal- $N_3$ . Opazimo lahko, da je reakcija potekala v smeri hidrolize, prisotnost galaktoze v produktu je znašala 36 %. Pri reakciji, pri kateri smo kot topilo uporabili le acetatni pufer, je bila prisotnost galaktoze v reakcijski zmesi 20 %, medtem ko je delež produktov pri obeh reakcijah dokaj podoben, 35 % pri kontrolni reakciji in 37 % pri uporabi soto pila T8.

Topili T8 in T9 imata v strukturi dve trifluorometilni (CF<sub>3</sub>) skupini. Sklepamo, da imata lahko ti dve skupini pomemben učinek na transglikozilacijsko aktivnost encima. Prisotnost samo ene CF<sub>3</sub>-skupine na aktivnost encima nima učinka, kar opazimo pri topilu T7. Z encimom β-galaktozidazo iz *E.coli* je bilo dokazano, da prisotnost več kot dveh CF<sub>3</sub>-skupin pri topilih ni vplivala na transglikozilacijsko aktivnost encima (27). Na aktivnost encima bi lahko vplivala topnost sotopila v vodi. Topila z dolgimi fluoriranimi verigami se ne mešajo z vodo, kar pomeni tvorbo dveh ločenih faz (vodne in organske faze), s katerimi bi lahko razložili različno aktivnost encima (27).

#### 4.9.2 Transglikozilacijske reakcije α-glikosintaze TmGalA D327G-HisTag z uporabo akceptorja pNF-α-man ob prisotnosti topil iz obnovljivih virov

Pri kontrolni reakciji je prišlo do 57 % pretvorbe substrata, β-gal-N<sub>3</sub>, 43 % substrata je ostalo nezreagirane. Izkoristek reakcije, sinteze produkta gal-α(1-6)-man-α-pNF, je znašal 25 %. Nastalo je 32 % hidrolitičnega produkta, galaktoze. Rezultati, pridobljeni z uporabo akceptorja pNF-α-man in sotopil od T1 do T14, pridobljenih iz obnovljivih virov, so predstavljeni na sliki 12.



**Slika 12:** Izkoristki transglikozilacijskih reakcij, kataliziranih z encimom TmGalA D327G-HisTag, uporabo substratov β-gal-N<sub>3</sub> in pNF-α-man, ob prisotnosti sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov (c = 2 M).

Pri sintezi gal-α(1-6)-man-α-pNF ob prisotnosti sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov, kjer smo kot akceptor uporabili pNF-α-man, smo dobili zelo podobne rezultate kot pri reakciji z akceptorjem pNF-α-glc.

Topila od T1 do T7, T9, T10, T12 in T13 so popolnoma oziroma skoraj popolnoma inhibirala encim. Do sinteze produkta ni prišlo. Substrat,  $\beta$ -gal- $N_3$  je ostal popolnoma oziroma skoraj popolnoma (pri sotpilu T9 98 % in pri sotpilu T10 95 %) nezreagiran.

Pri uporabi sotpila T11 smo zaznali nastanek produkta (12 %), vendar je pri reakciji prišlo do slabše pretvorbe substrata  $\beta$ -gal- $N_3$  (29 %) v primerjavi s kontrolno reakcijo (57 %).

Pri reakciji s sotpilom T14 je prišlo do slabšega izkoristka reakcije (15 %) v primerjavi z uporabo samega pufra (25 %). Prav tako je reakcija potekala v smeri hidrolize, na kar nakazuje prisotnost 64 % galaktoze v reakcijski zmesi.

Najboljše rezultate pri sintezi disaharidov smo pridobili pri uporabi sotpila T8. Pretvorba substrata (34 %) je bila slabša v primerjavi s kontrolno reakcijo (43 %), prav tako je reakcija v večji meri potekala v smeri hidrolize (36 %) kot pri kontrolni reakciji (32 %). Izkoristek reakcije je bil pri uporabi topila T8 (30 %) za 5 % boljši v primerjavi z uporabo samega pufra (25 %).

