

Grzegorz OŁOŚ¹ i Olga ZHUK¹

OPRACOWANIE METODY ORAZ OPTIMALIZACJA WARUNKÓW IMMOBILIZACJI INWERTAZY DROŻDŻOWEJ W ŻELU ALGINIANOWYM

OPTIMIZATION OF IMMOBILIZATION OF YEAST INVERTASE IN THE ALGINATE GEL

Abstrakt: Zbadano wpływ różnych stężeń chlorku wapnia oraz czasu kondycjonowania inwertazy drożdżowej (EC 3.2.1.26) izolowanej z drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* immobilizowanej w żelu alginianowym. Z wykorzystanych w badaniach różnych stężeń chlorku wapnia (2, 5, 10 i 30%) najwyższą aktywność enzymatyczną uzyskano dla najwyższego wykorzystanego stężenia. Wykazano, że czas 15 minut kondycjonowania żelu alginianowego w chlorku wapnia prowadzi do najefektywniejszego immobilizowania inwertazy. Dodatkowo oceniono wpływ immobilizacji inwertazy drożdżowej na jej aktywność w odniesieniu do wolnej formy tego enzymu w szerokim zakresie pH (3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5) oraz temperatury (21, 36, 44, 49, 54, 59, 64 oraz 70°C). Aktywność enzymatyczną badano spektrofotometrycznie poprzez mierzenie przyrostu zredukowanej formy kwasu pikrynowego powstałej w obecności cukrów redukujących otrzymanych ze zhydrolizowanej przez inwertazę sacharozy. Spośród wykorzystanych różnych wartości temperatury i pH najwyższą wydajność immobilizowanej inwertazy wykazano dla 59°C i pH 4,5-5,0. Wykazano, że immobilizowana inwertaza zachowuje aktywność w szerszym zakresie pH i temperatury od formy wolnej (nieimmobilizowanej).

Słowa kluczowe: immobilizacja enzymu, żel alginianowy, inwertaza drożdżowa

Wprowadzenie

W komórkach *Saccharomyces cerevisiae* obecne są dwie formy inwertazy (sacharazy, β -fruktofuranozydazy, EC 3.2.1.26): wewnętrzna, zlokalizowana w cytozolu, oraz zewnętrzna będąca w przestrzeni periplazmatycznej. Pomimo tego, że obie są kodowane z udziałem tego samego genu (*SUC2*), to różnią się budową. Występująca w postaci dimeru (lub rzadziej oligomeru) zewnętrzna inwertaza ma dodatkową resztę seryny na aminowym końcu. Forma wewnętrzna tego enzymu w zależności od pH może stać się monomerem, dimerem lub oktamerem [1]. Inwertaza drożdżowa wykorzystywana jest w przemyśle na szeroką skalę m.in. w produkcji cukru inwertowanego, dodatków do dżemów, niekryształizujących kremów i sztucznego miodu [2-4] dzięki reakcji hydrolizy sacharozy do fruktozy i glukozy. Obie formy mogą dodatkowo, choć w mniejszym stopniu, hydrolizować inne wielocukry, jak inulinę i rafinozę. Najprawdopodobniej w katalitycznej aktywności tego enzymu bierze udział podwójny mechanizm angażujący nukleofil i donor protonu w reakcji dwustopniowej [5].

W poszukiwaniu tańszych i bardziej wydajnych metod wykorzystania tego enzymu przeprowadza się jego immobilizację na powierzchni oraz wewnątrz różnych nośników. Immobilizacja enzymu ma wiele zalet, szczególnie z punktu widzenia produkcyjnego: swobodę w izolowaniu enzymu z mieszaniny poreakcyjnej, większą stabilność

¹ Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. kard. B. Kominka 6, 45-032 Opole, tel. 77 401 60 63, email: golos@uni.opole.pl

Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole' 16, Zakopane, 5-8.10.2016

enzymatyczną, zachowanie ciągłości procesu produkcyjnego itp., co przekłada się na optymalizację całej produkcji [6].

Inwertazę drożdżową oraz pochodzącą z innych źródeł (grzyby, rośliny) można immobilizować:

- na powierzchni nośników, np. porowatych kulkach celulozowych [7, 8],
- wewnątrz nośnika, np. żelu alginianowego [9],
- poprzez sieciowanie i wiązanie kowalencyjne [2].

