

**Univerza v Mariboru**  
**Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo**

**Maja Habulin, Mateja Primožič**

***Biokemijska tehnika***

*Navodila za laboratorijske vaje (zbrano gradivo)*

Recenzent:izr. prof. dr. Mojca Škerget

Maribor, 2008

## Navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju

1. V laboratorij vstopamo v zaščitnih haljah. Pri delu uporabljamo zaščitne rokavice.
2. **V laboratoriju ne jemo in ne pijemo!!!** Ker se lahko inficiramo skozi usta, nos, oči in kožo, pri delu ne dajemo ničesar v usta (svinčnik, peresa, steklovina itd.).
3. Z živimi mikrobi delamo previdno in **aseptično** ob plamenu plinskega gorilnika.
4. Pri delu z gorilnikom pazimo, da nam plamen ne ožge kože, las ali halje.
5. Med delom z mikrobi in kužnino so vrata in okna zaprta, da zračni tok ne nosi mikrobov po laboratoriju.
6. Pri delu pazimo, da mikrobni kultur ne polivamo po mizi, po tleh in obleki. Z rokami se ne dotikamo kolonij in suspenzij živih mikrobov. **Če pride kužnina v stik s kožo ali delavno površino, obvestimo asistenta ali tehničnega sodelavca.** Kontaminirano delovno površino pokrijemo s staničevino in jo prelijemo z razkužilom. Razkužilo pustimo delovati najmanj 20 minut. Kontaminirano mesto na telesu ali obleki razkužimo in nato speremo z vodo.
7. Kontaminiran material odlagamo v odlagalnike ali na označeno mesto in ga nato avtoklaviramo.
8. Kovinske predmete, ki pridejo v stik s kužnino (pincete, bakteriološke zanke itd.) sprti ožigamo v plamenu. Ožigamo tudi vratove epruvet, erlenmajeric in steklenic z mikrobi, preden jih odpremo in po uporabi.
9. Po opravljenem delu pospravimo za seboj in razkužimo delovne površine. Prepričamo se, da so dovodi plina do gorilnikov zaprti.
10. Pred in po začetku izvajanja vaj si skrbno umijemo roke z milom. Če je potrebno roke tudi razkužimo.

## **Aseptično delo in osnove mikrobiološke tehnike**

### **Aseptično delo**

Delo v mikrobiološkem laboratoriju zahteva aseptično tehniko. Vse mikrobiološke preiskave, od odvzema vzorca in do končne identifikacije mikrobov, morajo biti opravljene aseptično. To pomeni, da s kužnino ali kulturami mikroorganizmov delamo tako, da;

1. onemogočimo dostop nezaželenim mikroorganizmom, ki bi kontaminirali naše kulture in zaradi katerih bi bili rezultati poskusov napačni;
2. pazimo, da mikroorganizmov ne razširjamo, kajti utegnili bi inficirati sebe ali druge.

Za aseptično delo je nujno, da so steklovina, predmeti in pripomočki za delo ter gojišča za gojenje mikroorganizmov sterilni. Le pri aseptični tehniki bodo rezultati preiskav pravilni, zato je pomembno, da delamo ob plamenu plinskega gorilnika, cepilno zanko in steklovino med delom ožigamo in da delovno površino redno čistimo z razkužili.

Tudi ob skrbnem upoštevanju pravil aseptičnega dela je možno, da pride do kontaminacije okolice ali kulture s katero delamo.

### **Osnove mikrobiološke tehnike**

Mikrobiologijo delimo na različna področja (npr. klinična mikrobiologija z odkrivanjem in identifikacijo povzročiteljev bolezni, sanitarna mikrobiologija z nadzorom vode in živil itd.). Glede na področja, s katerimi se ukvarjajo, v različnih mikrobioloških laboratorijih uporabljajo različne tehnike. Nekatere tehnike so osnovne in jih mora obvladati vsak laboratorij. Med osnovne mikrobiološke tehnike prištevamo:

#### **- gojenje bakterij**

Bakterije najlažje proučujemo, če jih znamo gojiti v laboratorijskih razmerah. Običajno rastejo na trdnih ali v tekočih gojiščih. Na sveža gojišča kulture precepljamo s cepilno zanko, lahko pa tudi z vatenko ali s pipeto. Za dobro rast moramo mikroorganizmom zagotoviti primerna hranila za rast in primerne razmere (ustrezen pH okolja, ustrezna temperatura za rast, pravilna aeracija itd.).

**- mikroskopijo**

Morfološke značilnosti mikroorganizmov lahko opazujemo le z različnimi mikroskopskimi tehnikami. Mikroskop uporabljamo tudi za kvantifikacijo populacij ali za preverjanje možnih kontaminacij.

**- identifikacijo**

Uvrščanje seva v vrsto, rod ali v širšo skupino je pomembno, saj na ta način lahko predvidimo nekatere njegove lastnosti.

**- sterilizacijo**

Sterilizacija je postopek, s katerim uničimo ali odstranimo vse žive mikroorganizme.

Metode in sredstva za sterilizacijo in dezinfekcijo:

**1. Fizikalne metode**

a) sterilizacija s toploto

- *s suho toploto* (Steriliziramo laboratorijsko steklovino v sterilizatorjih. Postopek traja dalj časa, poteka pri višji temperaturi in je manj učinkovit od sterilizacije z vlažno toploto).
- *z vlažno toploto* (Uporabimo avtoklav, kjer z vodno paro pod tlakom pri 121 °C (15 minut) uničimo vse žive celice in spore.)
- *tindalizacija* (To metodo (30 minut od 80 – 100 °C, 3 dni zapored) uporabljamo za sterilizacijo snovi, ki bi jih višja temperatura uničila ali inaktivirala.)

b) sterilizacija z obsevanjem

- *z ultravijoličnimi žarki* (To sevanje se uporablja za sterilizacijo prostorov in laminarjev).
- *z ionizirajočimi žarki* (Sterilizacija z gama žarki se uporablja v komercialne namene npr. za sterilizacijo toplotno občutljivih predmetov, večjih količin plastičnih izdelkov ali hrane.)

c) sterilizacija s filtracijo

S filtracijo steriliziramo pline ali temperaturno občutljive tekočine tako, da mikroorganizme odstranimo. Snov prehaja skozi filter, ki zadrži delce določene velikosti.

č) sterilizacija s plini

Pline uporabljamo za sterilizacijo prostorov in materiala, ki ga ne moremo sterilizirati na drugačen način. Najpogosteje se uporabljata etilen oksid in pare formaldehida (žal sta zdravju škodljiva). Vse pogosteje se uporablja vodikov peroksid, ki je manj toksičen.

**2. Kemična sredstva**

Pri uporabi kemijskih bakteriocidnih sredstev moramo vedeti, da univerzalnega bakteriocidnega sredstva ne poznamo, zato moramo vedno izbrati najprimernejšega. Če želimo, da bo razkuževanje uspešno, moramo upoštevati antimikrobni spekter, optimalno koncentracijo, temperaturo in čas delovanja dezinficiensa (po navodilih proizvajalca) ter okolje, v katerem se mikrobi nahajajo. Za razkuževanje površin in prostorov uporabljamo dezinfekcijska sredstva, za razkuževanje tkiv pa antiseptike. Kemična sredstva lahko delujejo na mikroorganizme bakteriocidno (ubijajo), bakteriostatično (inhibirajo rast) ali bakteriolitično (ubijajo celice z lizo). Kemična sredstva delujejo na vegetativne celice, le redka tudi na spore.

## **VAJA 1: Dokaz sterilnega dela in izolacija bakterij z različnih površin**

### **Dokaz sterilnega dela**

#### Material:

- tri sterilne epruvete
- epruveta s hranilno juho
- infuzijska steklenička z vodo
- plošča hranilnega agarja
- pipete (1 ml in 0,1 ml)

#### Potek vaje:

- V tri epruvete odpipetirajte 0,9 ml hranilne juhe.
- Sterilno vodo redčite v pripravljene hranilni juhi tako, da v prvo epruveto odpipetirajte 0,1 ml vode, nato z novo pipeto prenesite 0,1 ml iz prve epruvete v drugo ter ponovno z novo pipeto 0,1 ml iz druge epruvete v tretjo.

Z novo pipeto mešanico vedno najprej pomešate tako, da tekočino najprej potegnete v pipeto in jo nato izpustite iz nje. To ponovite trikrat.

- Iz zadnje epruvete cepite s cepilno zanko na ploščo hranilnega agarja.
- Vse tri epruvete in ploščo inkubirajte na 37 °C dva dni.

Opomba: Plošče hranilnega agarja so vedno, razen pri pregledovanju, obrnjene z gojiščem navzgor.

#### Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje, shematsko prikažite način priprave razredčin ter cepljenja vzorca na ploščo hranilnega agarja. Opišite bakterijsko rast v posamezni epruveti in na plošči. Kaj pomeni rast bakterij v posamezni epruveti oz. na plošči?

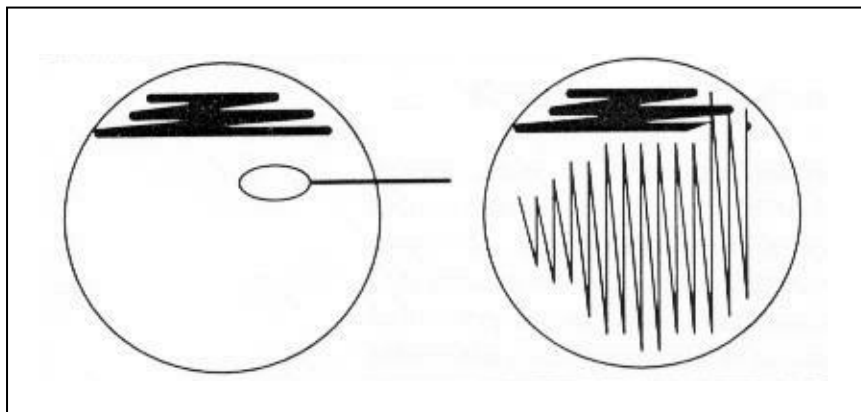
### Izolacija bakterij z različnih površin

#### Material:

- sterilne vatenke
- majhna epruveta s fiziološko raztopino
- plošča hranilnega agarja

#### Potek vaje:

- Vatenko namočite v fiziološko raztopino.
- S tako pripravljeno vatenko naredite bris izbrane površine (tla, grlo, nos, delovna površina itd.).
- Kužnino razmažite po delu plošče hranilnega agarja. S cepilno zanko naredite nato nekaj pravokotnih potez čez prvi premaz, nato nadaljujte v isti smeri cepljenja, ne da bi se dotikali prvega premaza (Slika 1.).
- Ploščo označite in inkubirajte do dva dni na 37 °C.



**Slika 1:** Razmaz brisa na plošči hranilnega agarja.

#### Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje, zapišite mesto odvzema vzorca in shematsko ponazorite tipe kolonij, ki so se razmnožili na pripadajoči plošči hranilnega agarja. Ali se bakterije iz različnih vzorcev med seboj razlikujejo? Diskusija.

