

Maciej PILAREK, Justyna ZYGMUNTOWICZ, Katarzyna DĄBKOWSKA, Władysław MONIUK

e-mail: pilarek@ichip.pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Wykorzystanie metody enzymatycznej do badania rozpuszczalności tlenu w ciekłych perfluorozwiązkach

Wstęp

Syntetyczne, ciekłe perfluorowane pochodne węglowodorów alifatycznych (perfluorozwiązki PFC (*perfluorochemicals*, *fluorocarbons*) znajdują coraz szersze zastosowanie jako nośniki gazów oddechowych (tlenu i ditlenku węgla) w inżynierii bioprocessowej i naukach biomedycznych. Zastosowanie perfluorowanych nośników gazów oddechowych w hodowlach komórkowych pozytywnie wpływa na efektywność hodowli przez skrócenie fazy adaptacji, wydłużenie fazy wzrostu wykładniczego, osiągnięcie wyższych gęstości komórek czy też zwiększoną produktywność metabolitów komórkowych (np. rekombinowanych białek, plazmidów) [Pilarek i in., 2011; Pilarek i in., 2012]. Uznaje się, że ciekłe PFC wykazują się dużym potencjałem aplikacyjnym w zakresie udoskonalania technik prowadzenia przestrzennych hodowli komórek zwierzęcych [Pilarek i Szewczyk, 2005; Riess, 2006].

Rozpuszczalność gazów w ciekłych PFC można opisać prawem Henry'ego w odróżnieniu od sigmoidalnej zależności rozpuszczalności tlenu w biologicznych nośnikach O₂/CO₂ (tj. hemoglobiny i mioglobiny), z którymi ciekłe PFC są porównywane [Deschamp i in., 2007; Sobieszuk i Pilarek, 2012]. Rozpuszczalność tlenu w PFC jest około 20-krotnie wyższa niż w wodzie i nie zależy od temperatury. Gęstość PFC (ok. 1,8÷1,9 kg dm⁻³) oraz ich hydrofobowość sprawia, że wprowadzone do układu hodowlanego, który stanowi wodna faza pożywki z zawieszonymi w niej komórkami danego typu, tworzy osobną fazę (fazę perfluorowaną) na dnie naczynia hodowlanego [Riess, 2001; Lowe, 2002]. Liczne prace doświadczalne oraz badania kliniczne potwierdzają brak toksycznego wpływu PFC na żywe komórki [Pilarek i in., 2011; Pilarek i in., 2012].

Nie jest możliwy bezpośredni pomiar stężenia tlenu rozpuszczonego w PFC. Standardowa metoda wykorzystująca elektrodę Clarke'a nie może zostać użyta z uwagi na hydrofobowość fazy perfluorowanej i brak możliwości przepływu elektronów w układzie. Konieczne jest zastosowanie metod pośrednich.

Celem pracy była aplikacja metody enzymatycznej do pomiaru stężenia tlenu rozpuszczonego w perfluorodekalinie. Wykorzystano układ dwóch następczych reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy z klasy oksydoreduktaz: oksydazę glukozową oraz peroksydazę, stanowiące biologicznie czynne składniki popularnych odczynników do oznaczania stężenia glukozy w krwi. Wyznaczono wartości współczynników wnikania masy po stronie fazy ciekłej i gazowej oraz określono rozpuszczalność tlenu w perfluorodekalinie. Z uwagi na niewielką wymaganą objętość próbki ciekłego PFC, rzędu 10⁻⁵ dm³, niewątpliwą zaletą opracowanej ilościowej metody enzymatycznego pomiaru stężenia tlenu w fazie perfluorowanej jest jej aplikacyjność w miniaturowych układach hodowlanych o objętościach rzędu mikro- i mililitrów.

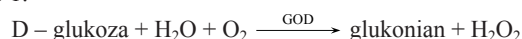
Materiały i metody

Perfluorozwiązek. W badaniach, jako ciekły perfluorozwiązek wykorzystano równomolową mieszaninę izomerów (*cis*-/*trans*-) perfluorodekaliny C₁₀F₁₈ (*perfluorodecalin*, PFD) o 98% czystości. Preparat został zakupiony w ABCR GmbH (Karlsruhe, Niemcy). Przeznaczona do badań PFD była sterylizowana termicznie (15 min., 121 °C), co skutkowało także jej odgazowaniem.