Od połowy ubiegłego wieku zaczęto wykorzystywać żel alginianowy na skalę przemysłową w branży spożywczej i farmaceutycznej w roli substancji wypełniającej, spulchniającej lub tworzącej zwięzły mikrofilm powierzchniowy [10]. Alginian, będący polisacharydem pochodzenia naturalnego, uzyskuje się głównie z brunatnic morskich [8]. Alginian to cukrowy kopolimer zbudowany z reszt kwasów D-mannurynowego i L-guluronowego, których ilość i ułożenie zależne są w głównej mierze od gatunku glonu, z jakiego zostały wyizolowane [11]. Uchodzi za nietoksyczny, wszechstronny, szybki, tani i łatwy nośnik wykorzystywany do immobilizowania całych komórek, jak również enzymów [12]. Roztwór wodny soli sodowej alginianu w obecności jonów wapniowych (Ca^{2+}) tworzy mniej lub bardziej zwięzłe żele w wyniku wymiany jonów sodowych na wapniowe. W końcowym rezultacie wkraplania alginianu sodowego zawierającego izolowany enzym do roztworu chlorku wapnia uzyskuje się kulki, których barwa, gęstość i ściśliwość zależą głównie od proporcji między samym alginianem a stężeniem jonów wapnia i czasem formowania się kulek. Niestety, zarówno w przypadku immobilizowania całych komórek, jak i samych enzymów istnieją dwa zasadnicze problemy: całe komórki istotnie tracą swoje zdolności katalityczne w wyniku utrudnionej dyfuzji substratu [13], zaś enzymy, szczególnie o małej masie cząsteczkowej (poniżej 300 kDa), uciekają z kulek żelu wraz z upływem czasu [14].

Celem badań była ocena wpływu stężenia chlorku wapnia oraz czasu kondycjonowania powstałych kulek z żelu alginianowego zawierającego wyizolowaną inwertazę drożdżową z komórek *Saccharomyces cerevisiae* oraz porównanie efektywności enzymu immobilizowanego do jego wolnej formy.

Materiały i metody badań

*Immobilizacja enzymu inwertazy drożdżowej z *Saccharomyces cerevisiae**

Inwertazę drożdżową uzyskano poprzez homogenizację komórek drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* (Lesaffre Polska S.A.) w obecności buforu cytrynianowego (pH 4,5), a następnie poprzez wirowanie homogenatu przez 5 minut przy prędkości 10 tysięcy obrotów na minutę z chłodzeniem do 4°C. Uzyskany supernatant zawierał poszukiwany enzym, który następnie po rozcieńczeniu 1:10 wodą demineralizowaną połączono z alginianem sodowym (Carl Roth) w ilości 1 g alginianu sodowego na 50 cm³ supernatantu. Całość mieszano na mieszadle magnetycznym do momentu otrzymania jednorodnego, gęstego i kleistego żelu. Każdorazowo pobierano 2 cm³ żelu za pomocą strzykawki i ostrożnie, kropla po kropli, wstrzykiwano do przygotowanych roztworów chlorku wapnia (50 cm³) o różnych (2, 5, 10, 30%) stężeniach, kondycjonując przez 15 minut w celu usieciowania enzymu w żelu. Następnie kulki wyjmowano, przemywano wodą demineralizowaną na lejku Büchnera. Tak przygotowany preparat był

wykorzystywany do badań. W określeniu istotności czasu kondycjonowania kulek wykorzystano tę samą metodę i 2% chlorek wapnia, z czasami kondycjonowania kulek 5, 10, 15, 30, 60 i 120 minut. Dla każdego czasu kondycjonowania, jak również dla każdego stężenia chlorku wapnia wykonano pięć powtórzeń.

Badanie aktywności inwertazy drożdżowej w formie wolnej i immobilizowanej w żelu alginianowym

