



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Badanie aktywności enzymów bezpośrednio po otrzymaniu z materiału biologicznego

Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu
Chemia Bioorganiczna i Bionieorganiczna
Dla studentów kierunku Chemia specjalność Chemia Bioorganiczna

Opracowanie: mgr inż. Marta Grec

Materiały zostały wykonane w ramach realizowanego na Politechnice Śląskiej projektu nr UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 pt.: „Unowocześnienie i rozszerzenie oferty edukacyjnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej – otwarcie specjalności Chemia Bioorganiczna” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest pozyskanie i oczyszczenie preparatu enzymatycznego – esterazy z wątroby świńskiej (PLE) oraz ocena jej aktywności w reakcji enzymatycznej hydrolizy octanu p-nitrofenolu w zależności od stopnia oczyszczenia i formy aplikacji do mieszaniny reakcyjnej.

PODSTAWY TEORETYCZNE

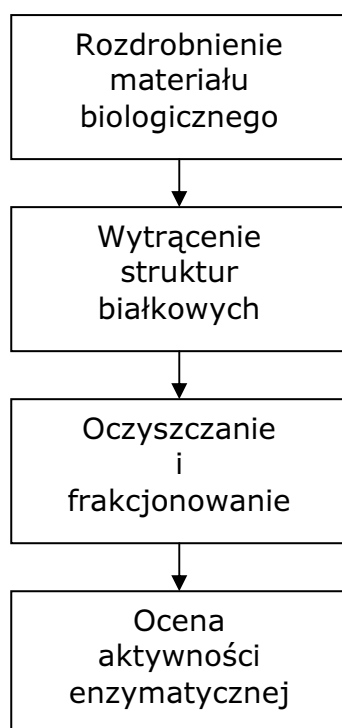
Enzymy jako katalizatory układów biologicznych występujące w formie globularnych białek, znalazły szerokie zastosowanie w procesach technologicznych. Takie cechy biokatalizatorów jak znaczne przyspieszenie tempa reakcji, łagodne i ekologicznie przyjazne warunki prowadzenia syntezy, wysoka specyficzności oraz możliwości wydajniejszego wykorzystania surowców umożliwiły często zastąpienie toksycznych procesów chemicznych odpowiednimi procesami biologicznymi.

Pozyskiwanie enzymów z materiału biologicznego

W związku z coraz szerszym zastosowaniem enzymów jako katalizatory procesów przemysłowych poszukiwane są dogodniejsze źródła ich pozyskiwania. Większość enzymów przemysłowych jest wytwarzana na drodze hodowli wglębnych mikroorganizmów w zamkniętych sterylnych bioreaktorach (fermentatorach) wypełnionych odpowiednim podłożem mikrobiologicznym. Podczas wzrostu drobnoustrój metabolizuje składniki pokarmowe zawarte w pożywce i syntezuje enzymy, które wydziela następnie do podłoża hodowlanego. Po procesie fermentacji enzym poddawany jest odpowiednio dobranym procedurom DSP (z ang. down-stream processing) rozumianym jako wszystkie operacje prowadzące do wyodrębnienia i oczyszczania produktu oraz nadania mu ostatecznej (handlowej) formy.

Równie dogodnym źródłem pozyskiwania enzymów dla celów przemysłowych są tkanki zwierzęce, a preparaty enzymatyczne wyodrębniane są najczęściej z narządów układu pokarmowego ssaków. W celu wyizolowania enzymu z tkanek należy zastosować takie metody, które pozwolą na otrzymanie go w stanie jednorodnym i bez utraty aktywności katalitycznej. Ze względu na dużą ich wrażliwość na silnie kwaśne lub zasadowe środowisko oraz wysokie lub bardzo niskie temperatury preparatykę enzymów należy przeprowadzić w buforach o pH ok. 7, w niskich temperaturach, z udziałem wody destylowanej oraz środków kompleksujących metale ciężkie. Ponieważ większa część enzymów nie występuje w komórkach w stanie wolnym, lecz jest związana z strukturami komórkowymi, proces izolacji musi rozpocząć się od zniszczenia tkanek z równoczesnym zachowaniem właściwości katalitycznej enzymu. Etapem standardowym jest więc rozdrobnienie tkanek przeprowadzone w homogenizatorach (najczęściej młynkach wysokoobrotowych), po którym (w przypadku enzymów mocno wbudowanych w ziarnistość komórek) można zastosować zamrażanie i odtajanie, środki zmniejszające napięcie powierzchniowe lub rozbicie ultradźwiękami. W celu wytrącenia struktur białkowych materiał biologiczny po rozdrobnieniu traktuje się schłodzonymi rozpuszczalnikami organicznymi (takimi jak aceton lub etanol). Najczęściej łączy się ze sobą dwa etapy i rozdrabnianie prowadzi się z dodatkiem schłodzonego acetonu. W ten sposób preparat enzymatyczny uzyskuje się w postaci proszku.