Glede na zgoraj prikazane rezultate, lahko sklepamo, da uporabljena topila, pridobljena iz obnovljivih virov, niso primerna za uporabo kot sotpila pri sintezi disaharidov, katalizirani s TmGalA D327G-HisTag, z uporabo donorja  $\beta$ -gal- $N_3$  in akceptorjev pNF- $\alpha$ -glc oziroma pNF- $\alpha$ -man. Jasne povezave med strukturo in fizikalnimi parametri (preglednica II) derivatov glicerola in derivatov N,N-dietilamida ter povečano sintezno aktivnostjo ne moremo določiti (27). Večina topil je zavirala aktivnost encima. Najboljši izkoristek reakcije je bil dosežen z uporabo sotpila T8 pri sintezi gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF. Pretvorba začetnega substrata je bila boljša kot pri kontrolni reakciji, vendar je pri uporabi sotpila T8 reakcija v večji meri potekala v smeri hidrolize.

## 4.10 TRANSGLIKOZILACIJSKA AKTIVNOST ENCIMA

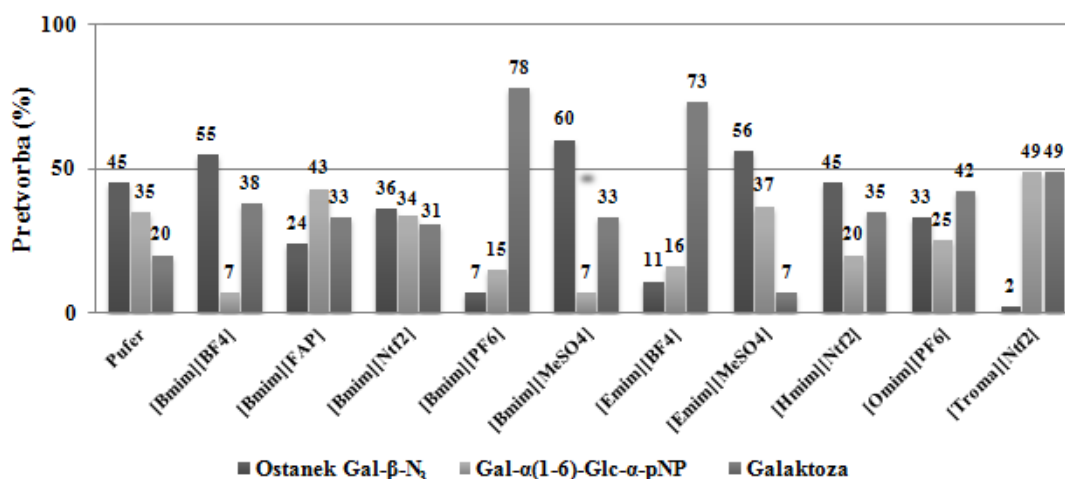
### TmGalA D327G-HisTag OB PRISOTNOSTI IONSKIH TEKOČIN

Ionske tekočine smo uporabili kot sotopila pri transglikozilacijski reakciji, sintezi disaharidov, katalizirani z encimom TmGalA D327G-HisTag. Preiskovali smo vpliv različnih ionskih tekočin, opisanih v poglavju Metode in materiali, na izkoristek reakcije. V predhodnih delih so poročali o ionskih tekočinah kot sotopilih, ki omogočajo usmerjeno regioselektivnost, tj. nastanek le ene oblike izomera (44). Izvedli smo tudi kontrolno reakcijo, kjer smo kot topilo uporabili le acetatni pufer. Koncentracija ionskih tekočin v reakcijski zmesi je znašala 30 % končne koncentracije raztopine, kar je optimalna koncentracija takšnih topil za encimske reakcije, katalizirane z glikozidazami (37). Reakcije smo nadzorovali in analizirali s pomočjo HPLC-metode. Rezultati transglikozilacijskih reakcij z uporabo različnih ionskih tekočin so prikazani na slikah 13 in 14.

#### 4.10.1 Transglikozilacijske reakcije $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag

##### z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -glc ob prisotnosti ionskih tekočin

Pri kontrolni reakciji je prišlo do 55 % pretvorbe substrata  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub>, 45 % substrata je ostalo nezreagirane. Izkoristek reakcije, sinteze produkta gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF, je znašal 35 %. Nastalo je 20 % produkta hidrolize, galaktoze. Rezultati, pridobljeni z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -glc ob prisotnosti ionskih tekočin, so prikazani na sliki 13.