Aktywność wolnej formy enzymu badano poprzez dodanie 2 cm³ supernatantu zawierającego odwirowany enzym uzyskany na drodze homogenizacji komórek drożdżowych do mieszaniny reakcyjnej zawierającej 2 cm³ buforu cytrynianowego o pożądanej wartości pH (zależnej od próby) oraz 1 cm³ 0,1M sacharozy na czas 10 minut w temperaturze 21°C. Kulki zawierające enzym, powstałe przez sieciowanie żelu alginianowego w roztworach chlorku wapnia (w liczbie odpowiadającej 2 cm³ supernatantu połączonego z alginianem sodowym), dodawano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 2 cm³ buforu cytrynianowego o określonej wobec charakteru badania wartości pH, 1 cm³ 0,1M sacharozy oraz 2 cm³ wody demineralizowanej. Po upływie czasu inkubacji reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 2 cm³ 10% NaOH. Następnie dodawano do próby 1 cm³ 1% kwasu pikrynowego i całość (wyjąwszy wcześniej kulki z immobilizowanym enzymem) umieszczano w łaźni wodnej na czas 5 minut. Zredukowana forma kwasu pikrynowego, przez powstałe w wyniku hydrolizującego działania inwertazy cukry, przechodzi w formę barwną (czerwony pikraminian sodu). Ilość powstałego, barwnego związku określano spektrofotometrycznie przy długości fali świetlnej $\lambda = 530$ nm. Uzyskane pomiary odnoszono do wcześniej wyznaczonej krzywej kalibracyjnej. Do pomiarów spektrofotometrycznych wykorzystano spektrofotometr UV/VIS UV-2601 (RayLeigh).

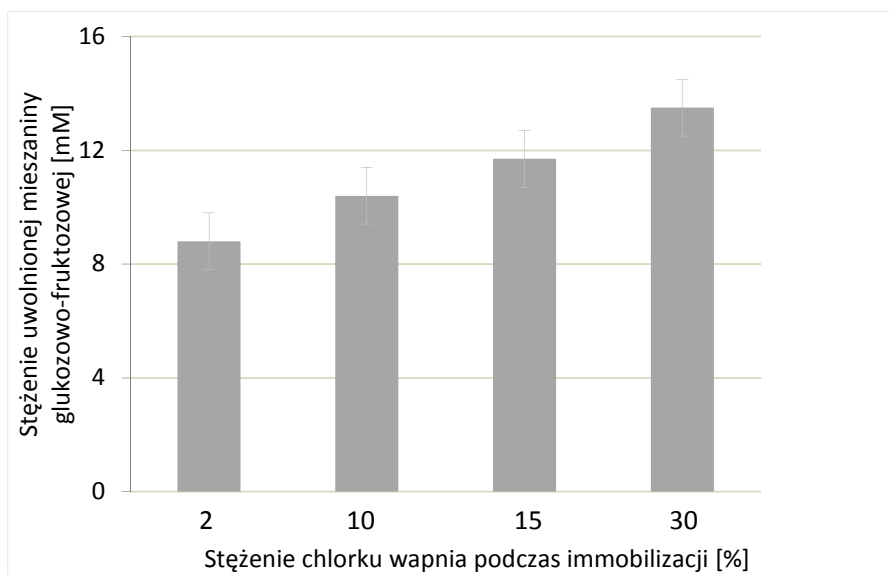
Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki analizowano statystycznie, wykorzystując test *t*-Studenta przyjmując istotność różnic na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

*Wpływ stężenia chlorku wapnia na wydajność immobilizowanej inwertazy drożdżowej z komórek *Saccharomyces cerevisiae**

W pierwszej kolejności oceniono, jak stężenie chlorku wapnia w zakresie od 2 do 30% wpłynie na zdolność immobilizacji badanego enzymu w sieciowanym żelu alginianowym przy zachowaniu stałego czasu kondycjonowania kulek w roztworach, wynoszącym 15 minut, przy pH = 4,5. Aktywność powstałych kulek z immobilizowanym enzymem wyrażono jako ilość zhydrolizowanej sacharozy (utworzonej mieszaniny glukozowo-fruktozowej) w oparciu o krzywą kalibracyjną z wykorzystaniem kwasu pikrynowego. Kwas pikrynowy w zasadowym środowisku po zagotowaniu w obecności cukrów redukujących pozwalał ocenić wydajność badanego enzymu. W miarę wzrostu stężenia chlorku wapnia kulki z immobilizowanym enzymem wykazywały większą wydajność, osiągając jej maksimum dla 30% stężenia roztworu chlorku wapnia (rys. 1).