Kolejnym etapem w uzyskiwaniu preparatu o pożądanej aktywności enzymatycznej jest oczyszczanie i frakcjonowanie, które najczęściej przeprowadza się z użyciem soli (zwłaszcza siarczanu (VI) amonu). Poddanie enzymu działaniu soli o dużym stężeniu prowadzi do jego wytrącenia, a proces ten nazywa się wysalaniem. Należy podkreślić, iż proces ten jest odwracalny i nie powoduje denaturacji białek. Zastosowanie chromatografii (jonowymiennej, powinowactwa lub filtracji żelowej), elektroforezy lub ultrawierwienia daje możliwość uzyskania doczyszczanego preparatu enzymatycznego. Ostatnim etapem oczyszczania może być krystalizacja, która powtarzana wielokrotnie prowadzi do otrzymania czystych preparatów o dużej aktywności. Proces uzyskiwania enzymów w sposób skrótowy przedstawiono na blokowym **schemacie 1**.



Schemat 1

Metody oznaczania aktywności enzymatycznej

Istnieje wiele metod pozwalających na wyznaczenie aktywności enzymatycznej, a ich jednoznaczna klasyfikacja jest bardzo trudna. Można podzielić je ze względu na sposób wykonania pomiarów, stosowane techniki itd. I tak wyróżnia się:

- *metody ciągłe* – nie wymagają etapu separacji związku przed analizą – stosuje się je do mieszanin reakcyjnych, w których substraty (A) i produkty (B) różnią się niektórymi właściwościami, pozwalającymi na pomiar bezpośredni jednego ze składników: np. A skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego, B – nie;

- *metody nieciągłe* – przed pomiarem aktywności wymagane jest rozdzielenie substratów (A) od produktów (B) (zarówno związek A jak i B są chiralne), a analiza tymi metodami wymaga więcej etapów;

- *metody połączone* – aktywność mierzy się pośrednio w taki sposób, że dwie reakcje są zaangażowane - pierwsza z nich zakłada przekształcenie związku A do B, a druga

otrzymywanie związku C ze związku B (A→B→C). W reakcji tej związek C jest wskaźnikiem i obserwacja zmian jego stężenia daje informacje o ilości otrzymanego związku B.

Podziału metod można dokonać również na podstawie ilości punktów pomiarowy. Mówi się wtedy o metodach statycznych i kinetycznych:

- *metoda statyczna* np. dwupunktowa - zakłada porównanie ilości substratu i produktu w 2 punktach czasowych - w czasie zero i po zakończeniu inkubacji. Wymaga ona zapewnienia odpowiednich warunków reakcji tak, aby jej szybkość była stała przez cały czas inkubacji.

- *metoda kinetyczna* – zakłada pomiar stężenia substratu lub produktu w jednostce czasu – najczęściej w początkowym etapie procesu przeprowadza się pomiar ciągły zmian stężenia wybranego składnika.

Do stosowanych w określeniu aktywności enzymu metod analitycznych zaliczyć można *klasyczne* (np. miareczkowanie) lub *instrumentalne* (spektrofotometryczne, polarymetryczne, potencjometryczne itd.). Najbardziej popularne metody opierają się na pomiarze absorpcji światła (metoda spektrofotometryczna) w wybranym zakresie fal (najczęściej od 300 do 400 nm). Można w ten sposób określić zmianę stężenia wybranego substratu lub produktu, a szybkość reakcji mierzona ilością przereagowanego substratu lub powstawania produktu w jednostce czasu w przeliczeniu na ilość materiału enzymatycznego jest miarą jego aktywności.