## **Izolacija čiste kulture**

Vzorci običajno vsebujejo veliko različnih vrst mikroorganizmov in vsak od njih ima določene fiziološke in morfološke lastnosti. Le z osamitvijo vsake bakterijske vrste posebej v čisti kulturi je mogoče posamezne vrste preučevati in jih okarakterizirati. Tudi za spoznavo že znanih vrst je praviloma potrebna čista kultura. Bakterijsko vrsto, ki jo proučujemo, vselej najprej gojimo v čisti kulturi. V čisti kulturi je samo ena vrsta bakterije in zato so lastnosti kulture lastnosti te bakterijske vrste. Govorimo o izolaciji ali osamitvi bakterije. V mešani kulturi je več kot ena vrsta bakterij. V takšnih kulturah določeno lastnost ni mogoče pripisati samo eni od vrst bakterij v kulturi. Iz mešane kulture izoliramo bakterije po več metodah. Tako dobimo posamezne bakterijske kolonije iste vrste v čisti kulturi, saj je le na ta način mogoče preučevati vsako vrsto bakterijske kulture posebej.

## **Čistost kulture in izolacija čiste kulture**

Vsaki kulturi je potrebno preveriti njeno čistost. Čistost tekoče kulture je mogoče preveriti pod mikroskopom. Običajno preparat čiste kulture vsebuje le celice iste oblike, izjemoma pa so lahko bakterijske kulture pleomorfne (vsebujejo celice različnih oblik). Problem lahko predstavljajo tudi različne bakterije, ki imajo podobno obliko in jih je zato pod mikroskopom težko med seboj ločiti. V takem primeru je potrebno tekočo kulturo cepiti na ploščo hranilnega agarja. Na takšnem gojišču se bo vsaka bakterijska celica namnožila in nastala bo kolonija, ki jo lahko v večini primerov dobro razločimo tudi s prostim očesom. V kolikor se na ploščah pojavi le ena vrsta kolonij, lahko sklepamo, da je kultura čista.

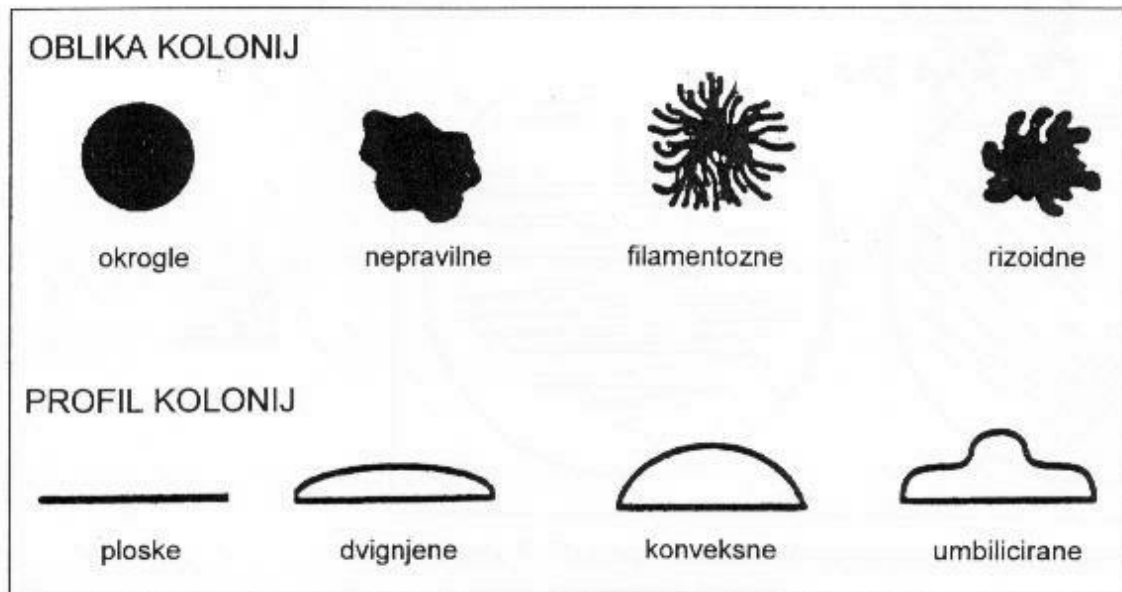
Kolonije različnih vrst mikroorganizmov se med seboj ločijo po izgledu (Slika 2.). Ločijo se glede na:

- barvo (prozorne, bele, v rumenih do rdečih tonih, vijoličaste, fluorescenčne ...);
- površino (gladka, mokra, suha, nagubana, razbrazdana ...);
- velikost (premer manjši od 1 mm, 1 mm ... );
- prečni prerez (ploska, dvignjena, konveksna, umbicilarna ...);
- obliko (okrogle, nepravilne, filamentozne, rizoidne ...);
- rob (gladek, valovit, korenast, s poglobitvami, nažagan, žarkast (nitast) ...);



- ustroj (krhke, trde, mazave, sluzne ...).

Čistost kulture lahko preverimo le, če je plošča »dobro cepljena« (kolone morajo biti dovolj narazen, da lahko zrastejo do za vrsto značilne velikosti in razvijejo druge značilnosti). Tak način cepljenja imenujemo *cepljenje do posameznih kolonij*.



**Slika 2:** Oblike in profili mikrobioloških kultur.

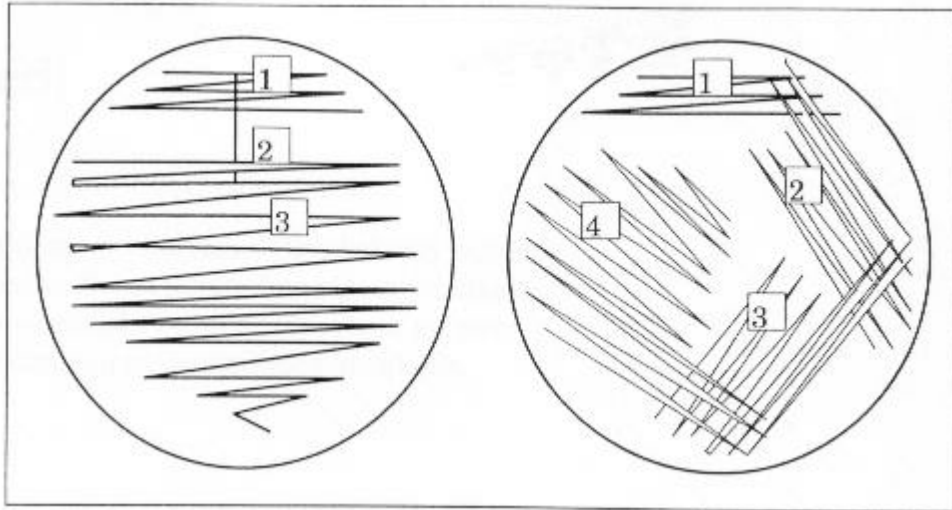
Zaželeno vrsto mikroorganizmov lahko iz izhodnega materiala izoliramo na več načinov:

- **z direktno metodo** (Material suspendiramo in primerno rečimo ter nato pod mikroskopom prenesemo eno samo celico v sveže gojišče (Primerna metoda za delo s kvasovkami.)).
- **z indirektno metodo** (Mašano kulturo najprej cepimo na gojišče do posameznih kolonij (Slika 3.). Na plošči z mešano kulturo izberemo kolonijo bakterije, ki jo želimo izolirati v čisti kulturi, ter jo s cepilno zanko precepimo na svežo ploščo. Pri izolaciji čiste kulture je ponavadi potrebnih več zaporednih precepljanj).

Bakterijske kulture lahko shranjujemo na več načinov:

- s precepljanjem na ploščah ali poševnih gojiščih,

- z zamrzovanjem ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v tekočem dušiku pri  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  z dodajanjem zaščitnih sredstev, ki preprečujejo nastanek kristalov v celici),
- s sušenjem (na sterilnem filter papirju, v želatini, na granulah silikagela),
- z liofilizacijo (suspenzijo mikroorganizmov hitro zamrznemo pri temperaturi  $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$  in v vakuumu odstranimo vodo).



**Slika 3:** Izolacija čiste kulture s cepilno zanko.

## **VAJA 2: Izolacija čiste kulture**

### Material:

- plošča z mešano kulturo
- sveža plošča hranilnega agarja

### Potek vaje:

Iz trdega gojišča z mešano kulturo izberite eno izmed kolonij in jo izolirajte v čisti kulturi z redkim cepljenjem na svežo ploščo do posameznih kolonij.

### Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje ter narišite poraslo kulturo na svoji plošči. Koliko tipov kolonij opazite? Ali je kultura čista? Kaj je potrebno storiti v primeru, da kultura še zmeraj ni čista? Diskusija.

## Gojenje bakterij in ugotavljanje velikosti mikrobnih populacij

### Gojenje bakterij

Rast bakterij pomeni rast in povečevanje števila celic. Za gojitev bakterij potrebujemo:

- primerna gojišča (potrebno je zagotoviti hranila in vir energije),
- ustrezen pH okolja,
- inkubacijo pri ustrezni temperaturi in
- pravilno aeracijo.

### Hranila

Količina in kvaliteta hranilnih snovi imata ključen pomen za hitrost celične rasti in s tem za rast mikroorganizmov. S hranljivimi snovmi bogato in po sestavi pestro okolje omogoča učinkovitejšo energetsko presnovo in biosintezo celičnih sestavin – torej učinkovito celično in populacijsko rast.

Ključne molekule rastnih potreb (t.i. hranila) so: C, N, O, P, S. Te celica akumulira v elementarni obliki ali v molekularnih agregatih.

#### *Izvor C:*

Pri avtotrofih je to CO<sub>2</sub>, pri heterotrofih pa organske molekule, pri čemer so številne bakterije usposobljene izdelovati svoje organske molekule iz zelo številnih in različnih virov ogljika. Npr. sevi vrste *Pseudomonas*, ki so značilni talni organizmi lahko rastejo na ogljikovodikih, številnih sladkorjih, maščobah, polisaharidih in dr.

#### *Izvor N:*

Značilna bakterijska celica je sestavljena v 15 % iz dušika (v beljakovinah, nukleinskih kislinah, celični steni). Večina bakterij sprejema ali amino skupine ali amoniak ali nitrat. Nekatere bakterije pa lahko celo fiksirajo atmosferski dušik in tvorijo amoniak.

#### *Izvor P:*

V glavnem je na voljo kot fosfatni ion ali pa kot organsko vezan fosfor (npr. v nukleinskih kislinah). Kadar ga primanjkuje je fosfor omejevalec rasti (zato ga celice pogosto skladiščijo).

#### *Izvor S:*

Žveplo je potrebno za sestavljanje aminokislin in za nekatere vitamine. Je na voljo kot sulfat (SO<sub>4</sub><sup>-</sup>) ali sulfid (S<sup>-</sup>).

*Mikronutrienti:*

K, Mg, Ca, Fe so potrebni v majhnih a pomembnih količinah in so udeleženi kot kofaktorji v številnih encimih in celičnih strukturah.

Prvine v sledovih: Co, Zn, Mo, Cu, Mn, Ni, W, Se so potrebne za manjše število encimov.