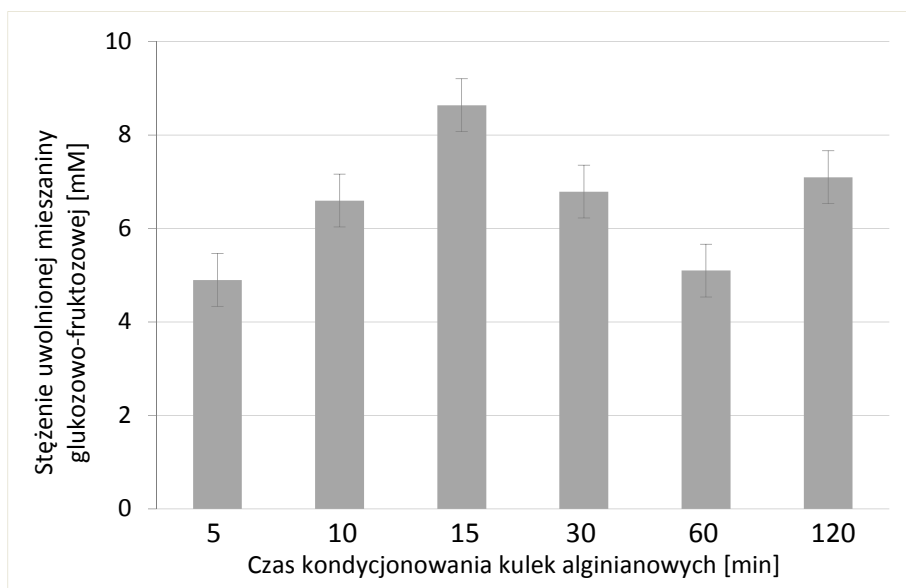


Rys. 1. Ilość utworzonej mieszaniny glukozy-fruktozowej w czasie reakcji 10 minut przez immobilizowaną invertazę drożdżową *Saccharomyces cerevisiae* w żelu alginianowym w zależności od stężenia chlorku wapnia wykorzystanego do sieciowania formowanych kulek, przy pH = 4,5 w 21°C i 30 minutach kondycjonowania kulek. Istotność statystyczna różnic na poziomie $p < 0,05$ (test t Studenta)

Fig. 1. The amount of released glucose-fructose mixture from sucrose after 10 minutes of exposure to immobilized yeast invertase from *Saccharomyces cerevisiae* in alginian gel according to different concentration of calcium chloride used to crosslink of formed beads, at pH = 4.5, in 21°C, after 30 minutes of beads hardening. Statistically significant differences at the level of $p < 0.05$ (t Student test)

Wpływ czasu kondycjonowania kulek żelu alginianowego zawierających invertazę drożdżową w roztworze chlorku wapnia o stałym stężeniu

Utworzenie się zwartych kulek, czyli usieciowanie alginianu sodowego, zależy od wymiany jonów sodu na jony wapnia pochodzących z roztworu chlorku wapnia. Im większy stopień usieciowania utworzonych kulek, tym bardziej powinno przekładać się to na ilość pułapkowanego enzymu lub przynajmniej ograniczać jego ucieczkę z wnętrza kulek. W pierwszej części badań wykazano, że im większe stężenie chlorku wapnia, tym wydajniejszy był utworzony preparat zawierający immobilizowany enzym. Zgodnie z tą samą procedurą jak w poprzedniej części, utworzono kulki alginianowe zawierające enzym i kondycjonowano je w 2% chlorku wapnia, ale w różnych czasach: 5, 10, 15, 30, 60 i 120 minutach. Uzyskane wyniki okazały się niejednoznaczne. Maksymalną wydajność odnotowano dla kulek twardniejących w roztworze chlorku wapnia w przedziale czasowym 15-30 minut. Poniżej oraz powyżej tego zakresu wydajność kulek była niższa. Odnotowano brak istotnych statystycznie różnic między czasami 5, 10 i 60 minut. Wydajność kulek dla czasów 15 i 30 minut była istotnie wyższa od 10 i 60 minut (rys. 2). Zaskakujący jest ponowny wzrost wydajności kulek dla najdłuższego czasu ich kondycjonowania, czyli 120 minut.