Istnieje kilka rodzajów jednostek stosowanych podczas oznaczania aktywności enzymu a do najczęściej stosowanych należą katal (*kat*) i unit (*U*).

Katal definiowany jest jako aktywność enzymu umożliwiająca przekształcenie 1 mola substratu w czasie 1 sekundy.

Unit jest to bezwzględna międzynarodowa jednostka standardowa enzymu (*U*) czyli taka aktywność enzymu, która pozwala na przekształcenie 1 mmola substratu (lub 1 mmol odpowiednich grup chemicznych) w ciągu 1 minuty w temperaturze 30°C i w optymalnych warunkach.

Istnieje prosta zależność liczbowa między katalami i unitami wyrażona wzorem:

$$1\text{kat} = 6 \cdot 10^6 \text{ U}$$

Spektrofotometria UV-VIS

Spektrofotometria UV-VIS czyli spektrofotometria w zakresie nadfioletu i promieniowania widzialnego jest jedną z najstarszych metod instrumentalnych w analizie chemicznej i wykorzystuje przejścia energetyczne zachodzące w cząsteczkach spowodowane absorpcją promieniowania elektromagnetycznego w zakresie 180 – 800 nm. Przejściami elektronowymi między stanami energetycznymi rządzą tzw. reguły wyboru. Do najważniejszych z nich zaliczamy regułę mówiącą, że aby nastąpiła absorpcja promieniowania muszą istnieć dwa takie stany kwantowe cząsteczki, których różnica energii odpowiada energii promieniowania padającego. Przejścia spełniające tę regułę nazywa się dozwolonymi, a niespełniające – wzbronionymi. Miarą intensywności pasma absorpcji jest wartość molowego współczynnika absorpcji, który jest równocześnie miarą prawdopodobieństwa przejścia (dla przejść dozwolonych przyjmuje duże wartości)

Metodą spektrofotometrii UV-VIS można oznaczyć:

- Bezbarwne związki organiczne i nieorganiczne, w których występują wiązania π lub elektrony n pochodzące od wolnych par elektronowych (węglowodory aromatyczne, aldehydy, ketony, kwasy i aminy oraz pierwiastki ziem rzadkich, ozon, SO_2)
- Barwne związki organiczne i barwne sole metali (KMnO_4 , CuSO_4)
- Substancje, których formy absorbujące promieniowanie uzyskuje się na drodze przemian chemicznych (reakcje kompleksowania metali z ligandami organicznymi)

Analiza ilościowa tą metodą polega na pomiarze absorbancji A badanego roztworu przy określonej długości fali przy równoczesnym wykorzystaniu prawa Lamberta-Beera. Jest to drugie z trzech praw absorpcji, które zostało sformułowane w następujący sposób:

Jeżeli współczynnik absorpcji rozpuszczalnika jest równy zeru to absorbancja wiązki promieniowania monochromatycznego przechodzącego przez jednorodny roztwór jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu c i do grubości warstwy absorbującej b .

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b$$

gdzie: ε - molowy współczynnik absorpcji przy określonej długości fali [$\text{mol}/(\text{dm}^3 \cdot \text{cm})$]

c – stężenie [mol/dm^3]

b – grubość warstwy [cm]

Pomiary absorbancji wykonuje się w urządzeniach zwanych spektrofotometrami. Na podstawowe elementy aparatu składają się:

- Źródło promieniowania – lampy deuterowe (180-380 nm), wolframowo-halogenowe (powyżej 380 nm), wysokociśnieniowe łukowe lampy ksenonowe (cały zakres UV-VIS)
- Układ optyczny – monochromator, służący do wyodrębnienia z promieniowania ciągłego wąskie pasmo o określonej długości fali
- Pomieszczenie na komórkę pomiarową
- Detektor mierzący natężenie światła
- Wskaźnik, rejestrator, komputer

Aby wyniki pomiarów były uznane za wiarygodne należy pamiętać o szeregu warunków t.j. dobre przygotowanie próbek (roztwór musi być jednorodny, a wybrany rozpuszczalnik nie może absorbować w badanym zakresie widma) oraz odpowiedni aparat – spektrofotometr – w pełni sprawny i kalibrowany zgodnie z instrukcją.