**Slika 13:** Izkoristki transglikozilacijskih reakcij, kataliziranih z encimom *TmGalA D327G-HisTag*, uporabo substratov  $\beta$ -gal- $N_3$  in pNF- $\alpha$ -glc ob prisotnosti ionskih tekočin.

Izkoristki reakcij pri sintezi gal- $\alpha$ -(1-6)-glc- $\alpha$ -pNF so znašali pri uporabi sotopila [Bmim] [BF<sub>4</sub>] 7 %, pri [Bmim] [PF<sub>6</sub>] 15 %, pri [Bmim] [MeSO<sub>4</sub>] 7 %, pri [Emim] [BF<sub>4</sub>] 16 %, pri [Hmim] [NTF<sub>2</sub>] 20 % in pri topilu [Omim] [PF<sub>6</sub>] 25 %. Opazili smo slabše izkoristke transglikozilacijske reakcije (nižje deleže nastanka produkta) v primerjavi s kontrolno reakcijo.

Pretvorba substrata  $\beta$ -gal- $N_3$  je bila v primeru uporabe sotopila [Bmim] [PF<sub>6</sub>] (93 %) in [Emim] [BF<sub>4</sub>] (89 %) boljša v primerjavi s kontrolno reakcijo (55 %). Delež galaktoze je znašal ob uporabi topila [Bmim] [PF<sub>6</sub>] 78 % in [Emim] [BF<sub>4</sub>] 73 %. Obe reakciji sta usmerjeni v hidrolizo in ne v smer sinteze produkta gal- $\alpha$ -(1-6)-glc- $\alpha$ -pNF.

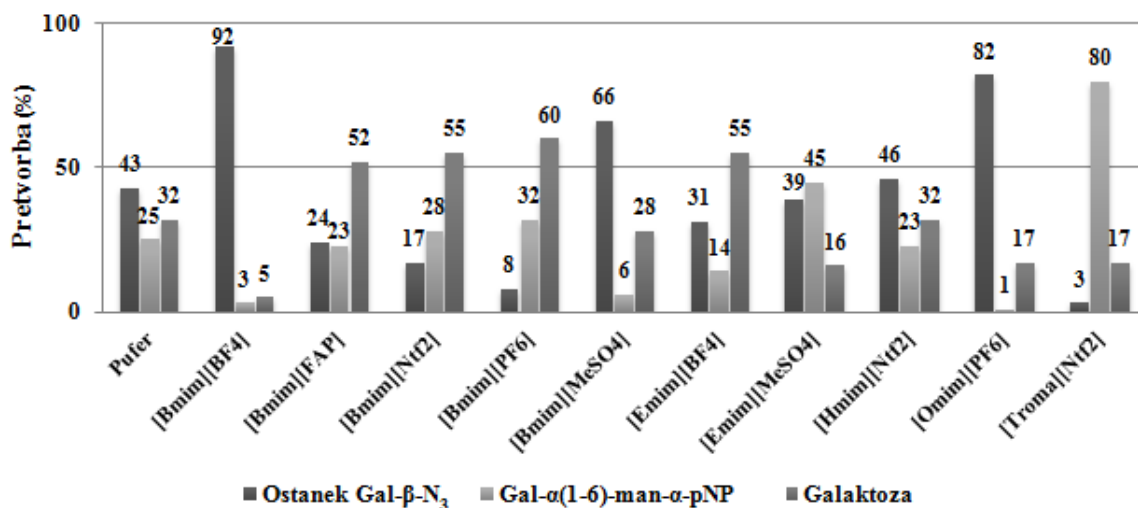
Pri sintezi disaharida z uporabo topila [Bmim] [NTF<sub>2</sub>] (34 %) in [Emim] [MeSO<sub>4</sub>] (37 %) sta bila izkoristka reakcij podobna kot pri uporabi acetatnega pufra samega (35 %). Večji delež nastalega produkta v primerjavi s kontrolno reakcijo (35 %) smo opazili pri reakciji s topilom [Bmim] [FAP] (43 %).

Najboljše rezultate smo dosegli z uporabo ionske tekočine [Troma] [NTF<sub>2</sub>], saj je prišlo do skoraj popolne (98 %) pretvorbe substrata  $\beta$ -gal- $N_3$ . Izkoristek reakcije, je znašal 49 %, kar je tudi najvišji izkoristek v primerjavi z ostalimi ionskimi tekočinami in kontrolno reakcijo. Enak delež reakcije, 49 %, se je usmeril v hidrolizo, nastanek galaktoze.