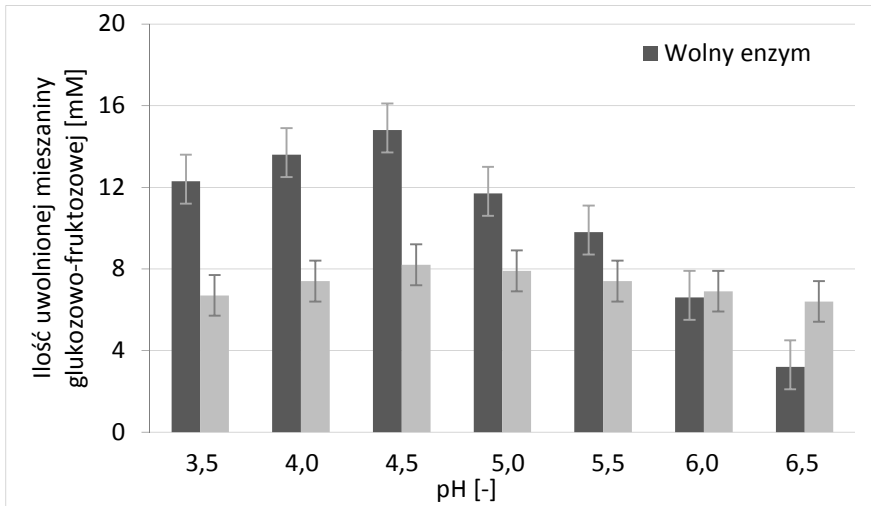
Rys. 2. Ilość utworzonej mieszaniny glukozowo-fruktozowej uwolnionej ze zhydrolizowanej sacharozy przez immobilizowaną inwertazę drożdżową *Saccharomyces cerevisiae* w żelu alginianowym w zależności od różnych czasów kondycjonowania kulek w 2% roztworze chlorku wapnia przy pH = 4,5, w 21°C i 30 minutach kondycjonowania

Fig. 2. The amount of released glucose-fructose mixture from hydrolyzed by immobilized yeast invertase from *Saccharomyces cerevisiae* in alginate gel according to different time of hardening in 2% concentration of calcium chloride at pH = 4.5, in 21°C and 30 minutes of hardening

Porównanie wydajności preparatu z immobilizowaną inwertazą drożdżową do jej wolnej formy w różnych zakresach pH i temperatury

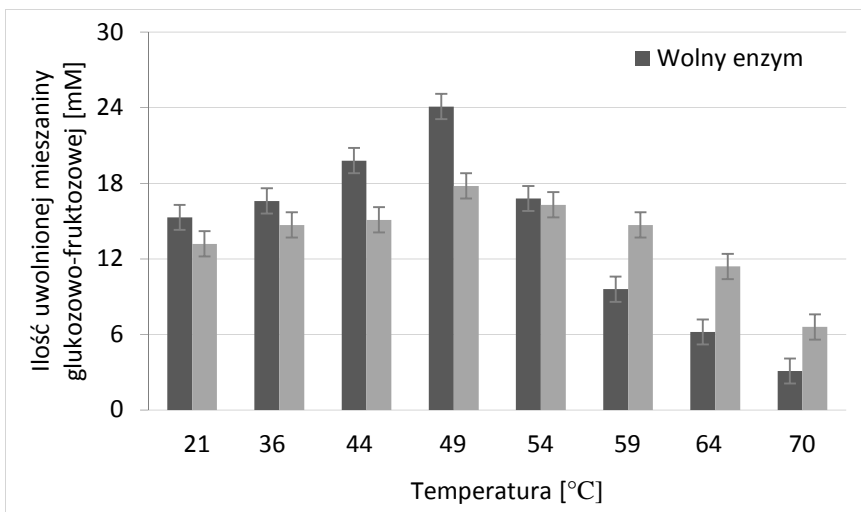
Przy zachowaniu tych samych parametrów mieszaniny inkubacyjnej i tym samym, wyjściowym stężeniu sacharozy zbadano wydajność utworzonych preparatów (kulek) z immobilizowanym enzymem wobec kontroli stanowiącej przez wolną formę enzymu. To badanie było przeprowadzone w ten sam sposób jak dwa poprzednie. Końcowy wynik określano z krzywej wzorcowej na podstawie ilości zredukowanego kwasu pikrynowego w obecności cukrów redukujących powstałych po hydrolizie sacharozy przez inwertazę drożdżową w zakresie pH od 3,5 do 6,5. W przypadku wolnej inwertazy drożdżowej maksimum aktywności dla tego enzymu mieści się w granicach pH = 4,5-5,0 z wyraźnym spadkiem aktywności w miarę zmiany pH w stronę zasadowego.