Ilościowe oznaczenia metodą spektrofotometrii UV-VIS należą do oznaczeń porównawczych. W przypadku oznaczania pojedynczego składnika wykorzystuje się trzy metody analityczne:

1. Metoda porównania z pojedynczym wzorcem – w metodzie tej wykonuje się pomiar absorbancji roztworu o określonym stężeniu, a następnie w kuwecie o tej samej grubości i przy tej samej długości fali wykonuje się pomiar absorbancji roztworu o nieznanym stężeniu.

2. Metoda porównania z kilkoma wzorcami – metoda polega na wykonaniu krzywej wzorcowej
3. Metoda dodatku wzorca – procedura sprowadza się do wykonania pomiaru absorbancji próbki badanej substancji A o stężeniu nieznanym i absorbancji próbki badanej, do której została dodana znana ilość substancji A

Spektrofotometria UV-VIS należy do najczęściej wykorzystywanych metod instrumentalnych, a wpływ na to mają takie jej zalety jak: duża czułość, duża precyzja oznaczeń oraz selektywność oznaczeń.

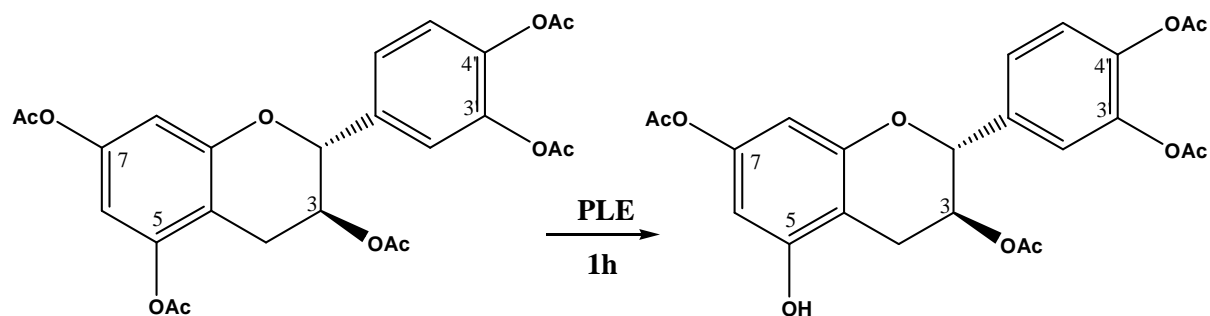
Esteraza z wątroby świńskiej

Esteraza z wątroby świńskiej (PLE) jest enzymem bardzo stabilnym, cechującym się wysoką regio-, chemo- i stereoselektywnością, katalizującym reakcje z udziałem wielu różnych reagentów co powoduje, że znalazła szerokie zastosowanie jako enzym hydrolityczny. Jest to karboksyesteraza typu serynowego należąca do hydrolaz.

Ponieważ nie udało się otrzymać esterazy z wątroby świńskiej w postaci krystalicznej, a co za tym idzie nie ma przeprowadzonej analizy krystalograficznej, o budowie centrum aktywnego można powiedzieć jedynie na podstawie opracowanych prostych modeli. Zakładają one, iż w centrum aktywnym PLE można wyróżnić dwie kieszenie hydrofobowe (dużą H_L i małą H_S) – oddziałujące z strukturami niepolarnymi (łańcuchy alifatyczne, pierścienie aromatyczne – oraz dwie kieszenie polarne (przednia P_F i tylna P_R), blisko których znajduje się reszta serynowa. Kieszeń polarna przednia może wiązać zarówno grupy polarne jak i nie polarne, podczas gdy kieszeń polarna tylna – tylko grupy polarne. Ze względu na taką budowę centrum aktywnego esteraza wykazuje dużą stereoselektywność względem substratów.

Najczęstszymi substratami do reakcji z udziałem PLE są alkohole, diole i poliole oraz estry, kwasy mono- i polikarboksylowe. Jako enzym z grupy hydrolaz może katalizować reakcje hydrolizy, transestryfikacji, otrzymywania kwasów lub amidów. Większość reakcji prowadzi się w buforze fosforanowym o pH ok. 7, a w przypadku gdy substraty reakcji nie są rozpuszczalne w wodzie stosuje się dodatek rozpuszczalników organicznych t.j. acetonitryl, których obecność (do 20%) nie wpływa na aktywność enzymu. Optymalna temperatura dla procesów z udziałem PLE jest to zakres od 20 do 30°C.