#### 4.10.2 Transglikozilacijske reakcije $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag

##### z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -man ob prisotnosti ionskih tekočin

Pri kontrolni reakciji je prišlo do 57 % pretvorbe substrata,  $\beta$ -gal- $N_3$ , 43 % substrata je ostalo nezreagirane. Izkoristek reakcije, sinteza produkta gal- $\alpha(1-6)$ -man- $\alpha$ -pNF, je znašal 25 %. Nastalo je 32 % produkta hidrolize, galaktoze. Rezultati, pridobljeni z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -man ob prisotnosti ionskih tekočin, so prikazani na sliki 14.



Slika 14: Izkoristki transglikozilacijskih reakcij, kataliziranih z encimom TmGalA D327G-HisTag, uporabo substratov  $\beta$ -gal- $N_3$  in pNF- $\alpha$ -man ob prisotnosti ionskih tekočin.

Pri sintezi gal- $\alpha(1-6)$ -man- $\alpha$ -pNF lahko pri toplih [Bmim] [BF<sub>4</sub>], [Bmim] [MeSO<sub>4</sub>] in [Omim] [PF<sub>6</sub>] sklepamo na inhibicijo encima TmGalA D327G-HisTag, kajti večina substrata  $\beta$ -gal- $N_3$  je ostala nezreagirana, pri uporabi sopolila [Bmim] [BF<sub>4</sub>] 92 %, pri [Bmim] [MeSO<sub>4</sub>] 66 % in pri [Omim] [PF<sub>6</sub>] 82 %.

Izkoristki reakcij so bili podobni izkoristku kontrolne reakcije (25 %) v primeru uporabe toplil [Bmim] [FAP] (23 %), [Bmim] [NTF<sub>2</sub>] (28 %), [Bmim] [PF<sub>6</sub>] (32 %) in [Hmim] [NTF<sub>2</sub>] (23 %). Vendar pa je bila reakcija v vseh štirih primerih usmerjena v hidrolizo, nastanek galaktoze. Pri [Bmim] [FAP] je znašal delež galaktoze v reakcijski zmesi 52 %, pri [Bmim] [NTF<sub>2</sub>] 55 %, pri [Bmim] [PF<sub>6</sub>] 60 % in pri [Hmim] [NTF<sub>2</sub>] 32 %.

Pri sintezi s sopolilom [Emim] [BF<sub>4</sub>] smo opazili, da se je reakcija usmerila v smer hidrolize (nastanek galaktoze (55 %)), produkta gal- $\alpha(1-6)$ -man- $\alpha$ -pNF je nastalo 14 %.

V primerjavi z reakcijo v acetatnem pufu samem (25 %), je boljši izkoristek reakcije dosegla uporaba topila [Emim] [MeSO<sub>4</sub>]. Izkoristek reakcije je v tem primeru znašal 45 %. Prav tako je prišlo do nižje hidrolize produkta (16 %) v primerjavi s kontrolno reakcijo (32 %). Pretvorba substrata  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub> je bila v obeh reakcijah podobna, pri uporabi [Emim] [MeSO<sub>4</sub>] je znašala 61 %, pri pufu samem pa 57 %.

Prav tako kot pri reakciji, kjer smo kot akceptor uporabili pNF- $\alpha$ -glc, je najboljše rezultate pokazala uporaba sotpila [Troma] [NTF<sub>2</sub>]. Delež nastalega produkta gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF je znašal 80 %. V reakcijski zmesi je ostalo le 3 % nezreagiranega substrata  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub>. V primerjavi s kontrolno reakcijo (32 %) je bila tudi hidroliza produkta nižja (17 %).