*Vir energije*

Bakterijske vrste se razlikujejo glede na izrabo virov energije. Organotrofi pridobivajo energijo iz organske snovi, litotrofi uspejo za energetske potrebe izkoriščati neorganske molekule, obojim pa pravimo, da so kemotrofni mikroorganizmi. Le-ti se bistveno razlikujejo od mikroorganizmov, ki so sposobni za svoje energetske potrebe porabljati svetlobo in jim pravimo fototrofni mikroorganizmi.

*Pogoji za rast mikroorganizmov*

Mikroorganizmi potrebujejo za rast, enako kot vsi organizmi, določene pogoje. Te pogoje lahko delimo v dve skupini:

**1. fizikalni pogoji**

- *temperatura* (Bakterije gojimo pri temperaturi, pri kateri je njihova rast optimalna. Glede na višino optimalne temperature delimo mikroorganizme v tri skupine: psihofilni mikroorganizmi, ki rastejo pri nizkih temperaturah od  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; mezofilni mikroorganizmi imajo optimalno temperaturo rasti med  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$  in termofilni mikroorganizmi pa imajo optimalno temperaturo med  $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .)
- *kislost okolja* (Večina bakterij živi v območju pH, ki je blizu nevtralnemu med pH 6,5 in pH 7,5. Druge so prilagojene na bolj ekstremne vrednosti: acidofili rastejo pri pH 4 pa vse do pH 1, alkalofili pa pri vrednosti pH 9 do 10.)
- *osmotski pritisk*

**2. kemijski pogoji**

- *vodna aktivnost* (Voda je nujno potrebna za rast mikroorganizmov. Razen tega, da deluje kot topilo, služi kot vir kisika in vodika ter kot zaščita pred temperaturnimi spremembami. Količino vode, ki jo bakterije lahko izrabljajo, izražamo kot vodno aktivnost ( $a_w$ ). Optimalna vrednost vodne aktivnosti za večino vrst bakterij je nad 0,99.

Nekatere halofilne bakterije rastejo le pri višji koncentracijah NaCl, ki znižajo vodno aktivnost na 0,88.

- *hranila* (Ključna hranila za rast mikroorganizmov so: C, N, O, P, S ter mikronutrienti.)
- *kisik in drugi plini* (Atmosfera, v kateri gojimo bakterije, je vir končnih akceptorjev elektronov (O<sub>2</sub>), vir substratov za oksidacijo (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO) in vir dušika ter CO<sub>2</sub>. Nekatere bakterije rastejo le v atmosferi z več CO<sub>2</sub> (kapnofilne bakterije). Organizme, ki uporabljajo molekularni kisik, imenujemo **aerobni** organizmi. **Obligatno aerobni** so tisti, ki zaživiljenje nujno potrebujejo kisik. Organizme, ki sicer potrebujejo kisik, vendar lahko rastejo tudi, če kisik ni prisoten imenujemo **fakultativno aerobni** organizmi. **Obligatno anaerobni** so tisti mikroorganizmi, ki niso sposobni uporabiti molekularnega kisika za reakcijo pridobivanja energije. Ti mikroorganizmi pretvarjajo kisik v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ki lahko poškoduje celice).
- *rastni faktorji* (Organski rastni faktorji (aminokisljine, purini, pirimidini, vitamini itd.) so esencialne organske snovi, ki jih organizem sam ne more sintetizirati. Dobiti jih mora iz okolja).

#### Hranilne podlage ali gojišča

Hranilne podlage so hranilne snovi, pripravljene za gojenje mikroorganizmov v laboratorijskih razmerah. Kot gojišča bi lahko označili vse snovi, na ali v katerih lahko rastejo mikroorganizmi. Gojišča, ki se uporabljajo v mikrobiologiji, so številna in raznolika, saj so prilagojena potrebam mikroorganizmov in načinu uporabe (izolacija, vzdrževanje, namnoževanje in karakterizacija kulture).

Gojišča so vodne raztopine snovi, ki jih določena bakterija potrebuje za rast. Glede na sestavo jih delimo na **kompleksna** (ne poznamo njihove natančne kemijske sestave) in **definirana** (vsebujejo točno določene koncentracije čistih kemikalij in se uporabljajo pri študiju mikrobnega metabolizma npr. Chujevo gojišče).

## Ugotavljanje velikosti mikrobnih populacij

Poznamo več načinov za določanje števila mikrobnih celic. Pri nekaterih metodah merimo število živih celic, pri drugih pa težo celotne populacije, ki je neposrdno sorazmerna s številom celic. Število celic običajno izražamo kot število celic v 1 ml tekočega vzorca ali v 1 g živila. Večina metod štetja temelji na neposrednem ali posrednem štetju majhnih vzorcev. Velikost celotne bakterijske populacije se nato izračuna.

### 1. Indirektne ali gojitvene metode

a) Štetje na trdnih gojiščih je najpogosteje uporabljena metoda štetja celic. Ta metoda se uporablja predvsem za ugotavljanje števila mikroorganizmov v tekočinah (voda, mleko, itd.) in v materialih, ki jih je mogoče suspendirati v tekočini. Pri tej metodi štejemo žive celice. V preiskovanem materialu je navadno preveč bakterij, da bi jih lahko šteli in je zato treba material ali kulturo najprej redčiti ter primerne razredčine cepiti na plošče hranilnega agarja. Gojitveni pogoji (temperatura, čas inkubacije ter uporabljena gojišča) so odvisni od bakterij, na katere se material preiskuje. Po 24 – 48-urni inkubaciji pri določeni temperaturi (najpogosteje pri 30 °C ali 37 °C) kolonije preštejemo. Običajno štejemo na ploščah, ki imajo od 25 do 300 kolonij.

Število kolonij, ki zrastejo na plošči hranilnega agarja ni zmeraj enako številu bakterij v kulturi. Zato pravimo, da na plošči preštejemo enote, ki tvorijo kolonije (colony forming units, CFU).

*Primer ugotavljanja števila bakterij s štetjem na ploščah:*

Iz vsake od treh epruвет z razredčinami  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  in  $10^{-9}$  smo cepili po 1 ml na vsako od treh plošč. Po inkubaciji smo prešteli naslednje število kolonij:

končna redčenja na ploščah	število kolonij
$10^{-7}$	201, 187, 223
$10^{-8}$	17, 25, 19
$10^{-9}$	3, 2, 1
	$\Sigma = 678$

Izračun povprečnega števila kolonij:

1. način:

Potrebno je izračunati povprečje za vsako razredčino posebej in nato še povprečje vseh razredčin.

$$\text{Za razredčino } 10^{-7}: \frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}} = \frac{620}{3} = 206,66 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$\text{Za razredčino } 10^{-8}: \frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}} = \frac{61}{3} = 20,33 \cdot 10^8 = 203,33 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$\text{Za razredčino } 10^{-9}: \frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}} = \frac{6}{3} = 2 \cdot 10^9 = 200 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$\frac{\sum \text{vseh pop. posamezne razred.}}{\text{št. razred.}} = \frac{206,66 \cdot 10^7 + 203,33 \cdot 10^7 + 200 \cdot 10^7}{3} = 203,32 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

2. način:

Če predpostavimo, da so vsa redčenja enakovredna, lahko dodamo številu prešteti kolonij drugega redčenja eno ničlo, številu kolonij tretjega pa dve ničli. Dobljeno vsoto vseh kolonij delimo s številom meritev in dobimo povprečno število kolonij.

Za razredčino  $10^{-7}$ : 201, 187, 223

Za razredčino  $10^{-8}$ : 170, 250, 190

Za razredčino  $10^{-9}$ : 300, 200, 100

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij}}{\sum \text{vseh paralelk}} = \frac{(201 + 187 + 223) \cdot 10^7 + (170 + 250 + 190) \cdot 10^7 + (300 + 200 + 100) \cdot 10^7}{9} =$$

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij}}{\sum \text{vseh paralelk}} = 192,33 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

3. način:

Če predpostavimo, da vsa redčenja niso enakovredna, saj se napaka z vsakim višjim redčenjem veča, pa lahko število CFU ugotavljamo tudi tako, da najbolj razredčenemu vzorcu pripišemo največjo težo. Sešteti je potrebno vse kolonije, ki smo jih prešteli na ploščah agarja in vsoto deliti s številom, ki je odvisno od števila razredčitev in števila paralelk npr. tri



različne razredčine s po dvema paralelkama; N=222 oz. za naš primer; tri redčenja, vsako s tremi paralelkami N=333.

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij}}{N} = \frac{678}{333} \cdot 10^9 = 203,6 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

b) Metoda najverjetnejšega števila («Most probable number» (MPN))

Ta metoda temelji na opazovanju rasti mikroorganizmov (kot motnosti) in opazovanju metabolne dejavnosti mikroorganizmov (preko indikatorjev v tekočih gojiščih). To je metoda, pri kateri kulturo ali preiskovani vzorec cepimo v serijo tekočih gojišč in glede na število gojišč, v katerih ugotovimo bakterijsko rast z verjetnostnim računom, ugotavljamo približek za število bakterij v vzorcu. Ta metoda se rutinsko uporablja pri ugotavljanju števila koliformnih bakterij v vodi.

## **2. Direktne ali števne metode**

Pri teh metodah štejemo bakterijske celice v vzorcu, kar lahko delamo na mikroskopskih preparatih ali s posebnimi napravami (npr. Coulterjev števec delcev). Za takšno štetje uporabljamo objektne ploščice s števnimi komorami. Na označen kvadrat razmažemo vzorec in ga pokrijemo s krovnim stekelcem. S pomočjo mikroskopa preštujemo število bakterij v kvadratih in izračunamo poprečno število mikroorganizmov v vzorcu.

## **3. Fizikalne in kemijske metode**

- *Turbidimetrija* – merjenje motnosti suspenzije – optična gostota (optical density, OD) s spektrofotometrom. Določena optična gostota ustreza določeni gostoti celic in zato se lahko optična gostota odčita z umeritvene krivulje kot število bakterij na ml.

- *Ugotavljanje suhe ali mokre teže bakterij.*

- *Ugotavljanje skupnega dušika.*

- *Membranska filtracija* – se uporablja za štetje bakterij v bistrih tekočih vzorcih (vodovodna voda, bistri sokovi, vino itd.) ter za štetje koliformnih bakterij, ki so kazalci fekalnih okužb živil in vode.

## **Ohranjanje mikroorganizemskih kultur**

Ločimo dva načina gojenja mikroorganizmov:

- *površinski način*, kjer se mikroorganizmi razvijejo na površini hranilnih podlag,
- *submerzijski način*, kjer se mikroorganizmi razvijejo potopljeni v tekočih hranilnih podlagah. Tako gojenje je lahko kontinuirano (v podlago neprekinjeno dotekajo sveže hranilne snovi in se odstranjujejo metabolni produkti).

Kulture, ki so se razvile na hranilnih podlagah, hranimo v temnih in hladnih prostorih (v hladilniku). Pri diskontinuiranem gojenju mikroorganizmov oz. gojenju mikroorganizmov na podlagi, mikroorganizmom med njihovo rastjo ne dodajamo hranilne snovi in ne odstranjujemo metabolnih produktov mikroorganizmov. V takih razmerah so zato mikroorganizmi odvisni samo od določene količine hranilne snovi.