W przypadku inwertazy immobilizowanej, choć wydajność preparatu z tą samą ilością enzymu wykorzystanego w procesie pułapkowania w alginianie sodowym jest mniejsza, to rośnie tolerancja na zmiany pH do tego stopnia, że w badanym zakresie nie odnotowano statystycznie istotnych różnic bez względu na to, czy zmieniono pH środowiska reakcji ku bardziej kwaśnemu czy zasadowemu (rys. 3). Zbadano również różnice w zakresie temperatury między 21 a 70°C dla inwertazy drożdżowej w formie wolnej i immobilizowanej w żelu alginianowym.



Rys. 3. Ilość utworzonej mieszanki glukozy-fruktozy uwolnionej ze zhydrolizowanej sacharozy przez wolną i immobilizowaną invertazę drożdżową *Saccharomyces cerevisiae* w żelu alginianowym w zależności od różnych wartości pH, w 21°C po 30 minutach kondycjonowania

Fig. 3. The amount of released glucose-fructose mixture from hydrolyzed by free and immobilized yeast invertase from *Saccharomyces cerevisiae* in alginate gel according to different pH values, in 21°C after 30 minutes of beads hardening



Rys. 4. Ilość utworzonej mieszanki glukozy-fruktozy uwolnionej ze zhydrolizowanej sacharozy przez wolną i immobilizowaną invertazę drożdżową *Saccharomyces cerevisiae* w żelu alginianowym w zależności od różnych wartości temperatury, przy pH = 4,5, po 15 minutach kondycjonowania

Fig. 4. The amount of released glucose-fructose mixture from hydrolyzed by free and immobilized yeast invertase from *Saccharomyces cerevisiae* in alginate gel according to different temperature, at pH = 4.5, after 15 minutes of beads hardening

Forma immobilizowana wykazuje znacząco wyższą termostabilność powyżej 50°C, choć w całym zakresie temperatur wydajność immobilizowanego enzymu jest niższa (rys. 4). Maksimum wydajności kulek z immobilizowaną inwertazą jest przesunięte o ok. 5°C w górę w porównaniu do wolnego enzymu i wynosi 60°C wobec 55°C.

Podsumowanie i wnioski

Podczas badań oceniono wpływ różnych stężeń chlorku wapnia oraz czasów kondycjonowania (formowania się) kulek żelu alginianowego z immobilizowaną inwertazą drożdżową izolowaną z komórek *Saccharomyces cerevisiae* na ich wydajność w odniesieniu do wolnej formy tego enzymu.

Uzyskane wyniki wskazują, że wzrost stężenia chlorku wapnia wykorzystanego do sieciowania kulek alginianowych przekłada się pozytywnie na ich wydajność enzymatyczną. Najwyższą wydajność odnotowano dla kulek formowanych w 30% roztworze chlorku wapnia. Można przypuszczać, że wysokie stężenie jonów wapnia od samego początku kondycjonowania kulek intensywnie sieciowało enzym w ich wnętrzu, zmniejszając zakres jego ucieczki wynikającej z małej masy cząsteczkowej [3, 15].

Przy zachowaniu tego samego stężenia chlorku wapnia (2%) zbadano efekt czasu kondycjonowania kulek w zakresie od 5 do 120 minut. Najkorzystniejszym czasem kondycjonowania było 15 minut. Krótsze i dłuższe czasy kondycjonowania prowadziły do formowania się kulek o mniejszej wydajności. Niewykluczone, że przy krótkim czasie nie zaszła wymiana wszystkich jonów sodowych na wapnia i tym samym stopień usieciowania takich kulek był niewystarczający. Dłuższe czasy mogły natomiast prowadzić albo do zbyt ciasnego usieciowania enzymu wewnątrz kulek, albo najzwyczajniej, w miarę upływu czasu, część cząsteczek enzymu zdążyła uciec na drodze dyfuzji do roztworu chlorku wapnia.

Bez względu na warunki powstawania kulek, a także przy zachowaniu optymalnych warunków dla inwertazy drożdżowej wydajność preparatu zawierającego immobilizowany enzym była niższa od jego wolnej formy. Może to wynikać z kilku powodów: część enzymu mogła uciec na drodze dyfuzji z wnętrza kulek przed ich dodaniem do mieszaniny reakcyjnej, immobilizowane cząsteczki enzymu mogą mieć niższe powinowactwo do substratu lub dostęp do substratu mógł być utrudniony poprzez słabszą dyfuzję do wnętrza kulek (tak samo jak odpływ produktu na zewnątrz). Pomimo tej negatywnej cechy immobilizowany enzym charakteryzuje się wyższą tolerancją na różne od optymalnego wartości pH (brak istotnych statystycznie różnic w zakresie pH od 3,5 do 6) oraz wyższą termostabilnością, szczególnie w zakresie temperatur 49-70°C, gdzie dla ostatniej wartości temperatury immobilizowany enzym był wydajniejszy o 65%.