## 5. SKLEPI

V sklopu magistrskega dela smo izrazili in izolirali rekombinantno  $\alpha$ -glikosintazo TmGalA D327G iz termofilne bakterije *Thermotoga maritima*. Analizirali smo hidrolitično aktivnost nemutiranega encima,  $\alpha$ -glikozidaze TmGalA-HisTag. Določili smo substratno specifičnost TmGalA D327G ter encim uporabili v encimski sintezi disaharidov z uporabo sotopil, pridobljenih iz obnovljivih virov (derivati glicerola in N,N-dimetilamida) ter ionskih tekočin. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo:

- ❖ Dodatek heksahistidinskih podaljškov na skrajna C-konca encimov  $\alpha$ -glikozidaze TmGalA in  $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G z metodo PCR je bil uspešen, kar smo potrdili z določitvijo nukleotidnih zaporedij 3'-koncev genov.
- ❖ Uspešnost izolacije in izražanja rekombinantnih encimov TmGalA-HisTag in TmGalA D327G-HisTag smo preverili in potrdili s pomočjo SDS-PAGE elektroforeze.
- ❖ Dodatek heksahistidinskih podaljškov na skrajni C-konec encima  $\alpha$ -glikozidaze TmGalA ni vplival na njegovo hidrolitično aktivnost. Razlika v aktivnosti nemutiranega encima TmGalA ter TmGalA-HisTag je v okviru eksperimentalne napake. Posledično sklepamo, da dodatek heksahistidinskega podaljška ne vpliva na aktivnost mutirane  $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G.
- ❖  $\alpha$ -glikozidaza TmGalA-HisTag je zmožna hidrolizirati  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 vez le pri uporabi substrata p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida (pNF- $\alpha$ -gal).
- ❖ Pri transglikozilacijskih reakcijah, kjer smo kot donor uporabili pNF- $\alpha$ -gal, kot akceptorje pa različne sladkorje in pNF-substrate nismo zaznali encimske aktivnosti  $\alpha$ -glikozidaze TmGalA-HisTag. Do sinteze disaharidov ni prišlo.
- ❖ Pri določanju substratne specifičnosti  $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G-HisTag z uporabo donorja  $\beta$ -gal-N<sub>3</sub> je prišlo do sinteze disaharidov le pri uporabi akceptorjev pNP- $\alpha$ -glc in pNP- $\alpha$ -man. Nastala sta produkta gal- $\alpha$ (1-6)-glc- $\alpha$ -pNF ter gal- $\alpha$ (1-6)-man- $\alpha$ -pNF, kar smo potrdili tudi z NMR-spektroskopijo.
- ❖ Pri transglikozilacijskih reakcijah, kjer smo kot sotopila uporabili topila, pridobljena iz obnovljivih virov (derivati glicerola in 3-N,N-dimetilamida) smo prišli do podobnih rezultatov tako z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -glc kot z akceptorjem pNF- $\alpha$ -man. V primerjavi s kontrolno reakcijo, kjer smo uporabili le acetatni pufer,



je le pri uporabi sotpila 1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoksi) propan-2-ol prišlo do večje pretvorbe začetnega substrata  $\beta$ -gal- $N_3$ . Izkoristek reakcije je bil pri uporabi sotpila nekoliko večji, vendar pa je reakcija v večji meri potekala v smeri hidrolize (večji delež nastalega hidrolitičnega produkta, galaktoze) kot pri uporabi samega acetatnega pufra. Zaključimo lahko, da z uporabo topil, pridobljenih iz obnovljivih virov, ne izboljšamo transglikozilacijske aktivnosti encima TmGalA D327G.

- ❖ Pri transglikozilacijskih reakcijah, kjer smo kot sotpila uporabili ionske tekočine, smo z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -glc ter s sotpilom [Troma] [NTF<sub>2</sub>] dosegli najboljši izkoristek reakcije v primerjavi z acetatnim pufrom samim. Dosegli smo skoraj popolno pretvorbo začetnega substrata ( $\beta$ -gal- $N_3$ ). Vendar pa se je reakcija v enaki meri usmerila tako v sintezo disaharida kot v hidrolizo produkta.
- ❖ Pri transglikozilacijskih reakcijah, kjer smo kot sotpila uporabili ionske tekočine, smo z uporabo akceptorja pNF- $\alpha$ -man ter s sotpilom [Troma] [NTF<sub>2</sub>] dosegli najboljši izkoristek reakcije v primerjavi z acetatnim pufrom samim. Dosegli smo skoraj popolno pretvorbo začetnega substrata ( $\beta$ -gal- $N_3$ ). Reakcija je potekala v smeri sinteze disaharida. Nastalo je tudi manj hidrolitičnega produkta v primerjavi z acetatnim pufrom samim. Zaključimo lahko, da lahko izboljšamo transglikozilacijske lastnosti  $\alpha$ -glikosintaze TmGalA D327G z uporabo 30 % sotpila [Troma] [NTF<sub>2</sub>], akceptorja pNF- $\alpha$ -man in donorja  $\beta$ -gal- $N_3$  v razmerju koncentracij 1:1.