Da bi preprečili izroditev ali celo izumiranje kulture, je le to potrebno precepiti na sveže podlage. Pogostost precepljanja je odvisna od občutljivosti kulture (enkrat na teden, enkrat na mesec ...). Čiste kulture lahko ohranjamo tudi v obliki trajnih kultur, ki se lahko ohranijo pri življenju tudi po več let.

Trajne kulture lahko pripravimo na več načinov:

- z zmrzovanjem (čiste kulture hitro zmrznemo pri temperaturi od  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$  v ustrezni raztopini sladkorjev ali krioprotektorjev,
- z liofilizacijo (suspencijo mikroorganizmov hitro zmrznemo pri temperaturi od  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$  in z vakuumom odstranimo vodo,
- z dehidracijo,
- kulturo lahko hranimo tudi na sterilnem pesku ali glini.

### **VAJA 3: Priprava hranilnih medijev za gojenje bakterij in gliv**

#### **Trdi medij za gojenje bakterij (mesni medij)**

- 5 g mesnega peptona
- 3 g mesnega ekstrakta
- 0,5 g NaCl
- 5 g D-(+)-glukoze
- 18 g agarja
- 1 l navadne vode

Vse sestavine zatehtamo v 1000 ml bučko in dolijemo 1 l navadne vode. Bučko z raztopino potopimo v vrelo vodno kopel ter jo ob intenzivnem mešanju segrevamo dokler v raztopini ni več opaziti delcev.

#### **Tekoči medij za gojenje bakterij (mesni medij)**

- 5 g mesnega peptona
- 3 g mesnega ekstrakta
- 0,5 g NaCl
- 5 g D-(+)-glukoze
- 1 l navadne vode

Vse sestavine zatehtamo v 1000 ml bučko in dolijemo 1 l navadne vode. Bučko z raztopino potopimo v vrelo vodno kopel ter jo ob intenzivnem mešanju segrevamo dokler raztopina ne postane popolnoma bistra.

**Krompirjev agar za glive**

- 39 g krompirjevega dekstroznega agarja (PDA)

Agar zatehtamo v 1000 ml bučko in dolijemo 1 l navadne vode. Bučko z raztopino potopimo v vrelo vodno kopel ter jo ob intenzivnem mešanju segrevamo dokler v raztopini ni več opaziti delcev.

## **VAJA 4: Ugotavljanje števila bakterij s štetjem na ploščah**

### Material:

- bakterijska kultura na poševnem gojišču
- sterilne petrijevke
- sterilna raztopina hranilnega agarja
- epruvete s sterilno fiziološko raztopino (0,9 % NaCl)

### Potek vaje:

- V 1. epruveto dodajte 1 ml fiziološke raztopine NaCl v katero smo predhodno inokulirali bakterijsko kulturo. Z novo pipeto suspenzijo premešajte in prenesite v naslednjo epruveto 1 ml.
- Postopek ponovite še 6-krat in vsakič zamenjajte pipeto.
- 1 ml iz vsake redčene kulture iz zadnjih treh epruvet odpipetirajte v sterilno petrijevko ter prelijte s hranilnim agarjem, katerega temperatura ne sme presegati 60 °C. Petrijevko pazljivo pretresite, da se razredčina kulture enakomerno porazdeli po petrijevki. Na plošči označite končno redčenje! Inkubirajte pri določeni temperaturi dva dni.

### Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje, preštete kolonije v posameznih razredčinah ter izračunajte velikost bakterijske populacije. Diskusija.

## **VAJA 5: Ohranitev mikroorganizemskih kultur**

### Material:

- bakterijska kultura na poševnem gojišču
- sterilno poševno gojišče za bakterije

### Potek vaje:

- V desno roko primemo epruveto z bakerijsko kulturo zraslo na poševnem gojišču in epruveto s sterilnim poševnim gojiščem za bakterije. Obema epruvetama smo predhodno prežareli vratove na plinskem gorilniku, da preprečimo možnost kontaminacije.
- Z desno roko odstranimo pokrove epruвет in s prežarjeno ezo, ki smo jo ohladili na zraku, potegnemo narahlo po gojišču z zraslo kulturo. Ezo s kulturo prenesemo v sveže poševno gojišče in jo cepimo na površino svežega gojišča.
- Po končanem precepljanju epruветi z gojišči zapremo s pokrovi in jima ponovno prežarimo vratove. Prav tako prežarimo še ezo.
- Gojišče s sveže precepljeno kulturo inkubiramo pri temperaturi 28 °C 2-3 dni. Kulturo po končani inkubaciji shranimo v hladilnik.

### Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje ter opažanja.

## Ocena učinkovitosti antiseptikov in razkužil

Protimikrobna sredstva lahko v grobem delimo na **fizikalna** (temperatura, sevanja) in **kemijska** (razkužila, antiseptiki, antibiotiki).

Kot antiseptike in razkužila uporabljamo različne snovi, ki bakterije uničujejo – delujejo nanje *baktericidno* ali pa zavirajo bakterijsko rast – delujejo *bakteristatično*.

V mikrobiološkem laboratoriju uporabljamo razkužila (dezinficiense) za ubijanje mikrobov na površinah, opremi, priboru in steklovini ter antiseptike za razkuževanje rok.

Nekatera pogosteje uporabljena razkužila so:

- *klorovi preparati* – na mikrobov delujejo baktericidno, ker so močni oksidanti. Primerni so za laboratorijske površine, manj pa za kožo, ker jo močno izsušijo.
- *fenol* – je organski dezinficiens in se uporablja za standard, s katerim se primerja moč razkužil (fenolovo število pove, za kolikokrat je razkužilo učinkovitejše od 1-odstotne raztopine fenola). Moč dezinficiensov je mogoče ugotavljati tudi z drugimi metodami.
- *formaldehid* – v plinskem stanju se uporablja za dezinfekcijo prostorov, kot formalin (5 % vodna raztopina formaldehida) pa kot tekoč dezinficiens. Pogosto ga dodajajo v kombinirane dezinficiense.
- *kislina* – zaradi disociacije kisline znižajo pH in razkrajajo beljakovine. Za dezinfekcijo se uporabljajo peroksiocetna kislina, ki deluje oksidativno, redkeje pa tudi solna in žveplena kislina.
- *lugi* – hidrolizirajo beljakovine in ogljikove hidrate. Od močnejših lugov se uporablja predvsem NaOH pri izbruhih posebno nevarnih infekcij.
- *alkoholi* – za razkuževanje rok se uporablja etanol (70 %) in propanol (60–70 %). V kozarec z etanolom odlagamo tudi pincete in škarje, kadar pripravljamo razmaze ali cepimo kužnino na gojišča.
- *kalijev permanganat* – uporabljamo kot dezinficiens predvsem pri prvi pomoči za razkuževanje kože in ran. Deluje kot oksidant.
- *vodikov peroksid* – se uporablja za razkuževanje kože in ran. Deluje kot oksidant.
- *jodovi preparati* – najpogosteje se uporablja jodova tinktura za razkuževanje kože, operacijskih površin in ran.

- *detergenti* – kationske detergente, predvsem kvarterne amonijeve baze uporabljamo za razkuževanje rok v laboratoriju. Sicer pa detergente uporabljamo bolj za čiščenje kot za dezinfekcijo.
- *drugi dezinficijensi* – sem prištevamo soli težkih kovin (npr. živega srebra), ki prav tako delujejo dezinfekcijsko.

Pri izbiri protimikrobnega sredstva moramo upoštevati različne dejavnike, kot so pH, topnost, toksičnost, učinkovitost (uničuje vegetativnih celic, uničevanje spor), vpliv na organske materiale, korozivnost, itd.

Kadar uporabljamo določeno protimikrobno sredstvo, je potrebno uporabiti najvišjo koncentracijo, ki še ni škodljiva in le tega pri dolgotrajni uporabi po določenem času uporabe zamenjati z drugim sredstvom.

Učinkovitost protimikrobnih sredstev lahko ugotavljamo na različne načine.

Difuzijska metoda je podobna antibiogramu. Razkužila nanesemo na sterilne diske ali v posebne kovinske nastavke in jih nato položimo na ploščo s kulturo. Po končani inkubaciji merimo cone inhibicije.

Test z nosilcem se uporablja za določanje učinkovitosti razkužil za razkuževanje predmetov. Kontaminirani predmet izpostavimo razkužilu različnih koncentracij za daljši časovni interval (od 2 do 20 minut). Za ugotavljanje učinkovitosti kemikalij na osnovi fenola se uporablja fenolni koeficient, kjer se primerja delovanje fenola in testirane kemikalije na določeni testni organizem.



## **VAJA 6: Inhibicija rasti mikroorganizmov**

### Material:

- glivična kultura
- epruvete s sterilno fiziološko raztopino NaCl (1 x 9 ml in 2 x 10 ml)
- inhibitor rasti
- 9 petrijevke
- sterilni agar za gojenje gliv

### Potek vaje:

- V sterilne petrijevke prelijemo po 19 ml sterilnega agarja za gojenje gliv, ki smo ga predhodno segreti – utekočinili ter ga enakomerno porazdelimo.
- Petrijevke z agarjem postavimo v hladilnik za 30 minut, da se agar ponovno strdi.
- V epruveto z 10 ml sterilne fiziološke raztopine NaCl inokuliramo glivično kulturo. V drugo epruveto z 9 ml sterilne fiziološke raztopine prav tako cepimo glivično kulturo. Po inokulaciji dodamo v epruveto še 1 ml raztopine inhibitorja rasti.
- V strjen agar naredimo luknjo premera 10 mm, v katero nato odpipetiramo po 100 µl predhodno pripravljenih raztopin:
  - v prve tri petrijevke raztopino glivične kulture,
  - v druge tri petrijevke raztopino glivične kulture z dodanim inhibitorjem in
  - v tretje tri petrijevke sterilno fiziološko raztopino.
- Gojišča inkubirajte pri 28 °C. Po dveh dneh inkubiranja preverite rast mikroorganizma v posameznih petrijevkah. Petrijevke z gojišči pustite inkubirat še nadaljnih 6 dni.

### Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje ter tabelarično podajte rezultate meritev rastnega premera gliv. Kaj vam povejo rezultati dobljeni za vzorec fiziološke raztopine? Diskusija.