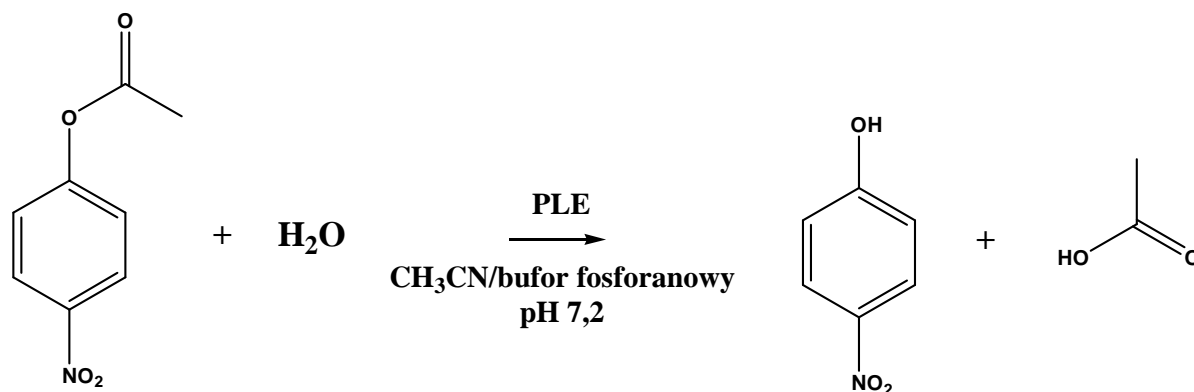
Przykładem regioselektywnej hydrolizy katalizowanej przez PLE jest reakcja peracetylowanej katechiny (**schemat 2**)



Schemat 2

Po upływie godziny głównym produktem jest acetylowana katechina z wolną grupą OH przy 5 atomie węgla, a wydajność tej reakcji wynosi 70%. Wydłużenie czasu do 24 h prowadzi do otrzymania 3-O-acetylokatechiny.

W celu wykazania aktywności PLE uzyskanej z wątroby świńskiej można użyć ją jako katalizator reakcji hydrolizy estrów aromatycznych. Jako substrat reakcji może zostać użyty ester aromatyczny - octan p-nitrofenolu, który w reakcji enzymatycznej hydrolizy katalizowanej przez PLE ulega przekształceniu do p-nitrofenolu (schemat 3).



Schemat 3

Produkt reakcji wykazuje maksimum absorpcji dla $\lambda=405$ nm. Pomiar zmiany absorbancji w czasie daje możliwość oceny aktywności uzyskanego preparatu enzymatycznego.

PRZEBIEG ĆWICZENIA

Wydzielanie enzymu z materiału biologicznego i oczyszczenie metodą wysalania

Odczynniki:

- Wątróbka wieprzowa (50g),
- Schłodzony aceton (200ml),
- Bufor fosforanowy pH 7,2 (5ml),
- Roztwór nasyconego siarczanu (VI) amonu

Szkoło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- nóż,
- zlewki 150 ml, 500ml,
- łyżeczka,
- lejek ze spiekim,
- kolbka ssawkowa 150 ml,
- cylinder miarowy
- bibuła filtracyjna
- probówki wirówkowe
- młynek wysokoobrotowy,
- wirówka,
- łaźnia ultradźwiękowa
- łaźnia lodowa
- łapy
- waga analityczna

Wykonanie ćwiczenia

1. Wydzielenie preparatu enzymatycznego

Do zlewki odważyć 50g wątróbki, następnie drobno pokroić i mielić z dodatkiem schłodzonego acetonu (100 ml) w młynku (250 obr/s) przez 1 minutę. Następnie zawiesinę przesączyć na lejku ze spiekim, przesącz odrzucić a pozostały brązowy osad ponownie mielić (250 obr/s) z schłodzonym acetonem (50 ml) przez 1 min. Przesączyć, przesącz odrzucić i dodać 3 porcję (50 ml) schłodzonego acetonu, zmielić. Przesączyć, przesącz odrzucić a osad zważyć i zastosować jako źródło enzymu PLE w preparacie surowym (**osad 1**).