## 6. LITERATURA

1. Boyer R: Ogljikovi hidrati: zgradba in biološka vloga. V: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 180–205
2. Hakomori S: Carbohydrate-to-carbohydrate interaction in basic cell biology: a brief overview. *Arch. of Biochem. Biophys.* 2004; 426: 173–181
3. Dwek RA: Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* 1996; 96: 683–720
4. Zopf D, Roth S: Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* 1996; 347: 1017–1021
5. Perugino G, Trinicone A., Rossi M., Moracci M: Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *TRENDS Biotechnol.* 2004; 22 (1): 31–37
6. Hancock SM, Vaughan MD, Withers SG: Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006; 10: 509–519
7. Vetere A, Miletich M, Bosco M, Paoletti S: Regiospecific glycosidase-assisted synthesis of lacto-N-biose I (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) and 3'-sialyl-lacto-N-biose I (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc). *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 942–949
8. Cobucci-Ponzano B, Zorzetti C, Strazzulli A, Carillo S, Bedini E, Corsaro MM, Comfort DA, Kelly RM, Rossi M, Moracci M: A novel  $\alpha$ -D-galactosynthase from *Thermotoga maritima* converts  $\beta$ -D-galactopyrnosyl azide to  $\alpha$ -galacto-oligosaccharides. *Glycobiology* 2011; 21 (4): 448–456
9. Rye CS, Withers SG: Glycosidase mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000; 4: 573–580
10. Mackenzie LF, Wang Q, Antony R, Warren J, Withers SG: Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1998; 120 (22): 5583–5584
11. Miller ES, Kimberley Jr, Parker N, Liebl W, Lam D, Callen W, Snead MA, Mathur EJ, Short JM, Kelly RM:  $\alpha$ -D-Galactosidases from *Thermotoga* species. *Methods Enzymol.* 2001; 330: 246–260
12. Comfort DA, Bobrov KS, Ivanen DR, Shabalin KA, Harris JM, Kulminskaya AA, Brumer H, Kelly RM: Biochemical analysis of *Thermotoga maritima* GH36  $\alpha$ -galactosidase (TmGalA) confirms the mechanistic commonality of clan GH-D glycoside hydrolases. *Biochem.* 2007; 46: 3319–3330

13. El-Abassi R, Singhal D, England JD: Fabry's disease. *J. Neurol. Sci.* 2014; 344: 5–19
14. Vujkovic B, Šabovič M, Verovnik F, Benko D, Cokan A, Špegel M, Kotnik J, Kotnik F, Rubin I, Hughes DA: Priporočila za odkrivanje in zdravljenje Fabryjeve bolezni v Sloveniji. *Zdrav. Vestn.* 2006; 75: 769–775
15. Hoa DLy, Withers SG: Mutagenesis of glycosidases. *Annu. Rev. Biochem.* 1999; 68: 487–522
16. Almeida AD, Ionata M, Tran V, Tellier C, Dion M, Rabiller C: An expeditious and efficient synthesis of  $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(13)-D-N-acetylglucosamine (lacto-N-biose) using a glycosynthase from *Thermus thermophilus* as a catalyst. *Tetrahedron: Asymmetry* 2009; 20: 1243–1246
17. Hernaiz MJ, Alcantara AR, Garcia JL, Sinisterra JV: Applied Biotransformations in Green Solvents. *Chem. Eur. J.* 2010; 16: 9422–9437
18. Jevnikar Z: Ekspresijski sistemi. V: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Štrukelj B, Kos J (urednika), Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 67–111
19. Lunder M: Izolacija bioloških učinkovin. V: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Štrukelj B, Kos J (urednika), Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 112–134
20. Slanc P: Genska informacija in kako do nje. V: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Štrukelj B, Kos J (urednika), Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 26–67
21. Mooney JT, Fredericks DP, Milton Hearn TW: Application of an IMAC cassette for the purification of N-terminally tagged proteins. *Sep. Purif. Technol.* 2013; 120: 265–274
22. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubieck J, Fabis R, LABahn J, Schafer F: Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). *Methods Enzymol.* 2009; 463: 439–476
23. Bradford MM: A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254
24. Capello C, Fischer U, Hungerbuhler K: What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry* 2007; 9: 927–934