## **VAJA 7: Primerjava učinkovitosti različnih razkužil**

### Material:

- različne bakterijske kulture
- komercialna razkužila
- 0,5 % vodna raztopina fenola
- 70 % alkohol
- jodova tinktura
- prazni epruveti
- deset epruvete s hranilno juho
- pipete

### Potek vaje:

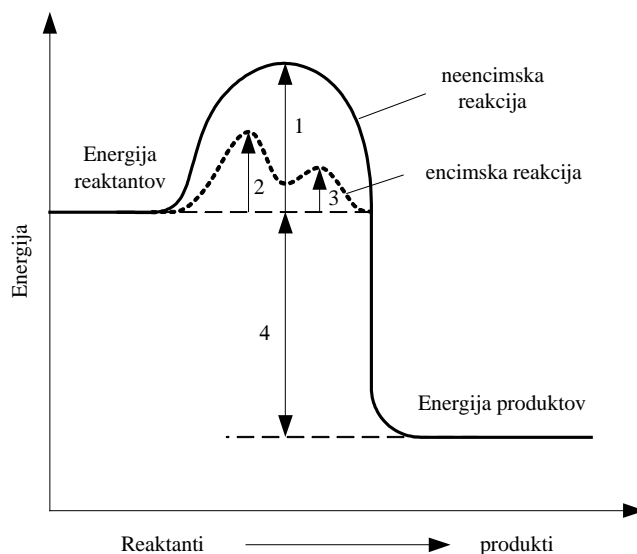
- 5 ml fenola in 5 ml izbranega razkužila je potrebno odpipetirati v dve prazni sterilni epruveti. Komercialno razkužilo je potrebno predhodno redčiti.
- Za vsako od obeh razkužil pripravite pet epruvet s hranilno juho. Nanje je potrebno napisati ime razkužila in čas 0, 2, 5, 10 in 20 minut.
- Odpipetirajte 0,5 ml bakterijske kulture v epruveto z razkužilom. Mešanico rahlo premešajte in takoj prenesite eno zanko kulture, inkubirane v razkužilu, v epruveto z gojiščem (čas 0).
- Po 2, 5, 10 in 20 minutah prenesite polno zanko kulture, inkubirane v razkužilu, v ustrezne epruvete z gojiščem.
- Testne epruvete je potrebno inkubirati na temperaturi 37 °C 48 ur.

### Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje ter tabelarično podajte rezultate rasti bakterij po 48 urni inkubaciji. Tabelarični prikaz naj zajema tudi rezultate preostalih skupin. Z znakoma + (rast) in – (ni rasti) označite ali je v določeni epruveti kultura začela rasti ali ne. Čemu je potrebna kontrola pri času 0? Katera izmed testiranih kemikalij je najbolj učinkovita? Katera izmed bakterijskih vrst je najbolj odporna proti delovanju uporabljenih razkužil? Diskusija.

## ENCIMSKO KATALIZIRANE REAKCIJE

Velik del kemijskih reakcij ne poteka dovolj hitro. Potrebno aktivacijsko energijo za kemijske reakcije najpogosteje dovajamo s segrevanjem, kar vodi do povišanja temperature reakcijske zmesi. Možna pot pa so tudi katalizatorji. Ti namreč znižujejo potrebno količino aktivacijske energije ter tako omogočajo potek reakcij, ki ob istih energetskih pogojih ne bi bile možne. Katalizatorji pospešujejo kemijske procese in se pri tem ne porablajo. To pomeni, da katalizatorji vstopijo v sam proces, in ko je ta končan, izstopijo iz njega nespremenjeni. Encimi so zelo aktivni katalizatorji, ki pospešijo reakcijo tudi do  $10^{29}$  krat in zaradi tega v reakcijskem mediju delujejo uspešno v malih količinah. Reakcijo vodijo po drugi (ponavadi večstopenjski) poti, ki terja nižjo aktivacijsko energijo, torej energijo, potrebno, da pri trkih med delci pride do reakcije. Reakcije v živih organizmih se morajo odvijati po principu znižanja aktivacijske energije, kar se dogaja s pomočjo biokemijskih katalizatorjev, encimov. Slika 4 prikazuje zniževanje aktivacijske energije s katalizatorji.



- 1 – aktivacijska energija neencimske reakcije
- 2 – aktivacijska energija za tvorbo kompleksa encim – substrat
- 3 – aktivacijska energija za encimsko reakcijo
- 4 – sprememba notranje energije ( $\Delta G$ )

**Slika 4:** Znižanje aktivacijske energije s katalizatorji.

Potek encimske katalize lahko razdelimo v tri faze:

1. v prvi fazi se stvori kompleks encim – substrat, ki ima nižjo aktivacijsko energijo kot sam substrat. Nastajanje kompleksa mora biti hitro in reverzibilno;
2. v drugi fazi nastane produkt, ki je vezan na aktivno mesto encima – nastane torej kompleks encim – produkt;
3. v tretji fazi nastopi "osvobajanje" produkta. Kompleks encim – produkt razpade v encim + produkt. Tako se encim regenerira in lahko ponovno vstopi v reakcijo s substratom.

### **Specifičnost encimske katalize**

Za razliko od anorganskih katalizatorjev, kot so kisline, baze, kovine in kovinski oksidi, encimi kažejo lastnosti specifičnosti. Nekateri encimi so strogo specifični in delujejo samo na en določen substrat, drugi so manj specifični in katalizirajo več različnih reakcij, nekateri pa so specifični samo za neko skupino substratov. Specifičnost encimov je pogojena z dvema dejavnikoma:

1. *geometrijsko ujemanje encima in substrata*: molekula substrata se mora natančno prilegati v "kalup" encima;
2. *ujemanje v naboju in možnost približanja nabitih delov*: naboja encima in substrata z nasprotnim predznakom se morata čim bolj približati.

### **Faktorji, ki vplivajo na encimsko katalizirane reakcije**

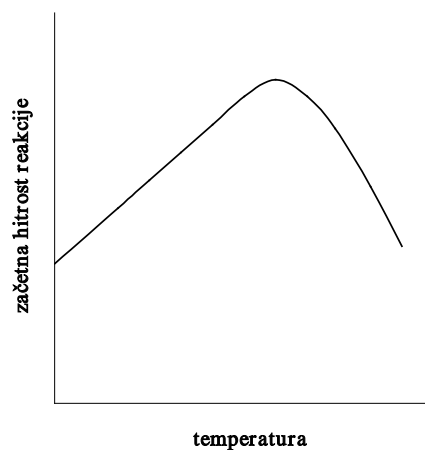
Encimsko katalizirane reakcije so odvisne od vrste faktorjev, ki vplivajo na samo delovanje encimov. Ker so encimi proteini, so zelo občutljivi na visoko temperaturo in delujejo samo v določenem temperaturnem intervalu. Pri nižjih temperaturah so bistveno manj aktivni, pri višjih pa se lahko denaturirajo. Naboj encimov je odvisen od pH, zato delujejo samo v določenem območju pH. Na encimsko katalizirane reakcije poleg temperature in pH vplivata tudi koncentracija encima in substrata.

## Vpliv temperature na hitrost encimsko katalizirane reakcije

Pri povišani temperaturi encimsko katalizirane reakcije so dogajata dve stvari:

1. Poveča se hitrost reakcije, tako kot pri večini kemijskih reakcij.
2. Stabilnost proteina se zmanjša zaradi termične deaktivacije. Fizikalni mehanizem za ta fenomen je naslednji: z zviševanjem temperature imajo atomi v molekulah encima višjo energijo in s tem večjo tendenco h gibanju. Torej pridobijo dovolj energije, da le-ta preseže energijo šibkih interakcij, zaradi katerih se obdrži globularna struktura proteina. Temu sledi deaktivacija, ki je lahko reverzibilna, ireverzibilna ali kombinirana.

Za odvisnost začetne hitrosti reakcije od temperature dobimo krivuljo zvonaste oblike, katere maksimum je časovno odvisen (Slika 5.). Zato je pojem temperaturni maksimum točno določen s temperaturnimi parametri.



**Slika 5:** Vpliv temperature na hitrost reakcije.

Iz Arrheniusovega grafa lahko razberemo do katere temperature se aktivnost encima povečuje in pri kateri temperaturi nastopi deaktivacija encima.

Arrheniusova enačba (1) opisuje temperaturno odvisnost aktivnosti encima:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}} \quad (1)$$

kjer je :

$A$  – Arrheniusova konstanta,

$k$  - konstanta reakcijske hitrosti,

$E_a$  – aktivacijska energija,

$R$  – plinska konstanta,

$T$  – absolutna temperatura.

### **Esterifikacija očetne kisline z izoamil alkoholom**

Estri so eni izmed najpomembnejših razredov organskih komponent in jih je mogoče sintetizirati na različne načine:

- z reakcijo med alkoholi in karboksilnimi kislinami (esterifikacija) z odstranitvijo vode,
- z menjavo acilnih skupin med estri in kislinami (acidoliza),
- z menjavo acilnih skupin med estri in alkoholi (alkoholiza) ali glicerolom (gliceroliza),
- z menjavo acilnih skupin med estri (transesterifikacija).

Produkti esterifikacije kislin z daljšo verigo (12–20 ogljikovih atomov) in višjih alkoholov (z daljšo verigo) se uporabljajo kot maziva za stroje in kot mehčalci za zelo natančne stroje.

Estri, dobljeni z reakcijo med kislinami z daljšo verigo (12–20 ogljikovih atomov) in nižjimi alkoholi (3–8 ogljikovimi atomi), se uporabljajo kot dodatki v prehrabeni, kozmetični, farmacevtski industriji in industriji detergentov.

Produkti med kislinami s kratko verigo (2–8 ogljikovih atomov) in alkoholi so pomembne arome in komponente dišav v prehrabeni, kozmetični, farmacevtski industriji in industriji pijač.

Etil-, izopropil-, butil-, izobutil- in amil acetati se uporabljajo pri proizvodnji lakov zaradi dobre hlapljivosti.

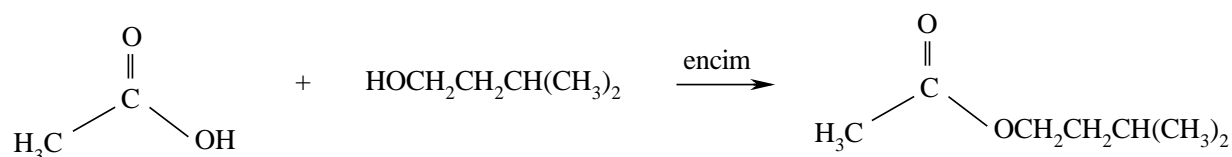
Etil-, izobutil-, amil- in izoamil acetati se pogosto uporabljajo tudi kot komponente za dišave in arome, izopropil-, benzil-, oktil- ter metilni estri pa kot dodatki k parfumom.

Izoamilni estri (posebej izoamil acetat) so aroma estri in so pomembni tudi s komercialnega vidika v prehrabeni industriji (74 000 kg/leto) zaradi močne arome banane.

Večina enostavnih estrov na tržišču je sintetičnega izvora. Estri so v velikih količinah prisotni tudi v naravi (v maščobah, oljih in voskih). Ponavadi se pridobivajo s kemijskimi reakcijami med alkoholom in organsko kislino v prisotnosti kislinskega katalizatorja ali pri ekstrakciji iz naravnih materialov. Naravni produkti, dobljeni z drugo metodo, so zelo dragi in ne zadovoljujejo količinskim potrebam tržišča.

Biotehnološka proizvodnja aroma estrov z encimsko kataliziranimi reakcijami (Slika 6.) je pridobila močno na pomenu v primerjavi s klasičnimi kislinskimi katalizatorji, predvsem na področju proizvodnje naravnih arom in dišav.