2. Oczyszczanie metodą wysalania

Do probówki wirówkowej odważyć 400 mg surowego preparatu enzymatycznego i dodać 5 ml buforu fosforanowego o pH 7,2. Całość mieszać około minuty a następnie umieścić w łaźni ultradźwiękowej na 5 minut. Zawiesinę wirować w wirówce przez 10 minut przy 8000 obr/min w temp. 0°C. Supernatant przelać do drugiej probówki wirówkowej, odczytać objętość i umieścić w łaźni lodowej. Następnie dodać małymi porcjami taką ilość nasyconego roztworu siarczanu (VI) amonu, aby powstały roztwór był wysycony w 80% tą solą. (Rozpuszczalność siarczanu VI amonu w wodzie w temp. 20°C wynosi 760 g/l). Pozostawić w łaźni lodowej na 1 h od czasu do czasu mieszając. Odwirować, a osad potraktować jako źródło enzymu w preparacie oczyszczonym (**osad 2**).

Badanie aktywności PLE w surowym i oczyszczonym preparacie

Odczynniki:

- Surowy preparat PLE,
- Oczyszczony preparat PLE,
- p-nitrofenol,
- octan p-nitrofenolu
- acetonitryl,
- bufor fosforanowy pH 7,2,

Szkló i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki wirówkowe
- zlewki 150 ml
- cylinder miarowy 15 ml, 100 ml,
- kolbka miarowa 10 ml,
- łyżeczka
- pipeta automatyczna
- pipety Pasteura
- wirówka
- spektrofotometr, kuweta spektrofotometryczna
- łaźnia ultradźwiękowa,
- waga analityczna

Wykonanie ćwiczenia

1. Wykonanie krzywej wzorcowej dla produktu reakcji

Do 5 kolbek miarowych o poj. 10 ml pobrać odpowiednio 0,25, 0,5, 0,75 i 1 ml roztworu wzorcowego p-nitrofenolu (stężenie odczytać z butelki i zapisać!) i dopełnić do kreski roztworem acetonitrylu w buforze fosforanowym (1:4). Wymieszać i zmierzyć absorbancję każdego roztworu przy $\lambda=405$ nm, pamiętając o wyzerowaniu aparatu wobec roztworu acetonitrylu w buforze (1:4). Obliczyć stężenia p-nitrofenolu w każdej próbce i sporządzić krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia.

2. Zbadanie aktywności enzymu w preparatach: surowym i oczyszczonym

Przygotować 2 probówki wirówkowe. Do pierwszej odważyć 300 mg surowego preparatu enzymatycznego (**osad 1**) i podpisać nr 1, a do drugiej taką samą ilość preparatu oczyszczonego (**osad 2**) i podpisać nr 2. Następnie do każdej probówki dodać 4 ml buforu fosforanowego o pH 7,2, wstawić do łaźni ultradźwiękowej na 2 minuty, a następnie odwirować przez 10 minut w temp. 0°C (8000 obr./min). Do dwóch kolbek miarowych o objętości 10 ml pobrać po 1 ml z każdego supernatantu i dopełnić buforem do kreski. Kolbki oznaczyć analogicznie do osadów.

Przygotować trzy zlewki. Do każdej z nich wlać po 50 ml buforu fosforanowego pH 7,2 i dodać 0,15 mmola octanu p-nitrofenolu (substrat reakcji w postaci roztworu - stężenie odczytać z kolby i przeliczyć na odpowiednią ilość, potrzebną do reakcji). Wymieszać i wyzerować aparat względem mieszaniny przy $\lambda=405$ nm. Przygotować stoper. Następnie do pierwszej zlewki dodać 0,5 ml roztworu surowego roztworu enzymatycznego PLE (kolbka nr 1), wymieszać i równocześnie włączyć stoper. Po około 60 sek. napełnić kuwetę i rozpocząć pomiary wykonując odczyt absorbancji co 30 sekund przez 8 minut. Następnie do zlewki nr 2 dodać 0,5 ml roztworu enzymatycznego po wysalaniu (kolbka nr 2) i postępować analogicznie jak z preparatem surowym. Do trzeciej zlewki dodać ODWAŻONY wysolony preparat enzymatyczny (**osad 2**) w takiej ilości, aby odpowiadał ilości wysolonego preparatu enzymatycznego dodanego do mieszaniny reakcyjnej w formie roztworu w buforze fosforanowym. Wymieszać i postępować jak w pozostałych przypadkach.

PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ

1. Przeczytaj uważnie instrukcję i dokładnie przeanalizuj czynności oraz techniki laboratoryjne opisane w części eksperymentalnej.
2. Zapoznaj się z zagrożeniami związanymi z stosowanymi odczynnikami oraz poszczególnymi czynnościami wykonywanymi na zajęciach (karty charakterystyk)
2. Zwróć uwagę czy znasz następujące pojęcia: enzym, bioreaktor, katal, unit, frakcjonowanie, regioselektywność, prawo Lamberta-Beera, absorbancja
3. Zastanów się czy wiesz:
 - jakie są etapy uzyskiwania enzymów z materiału biologicznego,
 - jakie są metody oczyszczania preparatów enzymatycznych,
 - jak można podzielić i czym się charakteryzują metody określania aktywności enzymatycznej? do jakiego typu można zakwalifikować metodę wykorzystywaną na zajęciach i dlaczego?
 - czym jest spektrofotometria UV-VIS, jakie prawo wykorzystuje, w analizie jakich związków można ją wykorzystać, jak zbudowany jest spektrofotometr i jakie metody oznaczeń są wykorzystywane przy określaniu stężenia substancji
 - jaką budowę posiada centrum aktywne esterazy z wątroby świńskiej i jakie reakcje katalizuje ten enzym
 - jak przeliczyć objętości, masy lub stężenia odpowiednich odczynników, korzystając z podstawowych proporcji lub wzorów na stężenia molowe, procentowe itp.

OPRACOWANIE WYNIKÓW

W celu opracowania sprawozdania należy:

- a) przygotować krótki wstęp teoretyczny oraz **realny** opis przebiegu ćwiczenia (z uwzględnieniem ilości powstałych osadów, objętości przesączów itd). Proszę zwrócić uwagę na wszelkiego rodzaju efekty towarzyszące danemu etapowi ćwiczenia i umieścić je jako obserwacje;
- b) wykonać krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia dla p-nitrofenolu (wykorzystując programy typu Excel lub Matlab);
- c) na podstawie krzywej wzorcowej obliczyć ilość produktu reakcji octanu p-nitrofenolu katalizowanej przez PLE (surowej, wysolonej dozowanej w roztworze lub jako preparat stały) i sporządzić 3 wykresy przyrostu produktu w mierzonych jednostkach czasu;
- d) przeanalizować przebiegi powstałych krzywych i spróbować wyciągnąć wnioski dotyczące kinetyki reakcji;
- e) ponadto sformułować wnioski dotyczące metody pozyskiwania i oczyszczania PLE z wątroby oraz wpływu poszczególnych etapów na aktywność enzymu. Zaproponować zmiany w wykonanej preparatyce enzymu, mające na celu poprawę ilości i jakości preparatu enzymatycznego;
- f) określić wady i zalety metody określenia aktywności enzymu stosowanej na zajęciach.

LITERATURA

- K. Drauz, H. Waldman, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Weinheim: Wiley-VCH. (1995),
U. T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, , *Hydrolases in Organic Chemistry*, Weinheim: Wiley-VCH.
(1999)
- S. M. Roberts, K. Wiggins, G. Casy, S. Phythian, C. Todd, *Preparative Biotransformations
Whole Cell and Isolated Enzymes in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons., (1996)
- P. Walser, P. Renold, V. N'Goka, F. Hosseinzadeh, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta*, 74 (1991) 1941-
1952,
- G. Guanti, L. Banfi, E. Narisano, R. Riva, S. Thea, *Tetrahedron Lett.*, 27 (1986) 4639-4642.
- G. Caron, R.J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.*, 56 (1991) 1991
- K. Naemura, R. Fukuda, N. Takahashi, M. Konishi, Y. Hirose, Y. Tobe, *Tetrahedron Asymm.*, 4
(1993) 911-918.
- M. Mroczkiewicz, A. Fryszkowska, R. Ostaszewski, *Biotechnologia*, 2 69 (2005) 32-47
- J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2005)
- C. Ratledge, B. Kristiansen, *Podstawy biotechnologii*, PWN, Warszawa (2011)
- L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN, Warszawa, (2003)
- E. F. Rossomando, *HPLC in enzymatic analysis*; Wiley-Interscience (2006)
- W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa (2007)