Literatura

- [1] Chu FK, Takase K, Guarino D, Maley F. *Biochemistry*. 1985;24: 6125-6132. DOI: 10.1021/bi00343a014.
- [2] Emregul E, Sungur S, Akbulut U. *Food Chem*. 2006;4:591-597. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.017.
- [3] Tanriseven A, Dogan S. *Process Biochem*. 2001;36:1081-1083. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00146-7.
- [4] Vitolo M, Duranti MA, Pellegrin MB. *J Ind Microbiol*. 1995;15:75-79. DOI: 10.1007/BF01569803.
- [5] Koshland DE, Stein SS. Correlation of bond breaking with enzyme specificity. Cleavage point of invertase. *J Biol Chem*. 1954;208:139-48.
- [6] D' Souza SF. Trends in immobilized enzyme and cell technology. *Indian J Biotechnol*. 2002;1:321-338.

- [7] Amaya-Delgado L, Hidalgo-Lara ME, Montes-Horcasitas MC. Food Chem. 2006;99:299-304. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.048.
- [8] Dickensheets PA, Chen LF, Tsao GT. Biotechnol Bioeng. 1977;3:365-75. DOI: 10.1002/bit.260190307.
- [9] Kiersten M, Bucke C. Biotechnol Bioeng. 1977;19:387-397. DOI: 10.1002/bit.260190309.
- [10] De Gooijer CD, Hens HJH, Tramper J. Bioprocess Biosyst Eng. 1989;4:153-158. DOI: 10.1007/BF00369393.
- [11] Grassi M, Sandolo C, Perin D, Coviello T, Lapasin R, Grassi G. Molecules. 2009;14:3003-3017. DOI: 10.3390/molecules14083003.
- [12] Fraser JE, Bickerstaff GF. Entrapment of Enzymes and Cells in Calcium Alginate. Immobilisation of Enzymes and Cells. Totowa NJ: Humana Press; 1997.
- [13] Hasal P, Čejkova A, Vojtisek V. Enzyme Microb Technol. 1992;12:1007-1012. DOI: 10.1016/0141-0229(92)90086-4.
- [14] Martinsen A, Storrø I, Skjåk-Braek G. Biotechnol Bioeng. 1992;39:186-194. DOI: 10.1002/bit.260390210.
- [15] Ro HS, Kim HS. Enzyme Microb Technol. 1991;13:920-924. DOI: 10.1016/0141-0229(91)90109-N.

OPTIMIZATION OF IMMOBILIZATION OF YEAST INVERTASE IN THE ALGINATE GEL

Chair of Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of the selected physical and chemical parameters of immobilization process of yeast invertase in alginate gel and to compare the enzymatic effectiveness of free and immobilized enzyme. Yeast invertase enzyme was obtained from homogenated *Saccharomyces cerevisiae* cells and then centrifuged. It was later added into alginate gel solution and then the mixture was dripped into calcium chloride solution. The aim of my study was to find most optimal conditions for immobilization of studied enzyme, thus different concentrations of calcium chloride were used (2, 5, 10, 30%) and different conditioning time of alginate gel beads (5, 10, 15, 30, 60, 120 min). Additionally I compared effectiveness of already formed beads containing yeast invertase to its unimmobilized form in wide spectrum of temperature (21, 36, 44, 49, 54, 59, 64 and 70°C) as well as in different pH values (3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5). Activity of immobilized enzyme was measured spectrophotometrically by noticing changes in amount of reduced form of picric acid created in presence of reducing sugars gained from hydrolyzed sucrose by yeast invertase. Based on achieved results it has been shown that concentration of calcium chloride solution is more important than conditioning time of alginate gel beads containing immobilized enzyme. The highest effectiveness of immobilized enzyme was noticed for 60°C and between 4.5-5.0 pH. The immobilized form of yeast invertase was more stable in wider spectrum of temperature and pH values comparing to its unimmobilized form.

Keywords: enzyme immobilization, alginate gel, yeast invertase