Vzrok za to je v regio- in stereospecifičnosti večine encimov, milih reakcijskih pogojih in sprejemljivosti tako sintetiziranih produktov tudi v prehrabeni industriji.



**Slika 6:** Encimsko katalizirana esterifikacija med očetno kislino in izoamil alkoholom.

Pri sintezi aroma estrov se kot katalizatorji uporabljajo encimi lipaze (EC 3.1.1.3), ki spadajo v razred hidrolaz.

Le-ti so lahko prosti (nativni) ali imobilizirani na različne nosilce (smole itd.). Prednost imobiliziranih encimov pred neimobiliziranimi je predvsem v možnosti večkratne uporabe, enostavni ločitvi od reakcijske zmesi in največkrat tudi v boljši termični obstojnosti. Čeprav

znižajo obratovalne stroške (možnost večkratne uporabe), pa je njihova nabavna vrednost dokaj visoka.

Lipaze, kakor tudi druge encime, lahko pridobivamo iz različnih virov. Tako npr. so lipaze lahko živalskega izvora (trebušna slinavka) ali mikrobnega izvora npr. iz gljiv (vrsta: *Rhizopus*) ali iz kvasovk (npr. rod: *Candida*) itd.



## **VAJA 8: Proučevanje vpliva temperature na potek sinteze izoamil acetata in na aktivnost encima**

### Material:

- očetna kislina (3,6 M)
- izoamil alkohol
- NaOH (0,1 M)
- 0,1 % raztopina fenolftaleina v etanolu
- nativni ali imobilizirani encim
- pipete
- vodna kopel
- bučka s povratnim hladilnikom

### Potek vaje:

- Reakcijska zmes vsebuje izoamil alkohol in očetno kislino v množinskem razmerju 2 proti 1.
- Reakcijsko zmes inkubirajte v reakcijski bučki s povratnim hladilnikom v vodni kopeli pri dani temperaturi.
- Iz inkubirane raztopine odvezajte pri času  $t_0$  0,5 ml vzorca (slepi vzorec) in ga analizirajte po spodaj opisanem postopku.
- Nato dodajte 5 % (g/g substrata) imobiliziranega ali prostega encima lipaze (Novozym 435 - NOVO Nordisk, Danska). V trenutku, ko dodate encim v reakcijsko zmes, začnite meriti čas reakcije.
- Nato jemljite po 0,5 ml vzorca iz reakcijske zmesi v sledečem časovnem zaporedju: 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 3,5 h in 4 h.
- Vzorčite s pipeto v centrifugirke. Vsak vzorec sproti analizirajte po spodaj opisani metodi.

### Analizna metoda

#### **Določanje prostih kislin s titracijsko metodo**

Vsebnost prostih kislin v reakcijski zmesi se lahko določi s titrimetrično metodo. 0,1 g vzorca je potrebno zatehtati v erlenmajerico in razredčiti z 20 ml raztopine 0,1 % fenolftaleina v etanolu ter titrirati z 0,1 M NaOH.

Vsebnost prostih kislin lahko izračunamo iz enačbe 2:

$$\% \text{ (PK)} = \frac{V \cdot N \cdot M_K}{10 \cdot m} \quad (2)$$

kjer je:

$M_K$  – molska masa kisline ( $M=60,031$  g/mol),

$V$  – volumen porabljenega NaOH ( $\gamma=0,1$  mol/l),

PK – utežni % kisline,

$m$  – masa zatehtanega vzorca (g),

$N$  – normaliteta NaOH (0,1 N).

#### **Izračun koncentracije nastalega estra**

V določenih časovnih intervalih je potrebno meriti vsebnost prostih kislin v vzorcih, katere je potrebno predhodno stehtati. S pomočjo spodaj navedenih enačb lahko izračunamo koncentracijo nastalega estra.

##### **a) V primeru uporabe nativnega encima**

Pred pričetkom reakcije v času  $t = 0$  je bilo prisotnih:

$$\begin{array}{lcl} \mathbf{a} \text{ mol alkohola} & = n_a \cdot M_A & = \mathbf{A} \text{ g} \\ \mathbf{k} \text{ mol očetne kisline} & = n_k \cdot M_K & = \mathbf{K} \text{ g} \\ & \text{skupno} & = \mathbf{G_0} \text{ g} \end{array}$$

Prisoten encim se v reakcijski zmesi raztaplja in tako ostaja razmerje encim/substrat po vzorčenjih enako. Koncentracija encima in ostalih komponent tako s časom variira.

Z vsakim molom očetne kisline reagira 1 mol izoamil alkohola in nastane 1 mol estra in 1 mol vode.

Množino kisline ( $n_k$ ) in množino nastalega estra ( $n_e$ ) pri določenem času ( $t = t_n$ ) izračunamo po sledečih enačbah:

$$n_k(t = t_n) = \frac{\%PK(t = t_n) \cdot G_0}{M_K \cdot 100} \quad [\text{mol}] \quad (3)$$

$$n_e(t = t_n) = n_k(t = 0) - \frac{\%PK(t = t_n) \cdot G_0}{M_K \cdot 100} \quad [\text{mol}] \quad (4)$$

Koncentracija posameznih komponent ( $c_k$  - množinska koncentracija kisline;  $c_e$  - množinska koncentracija estra) v času  $t = t_n$ :

$$c_k(t = t_n) = \frac{\%PK(t = t_n)}{M_K \cdot 100} \quad [\text{mol/g}] \quad (5)$$

$$c_e(t = t_n) = \frac{n_k(t = 0)}{G_0} - \frac{\%PK(t = t_n)}{M_K \cdot 100} \quad [\text{mol/g}] \quad (6)$$

**b) V primeru uporabe imobiliziranega encima**

V primeru uporabe imobiliziranega encima se koncentracija encima s časom ne spreminja. Koncentracija ostalih komponent s časom variira. Pri izračunu je potrebno upoštevati da, razmerje substrat/encim ni konstantno ves čas reakcije.

Pri času  $t = t_1$  se je masa reakcijske zmesi zmanjšala za maso odvzetega vzorca ( $\Delta g_1$ ).

$$G'_0(t = t_1) = G_0(t = 0) - \Delta g_1 \quad [\text{g}] \quad (7)$$

.....  
.....

za  $t = t_n$        $G'_0(t = t_n) = G'_0(t = t_{n-1}) - \Delta g_n$

Množini posameznih komponent po odvzemu vzorca sta

$$n'_k(t = t_n) = n_k(t = t_n) - \Delta g_n \cdot c_k(t = t_n) \quad [\text{mol}] \quad (8)$$

$$n'_e(t = t_n) = n_e(t = t_n) - \Delta g_n \cdot c_e(t = t_n) \quad [\text{mol}] \quad (9)$$

Za izračun množin  $n_k(t = t_n)$  in  $n_e(t = t_n)$  uporabimo enačbi 3 in 4.

Koncentraciji obeh komponent pri času  $t = t_n$  določimo po naslednjih enačbah:

$$c_k(t = t_n) = \frac{n'_k(t = t_n)}{G'_0(t = t_{n-1})} \quad [\text{mol/g}] \quad (10)$$

$$c_e(t = t_n) = \frac{n'_e(t = t_n)}{G'_0(t = t_{n-1})} \quad [\text{mol/g}] \quad (11)$$

Potrebno je upoštevati še maso encima v reakcijski zmesi, ki je ves čas reakcije konstantna. Tako se koncentracija produkta v primeru uporabe imobiliziranega encima izraža kot koncentracija na gram encima:

$$\bar{c}_e(t = t_n) = \frac{n'_e(t = t_n)}{m_{\text{encima}} \cdot G'_0(t = t_{n-1})} \quad [\text{mol/g/g}_{\text{encima}}] \quad (12)$$

Rezultati in diskusija:

Na diagramu prikažite odvisnost koncentracije nastalega produkta od časa poteka reakcije pri različnih temperaturah. Določite začetno hitrost posamezne reakcije, narišate diagram odvisnosti začetne hitrosti od temperature in tabelarično podajte vse meritve, kot prikazuje tabela 1 ter navedite svoja opažanja in ugotovitve.

**Tabela 1:** Tabelarični prikaz rezultatov.

$t$ /h	$m_{\text{odvzetega vzorca}}$ /g	$m_{\text{zatehte za analizo}}$ /g	$V_{\text{NaOH}}$ /ml	PK /%
0	....			
0,083	....	....		
....	....	....		
4	....	....		

Prosti encim:

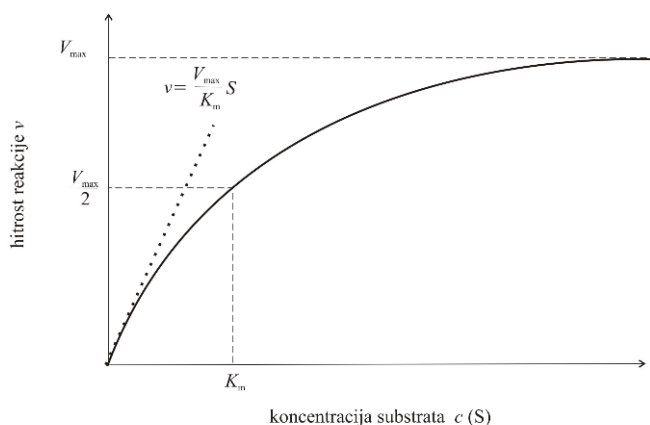
$t$ /h	PK /%	$n_k$ /mmol	$n_e$ /mmol	$c_k$ /(mmol/g)	$c_e$ /(mmol/g)
0	....				
0,083	....	....			
....	....	....			
4	....	....			

Imobilizirani encim:

$t/h$	PK /%	$n_k$ /mmol	$n'_k$ /mmol	$n_e$ /mmol	$n'_e$ /mmol	$c_k$ /(mmol/g)	$c_e$ /(mmol/g)	$\bar{c}_e$ /(mmol/g/g <sub>encima</sub> )
0	....							
...	....	....						....
....	....	....						....
4	....	....						

## Vpliv koncentracije substrata na hitrost encimsko katalizirane reakcije

V primeru encimske reakcije, ko je koncentracija encima nespremenjena, ima vsako povečanje koncentracije substrata za posledico povečanje začetne hitrosti vse do njene maksimalne vrednosti. Z nadaljnim povečevanjem koncentracije substrata se hitrost reakcije ne spreminja več. Pojavi se lahko inhibicija s substratom. Slika 7 prikazuje vpliv koncentracije substrata na hitrost kemijske reakcije. V trenutku, ko dosežemo maksimalno hitrost reakcije, se ves encim porabi za tvorbo kompleksa encim-substrat (ES).