25. Perez-Sanchez M, Sandoval M, Hernaiz MJ: Bio-solvents change regioselectivity in the synthesis of disaccharides using Biolacta  $\beta$ -galactosidase. *Tetrahedron* 2012; 68: 2141–2145.
26. Wolfson A, Dlugy C, Tavor D, Blumenfeld J, Shotland Y: Baker's yeast catalyzed asymmetric reduction in glycerol. *Tetrahedron* 2006; 17: 2043–2045
27. Perez-Sanchez M, Cabrera AC, Garcia-Martin H, Sinisterra JV, Garcia JI, Hernaiz MJ: Improved synthesis of disaccharides with *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase using bio-solvents derived from glycerol. *Tetrahedron* 2011; 67: 7708–7712
28. Wolfson A, Dulgy C, Shotland Y: Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Environ. Chem. Lett.* 2007; 5: 67–71
29. Kosmulski M, Gustafsson, Rosenholm JB: Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited. *Thermochim. Acta* 2004; 421: 47–53
30. Dyzuba SV, Bartsch RA: Expanding the polarity range of ionic liquids. *Tetrahedron Lett.* 2002; 43: 4657–4659
31. Chiappe C, Pieraccini D: Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. *J. Phys. Org. Chem.* 2005; 18: 275–297
32. Earle MJ, Esperanca JMSS, Gilea MA, Canongia Lopes JN, Rebelo LPN, Magee JW, Seddon KR, Widegren JA: The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature* 2006; 439: 831–833
33. Wasserscheid P, Keim W: Ionic liquids – New Solutions for Transition Metal Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000; 39: 3772–3789
34. Hagiwara R, Ito Y: Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions. *J. Fluorine Chem.* 2000; 105: 221–227
35. Tsuzuki S, Tokuda H, Hayamizu K, Watanabe M: Magnitude and Directionality of Interaction in Ion Pairs of Ionic Liquids: Relationship with Ionic Conductivity. *J. Phys. Chem.* 2005; 109: 16474–16781
36. Jain N, Kumar A, Chauhan S, Chauhan SMS: Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron* 2005; 61: 1015–1060
37. Kaftzik N, Wasserscheid P, Kragl U: Use of Ionic Liquids to Increase the Yield and Enzyme Stability in the  $\beta$ -Galactosidase Catalysed Synthesis of N-Acetyllactosamine. *Org. Process Res. Dev.* 2002; 6: 553–557

38. Garcia JI, Garcia-Marin H, Mayoral JA, Perez P: Green solvents from glycerol. Synthesis and physico-chemical properties of alkyl glycerol ethers. *Green Chem.* 2010; 12: 426–434
39. Cobucci-Ponzano B, PERUGINO G, Strazzulli A, Rossi M, Moracci M: Thermophilic Glycosynthases for Oligosaccharides Synthesis. *Methods Enzymol.* 2012; 510: 273–300
40. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit. Instruction manual. Agilent Technologies, ZDA
41. Inoue H, Nojima H, Okayama H: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990; 96: 23–28
42. Bio-Scale Mini Profinity IMAC cartridges, 1 and 5 ml. Instruction Manual BIO-RAD, ZDA.
43. Cobucci-Ponzano B, Conte F, Bedini E, Corsaro MM, Parrilli M, Sulzenbacher G, Lipski A, Dal Piaz F, Lepore L, Rossi M, Moracci M:  $\beta$ -Glycosyl Azides as Substrates for  $\alpha$ -Glycosynthases: Preparation of Efficient  $\alpha$ -L-Fucosynthases. *Chem. Biol.* 2009; 16: 1097–1108
44. Sandoval M, Cortes A, Civera C, Trevino J, Ferreras E, Vaultier M, Berenguer J, Lozano P, Hernaiz MJ: Efficient and selective enzymatic synthesis of N-acetyl-lactosamine in ionic liquid: a rational explanation. *RCS Advances*, 2012; 15 (2): 6306–6314