**Slika 7:** Vpliv koncentracije substrata na hitrost kemijske reakcije.

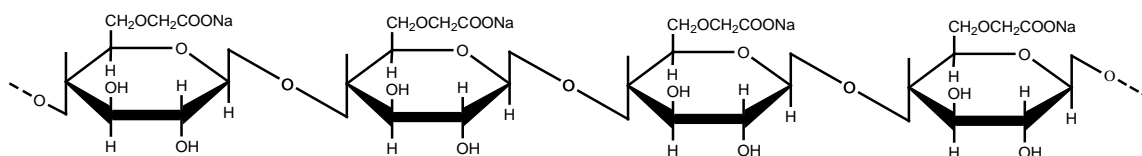
Hitrost reakcije kot funkcijo koncentracije substrata lahko opišemo z Michaelis-Mentenino enačbo 13:

$$\text{hitrost} = v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad (13)$$

$v_{\max}$  je maksimalna hitrost reakcije dosežena pri visokih koncentracijah substrata.  $v_{\max}$  in  $v$  sta izraženi v enotah nastalega produkta na enoto časa.  $K_M$  je Michaelis-Mentenina konstanta, ki predstavlja koncentracijo substrata, pri kateri je hitrost reakcije enaka polovici maksimalne hitrosti. Simbol  $S$  predstavlja koncentracijo substrata.

### Hidroliza karboksimetil celuloze

Celuloza je najbolj razširjen polimer v naravi. V rastlinah predstavlja skeletno substanco, ki je sestavljena iz monosaharida  $\beta$ -D-glukoze (Slika 8.), v katerega tudi razpade s hidrolizo.  $\beta$ -D-glukopiranozidne enote, povezane z 1–4 vezjo, tvorijo linearno molekulo celuloze. Število monomernih enot v molekuli je odvisno od izvora celuloze in načina izolacije. Tako naj bi bila večina celuloz v naravi sestavljenih iz povprečno okoli 14 000  $\beta$ -D-glukopiranozidnih enot, a jo postopek predelave navadno zniža na okoli 2 500. Molska masa celuloze znaša nad 200 000 g/mol do več milijonov molskih enot.



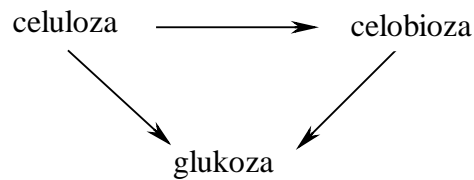
**Slika 8:** Strukturna veriga karboksimetil celuloze.

Karboksimetil celuloza (CMC) je zelo pomemben derivat celuloze. Z učinkovanjem monokloroacetne kisline ali njene natrijeve soli, natrijevega monokloracetata na alkali celulozo dobimo CMC. Z razliko od čiste celuloze se dobro raztaplja v vodi.

CMC je vsestransko uporabna v tehniki, ker ima odlične emulgatorske in dispergatorske lastnosti. Uporablja se pri izdelavi klasičnih mil, kot sredstvo za izboljšanje kakovosti papirja, v kozmetični in prehrambeni industriji (kot gostilo ali želirno sredstvo), v farmacevtski industriji, v industriji nafte in tudi kot lepilo.

Celuloza je sladkor (polisaharid), ki daje pri hidrolizi (Slika 9.) celobiozo (disaharid) oz. glukozo (grozdni sladkor). Celuloza se lahko hidrolizira pri visokih temperaturah ob prisotnosti razredčenih kislin ali pa ob prisotnosti biokatalizatorjev (encimov).



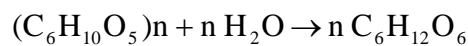


**Slika 9:** Razpad celuloze na glukozo.

S pomočjo encimov potekajo reakcije v mnogo milejših pogojih, pri bistveno nižjih temperaturah in koncentracijah. Encimi povečajo reakcijsko hitrost tako, da znižajo energijo aktiviranja reakcije.

Celulaze (EC 3.2.1.4), ki spadajo v skupino hidrolaz (glikozidaz) so encimi, ki razgrajujejo (cepijo)  $\beta$ -1,4 vezi med glukoznimi enotami. Celulaze imajo širok spekter uporabe (tekstilna industrija za beljenje tkanin, prehrabena industrija pri proizvodnji sokov, kot dodatek živilski hrani za izboljšanje kakovosti in prebavljivosti).

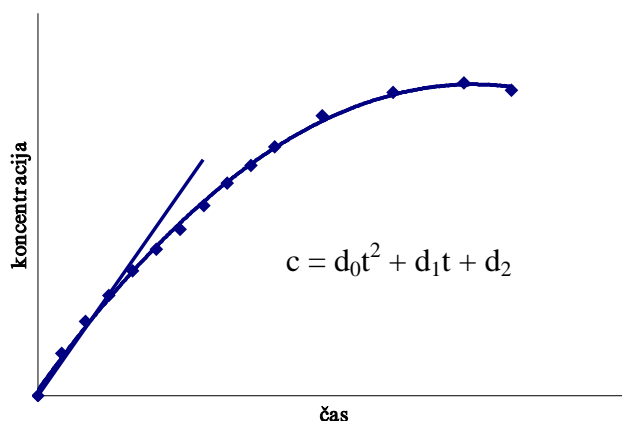
Hidroliza celuloze poteče po sledeči enačbi:



Glavni faktorji, ki vplivajo na začetno hitrost reakcije so: koncentracija encima, koncentracija substrata, reakcijska temperatura in pH okolja.

### **Določitev začetne reakcijske hitrosti**

Med reakcijo, katalizirano z encimom, opazimo višanje koncentracije produktov in upadanje koncentracije substratov, dokler ni doseženo ravnotežje reakcije.



**Slika 10:** Sprememba koncentracije produkta v odvisnosti od časa za encimsko katalizirano reakcijo. Hitrost reakcije dobimo s pomočjo naklona tangente na krivuljo.

Reakcijsko hitrost dobimo v vsakem trenutku reakcije z naklonom tangente na krivuljo koncentracije produkta v odvisnosti od časa (Slika 10.). V t.i. začetni fazi, preden se nakopiči produkt, oz. preden drugi faktorji upočasnijo reakcijo, je tvorba produkta linearna s časom. Iz naklona tangente v začetni fazi torej dobimo začetno hitrost reakcije.

Koncentracijo produkta podamo v odvisnosti od časa. Za določitev začetne reakcijske hitrosti  $v_i$  ( $\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ) =  $(d_c/d_t)$  uporabimo funkcijo  $c = d_0 + d_1 t + d_2 t^2$ . Vrednost začetne reakcijske hitrosti je enaka vrednosti  $d_1$ .

## **VAJA 9: Proučevanje vpliva koncentracije substrata na potek encimsko katalizirane hidrolize karboksimetil celuloze**

### Material:

- karboksimetil celuloza (CMC)
- fosfat-citratni pufer
- encim - celuloza Celluzyme 0,7T
- raztopina glukoze
- raztopina dinitrosalicinske kisline (DNS)
- pipete
- vodna kopel
- bučka s povratnim hladilnikom

### Potek vaje:

- Pripraviti je potrebno raztopino CMC določene koncentracije v 25 ml fosfat-citratnega pufera. V kolikor se CMC popolnoma ne raztopi, je raztopino priporočljivo rahlo segrevati (temperatura ne sme prekoračiti 60 °C).
- Tako pripravljeno raztopino CMC inkubirajte v reakcijski bučki s povratnim hladilnikom v vodni kopeli pri 30 °C.
- Iz inkubirane raztopine odvzamite pri času  $t_0$  1 ml vzorca (slepi vzorec) in ga analizirajte po spodaj opisanem postopku.
- Nato dodajte encim celulozo (Celluzyme 0,7T - NOVO Nordisk, Danska) koncentracije 44 g/l reakcijske zmesi.
- V trenutku, ko dodate encim v reakcijsko zmes, začnite meriti čas reakcije.
- Nato jemljite po 1 ml vzorca iz reakcijske zmesi v sledečem časovnem zaporedju: 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 3,5 h in 4 h.
- Vsak vzorec sproti pripravite za analizo. Vzorčite s pipeto v centrifugirke.

### Analizna metoda

#### **Določevanje glukoze z dinitrosalicinsko kolorimetrično metodo**

Ta metoda temelji na zaznavanju prostih karbonilnih skupin (C=O), tako imenovanih reduciranih sladkorjev. Pri sami reakciji pride do oksidacije aldehydskih funkcionalnih skupin v glukozi. 3,5 dinitrosalicinska kislina (DNS) se pri tem reducira v 3, amino, 5-nitrosalicinsko kislino.

Tako en mol sladkorja reagira z enim molom 3,5-dinitrosalicinske kisline.

#### **Priprava za analizo in merjenje absorbance**

1 ml vzorca, vzetega po določenem času reakcije, dodamo 3 ml DNS. Centrifugirko nato potopimo za 5 minut v vrelo vodno kopel in nato še za 5 minut v mrzlo vodno kopel. Vse centrifugirke je potrebno termostatirati na sobno temperaturo, vzorec centrifugirati in izmeriti absorbance na UV spektrofotometru pri valovni dolžini 540 nm. Kot referenčno raztopino uporabimo raztopino 1 ml vode in 3 ml DNS.

Prav tako je potrebno izmeriti absorbance raztopini glukoze (1 ml pripravljene raztopine glukoze dodamo 3 ml DNS).

#### **Izračun koncentracije glukoze**

Po končanih meritvah absorbance je potrebno še izračunati utežno koncentracijo nastale glukoze pri encimsko katalizirani hidrolizi CMC. Utežna koncentracija glukoze je definirana z enačbo 14:

$$\gamma_{\text{glukoze}} = \frac{(A_{\text{vzorec}} - A_{\text{slepi vzorec}}) \cdot 0,5}{A_{\text{standard glukoze}}} \quad [\text{g/L}] \quad (14)$$

kjer je:

$A_{\text{vzorec}}$  - absorbance hidrolizatov po določenem času poteka reakcije,

$A_{\text{slepi vzorec}}$  - absorbance hidrolizatov v času  $t_0$ ,

$A_{\text{standard glukoze}}$  - absorbance hidrolizatov v raztopini glukoze.

Rezultati in diskusija:

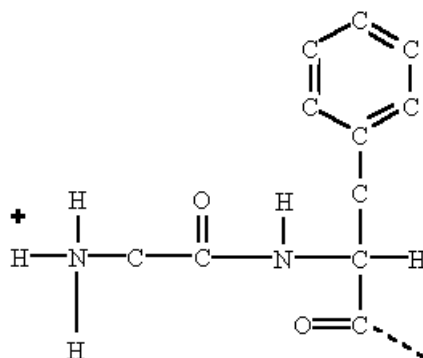
Narisati je potrebno graf odvisnosti koncentracije nastalega produkta od časa reakcije, določiti začetno hitrost posamezne reakcije, tabelarično podati vse meritve, kot prikazuje tabela 2 ter navesti svoja opažanja in ugotovitve.

**Tabela 2:** Podajanje rezultatov.

t /h	V <sub>odvetega vzorca</sub> /ml	A <sub>vzorca</sub>	$\gamma$ glukoze /(g/l)
0	1	0,2593	2,53
0,083	1	....	....
....	....	....	....
4	....	....	....

## Določevanje koncentracije proteinov

Proteini so polimeri amino kislin, kjer so amino kislinske enote med seboj povezane s peptidnimi vezmi (Slika 11.).



**Slika 11:** Del primarne proteinske strukture.

Kriteriji za izbiro metode za določevanje proteinov v raztopini so odvisni od prikladnosti, uporabnosti proteinov za analizo, od prisotnosti dodatkov oz. substanc, ki motijo analizo in od potrebne stopnje natančnosti analize.

Nasplošno velja, da z metodami za določevanje koncentracije proteinov bolj natančno določimo koncentracijo kompleksnim mešanicam proteinov. Določitev koncentracije raztopine čistih proteinov je lahko zelo nenatančna, odvisno od načina analize, razen da je analiziran encim uporabljen tudi kot standard za umeritveno krivuljo.

Različne metode za določevanje koncentracije proteinov:

### 1. Določevanje koncentracije proteinov na osnovi absorbanca

- Absorbanca pri 280 nm

*Razpon:* od 20 µg do 3 mg

*Volumen:* od 200 µl do 3ml ali več

*Natančnost:* zadovoljiva

*Primernost:* odlično

*Substance, ki motijo pri analizi:* detergentski, nukleinske kisline, kopljice maščobe

- Absorbanca pri 205 nm

*Razpon:* približno od 1 do 100 µg

*Volumen:* od 200 µl do 3 ml ali več

*Natančnost:* zadovoljiva

*Primernost:* zelo dobro

*Substance, ki motijo pri analizi:* detergentski, nukleinske kisline, kopljice maščobe

- Ekstinkcijski koeficient

*Razpon:* od 20 µg do 3 mg

*Volumen:* od 200 µl do 3 ml ali več

*Natančnost:* ~2 % (zelo dobro)

*Primernost:* zelo dobro

*Substance, ki motijo pri analizi:* detergentski, nukleinske kisline, kopljice maščobe

## 2. Kolorimetrična metoda za določevanje koncentracije proteinov

- Modificirana Lowry-jeva metoda

*Razpon:* od 20 do 300 µg

*Volumen:* od 1 ml naprej

*Natančnost:* dobra

*Primernost:* zadovoljiva

*Substance, ki motijo pri analizi:* močne kisline, natrijev sulfat, fenol, EDTA, citrati, magnezij, kalcij.

- Biuret-ova metoda

*Razpon:* 1 do 10 mg

*Volumen:* 5 ml

*Natančnost:* dobra

*Primernost:* dobra

*Substance, ki motijo pri analizi:* natrijeve soli

- Bradford-ova analiza

*Razpon:* 1 do 20  $\mu\text{g}$  (mikro analiza); 20 do 200  $\mu\text{g}$  (makro analiza)

*Volumen:* 1 ml (mikro); 5,5 ml (makro)

*Natančnost:* zadovoljiva

*Primernost:* odlično

*Substance, ki motijo pri analizi:* /

### **Lowry-jeva metoda za določevanje koncentracije proteinov v raztopini**

Lowry-jeva metoda je metoda za določanje proteinov široke uporabe. Lowry-jeva metoda temelji na dveh reakcijah. Prva reakcija je formiranje bakrovega ion kompleksa z amidnimi vezmi, tvorba reduciranega bakra v alkalnih raztopinah. Druga reakcija je redukcija Folin-Ciocalteu-jevega reagenta (fosfomolibdat) z aromatskimi amino kislinskimi ostanki (tirozin in triptofan).

Reducirani Folin-Ciocalteu-jev reagent je moder in ga je mogoče zaznati s spektrofotometrom v območju od 500 do 750 nm. Uporaba Folin-Ciocalteu-jevega reagenta za detekcijo bakra naredi to metodo do 100 krat bolj občutljivo kot je Bierut-ova reakcija sama.

Poznanih je več modifikacij osnovne Lowry-jeve metode za določevanje koncentracije proteinov. Osnovno metodo so modificirali predvsem z namenom, da poenostavijo proceduro in omogočijo prisotnost nekaterih substanc v vzorcu, katerih osnovna metoda ne dopušča (biomaterialov kot so lipidi).



## **VAJA 10: Določevanje koncentracije proteinov v danih vzorcih po Lawryjevi metodi za določevanje koncentracije proteinov v raztopinah**

### Material:

- pipete
- epruvete
- reagenti

Reagent A: (1 mol/l=M) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,25 M NaOH

Reagent B: CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (1 g/l) in K-Na-tartrat (20 g/l)

Reagent C: Folin-Ciocalteu reagent razredčen s 3X volumnom dionizirane vode

(reagent : voda = 1 : 3 (v/v)).

### Potek vaje:

- Zatehtajte določene količine encimskega preparata v epruvete ter dodajte po 5 ml destilirane vode v vsako epruveto. Dobro pretresite, da se proteini popolnoma raztopijo v vodi.
- Pripravljene raztopine različnih koncentracij encimskega preparata ter dobljen vzorec z neznan koncentracijo centrifugirajte 10 min pri hitrosti 3000 min<sup>-1</sup>.
- Vsem vzorcem določite koncentracijo prisotnih proteinov po naslednjem postopku:
- Odpipetirajte 2 ml vzorca določene koncentracije dodanega encimskega preparata v epruveto.
- Po vrsti dodajte 2 ml reagenta A in 0,8 ml reagenta B.
- Vsebino epruveto pazljivo pretresite.
- Po 10 min dodajte 1,5 ml reagenta C. Ponovno premešajte. Epruveto z vzorcem in dodanimi reagenti pustite stati na sobni temperaturi 10 minut, da se razvije modra barva.
- Odčitajte absorbanco pri  $\lambda = 700$  nm.
- Kot referenčno raztopino uporabite destilirano vodo.
- Nato odčitajte koncentracijo prisotnih proteinov v raztopini iz umeritvene krivulje.
- Postopek ponovite za vse preostale vzorce.

Rezultati in diskusija:

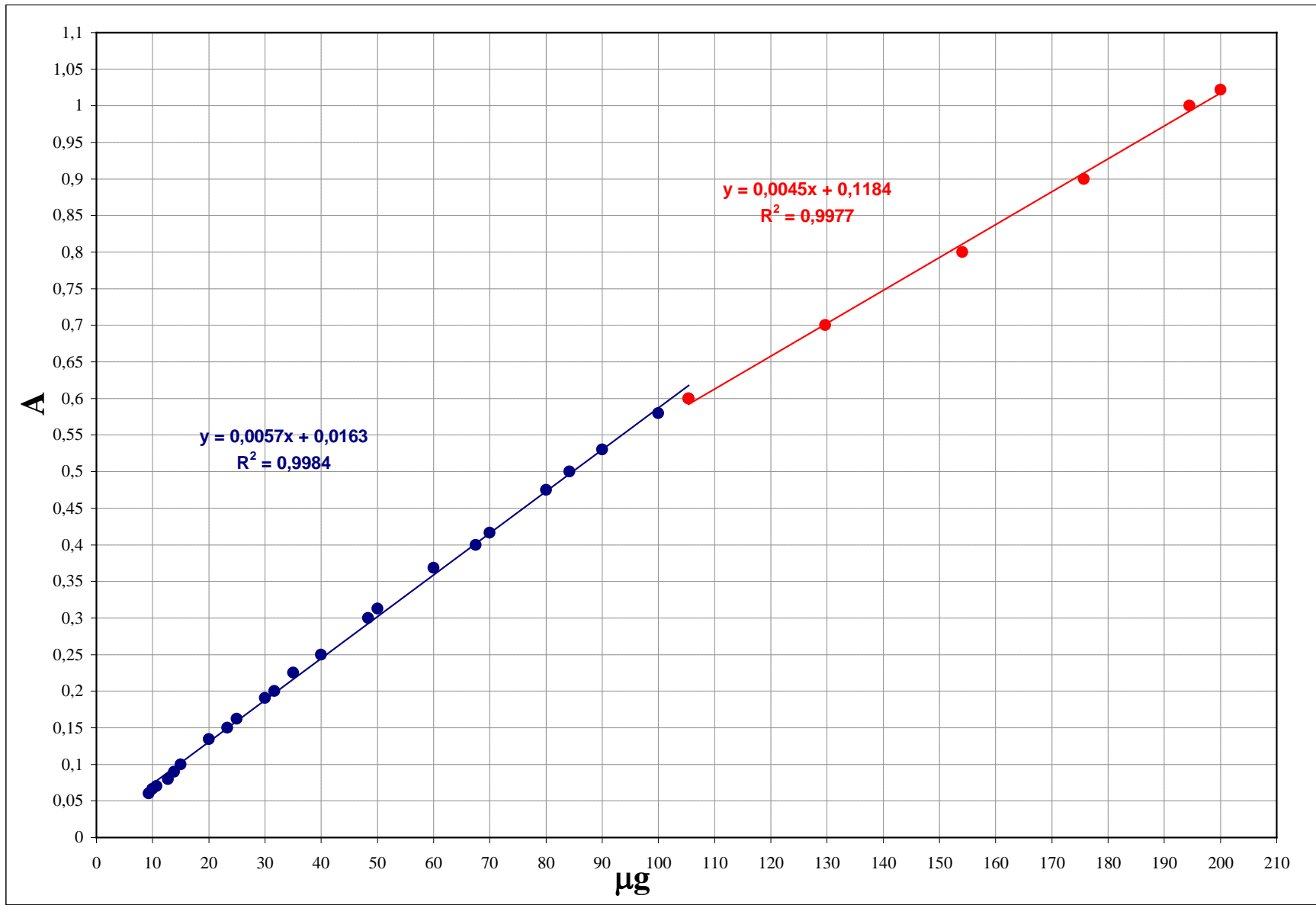
Tabelarično podajte izmerjene absorbance in določene koncentracije proteinov v pripravljenih vzorcih.

Na osnovi znanih koncentracij encimskega preparata in pripadajočih koncentracij proteinov, ki ste jih določili s pomočjo zgoraj opisane metode, izračunajte odstotek prisotnih proteinov v encimskem preparatu.

Določite koncentracijo encimskega preparata v vzorcu neznane koncentracije.

---

**UMERITVENA KRIVULJA ZA DOLOČEVANJE  
KONCENTRACIJE PROTEINOV V DANIH VZORCIH**



---

## Literatura:

- Brzin, B., Budič, S., Gubina, M., Kozak, M., Likar, M., Stropnik, Z., Vozelj, M., Zajc-Satler, J. *Praktikum iz mikrobiologije in parazitologije*. Likar, M. (ur.). Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo medicinske fakultete v Ljubljani, Ljubljana : Univerza v Ljubljani, 1972.
- Janc, M., Rupnik, M. *Splošna mikrobiologija : navodila za vaje*, (Knjižna zbirka Scripta, Mikrobiologija). Ljubljana : ŠOU, Študentska založba, 1998.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag : Stuttgart· New York, 1999.
- Bole-Hribovšek, V., Hostnik, P. *Osnove dela v mikrobiološkem laboratoriju, Priročnik za vaje iz mikrobiologije za veterinarje*. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1996.
- Kapun-Dolinar, A. *Mikrobiologija*. Kurnik, U. (ur.), Lorenčič, A. (ur.). 1. natis, Zavod RS za šolstvo, Ljubljana, 2001.
- Likar, M. *Mikrobiologija*. 2. izdaja, Dopolna delavska univerza Univerzum Ljubljana, 1979.
- *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A.L. (ur.), Davies, J.E., (ur.), 2. izdaja, American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 1999.