Odczynnik BioMaxima. Jako specyficzny preparat enzymatyczny umożliwiający pomiar stężenia tlenu rozpuszczonego w PFD wykorzystano odczynnik BM firmy BioMaxima (Lublin, Polska). Podstawową aplikacją odczynnika jest pomiar stężenia glukozy w ludzkich płynach fizjologicznych oraz w innych roztworach wodnych. Zastosowana

przez producenta metoda wykorzystuje układ dwóch następczych reakcji katalizowanych enzymatycznie przez oksydazę glukozową GOD i peroksydazę POD:

– etap 1:



– etap 2:



Jako, że reakcja katalizowana przez GOD, w odniesieniu do glukozy i tlenu przebiega w stosunku molowym 1:1, to intensywność zabarwienia roztworu uzyskanego po przereagowaniu cząsteczek glukozy i tlenu wprowadzonych do układu badawczego, jest wprost proporcjonalna do stężenia substratu limitującego, którym w zależności od wariantu metody może być glukoza lub tlen.

W celu usunięcia tlenu rozpuszczonego w preparacie enzymatycznym, porcję odczynnika BM odgazowywano przez 10 min. w płuczce ultradźwiękowej, a następnie 3-krotnie zamrażano/odmrażano. Z uwagi na zawartość w odczynniku GOD i POD niemożliwym było zastosowanie konwencjonalnych technik odgazowania, takich jak np. nasycenie CO₂ (skutkowałoby to zmianą odczynu pH odczynnika i w konsekwencji utratą aktywności przez cząsteczki enzymów) czy wysokiej temperatury (doszłoby do termicznej dezaktywacji białek).

Układ badawczy

Pomiary rozpuszczalności tlenu w PFD przeprowadzono w szczelnie zamkniętych (tzn. uszczelnionych gumową uszczelką) mikroprobówkach typu Eppendorf o pojemności 2,12·10⁻³ dm³. Każdorazowo w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło:

I. 2·10⁻³ dm³ odgazowanego preparatu BM,

II. 0,1·10⁻³ dm³ perfluorodekaliny,

III. 0,02·10⁻³ dm³ odgazowanego (0,25·10⁻⁶ M) roztworu glukozy.

Porcję PFD (5·10⁻² dm³) umieszczoną w butelce typu Schott (o pojemności 1·10⁻¹ dm³) nasycano gazem (tlenem lub powietrzem atmosferycznym) przefalując fazę gazową przez filtr o średnicy porów 0,2·10⁻⁶ m oraz porowatą białką w celu dyspergowania fazy gazowej przepływającej przez PFD. Proces nasycania PFD czystym tlenem lub powietrzem atmosferycznym prowadzono przez 20 min. W tym czasie, co 1 min. pobierano pipetą automatyczną próbki PFD i dodawano je do uprzednio przygotowanych mikroprobówek typu Eppendorf zawierających odgazowaną mieszaninę preparatu BM i mianowanego roztworu glukozy. Tym samym w badanym układzie PFD stanowiła jedyne źródło tlenu. Zamknięte i uszczelnione mikroprobówki umieszczano na kołysce laboratoryjnej KL-942 (JW Electronic, Warszawa, Polska) zapewniającej mieszanie (150 rpm) i inkubowano w 25°C przez 20 min. Po założonym czasie, który umożliwiał zajście selektywnej barwnej reakcji do końca, przeprowadzano spektrofotometryczny pomiar absorbancji mieszanin poreakcyjnych. Uzyskane punkty krzywej rozpuszczalności gazu w PFD stanowiły średnią wartość z pięciu niezależnych prób.

Metody analityczne

Absorbancję mieszanin poreakcyjnych oznaczano techniką spektroskopii VIS przy analitycznej długości fali 500 nm względem próbki odczynnikowej (2·10⁻³ dm³ odgazowanego preparatu BM + 0,1·10⁻³ dm³ odgazowanej PFD + 0,02·10⁻³ dm³ odgazowanego mianowanego roztworu glukozy). W warunkach pomiaru próbka odczynnikowa nie absorbuje światła monochromatycznego ponieważ nie zawiera chinonoimini. Pomiarów dokonywano spektrofotometrem GenSys 80 (Thermo Spectronic, USA).

Do wykonania ilościowych oznaczeń stężenia tlenu została wykorzystana metoda krzywej wzorcowej. Badany układ spełniał prawo *Lamberta-Beera* i w zakresie badanych stężeń tlenu ($0,025 \pm 0,5 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³) charakteryzował się prostoliniowym przebiegiem zależności absorbancji prób (*A*) od stężenia tlenu (*C*_{O₂}):

$$C_{O_2} = \frac{4}{4,95} - 0,0133 \left[\frac{\cdot 10^{-6} \text{ mol}}{\text{dm}^3} \right] \quad R^2 = 0,999 \quad (1)$$

Wyniki badań

W przypadku zastosowania czystego tlenu jako gazowego medium nasycającego PFD maksymalne stężenie tlenu rozpuszczonego w PFD wyniosło $0,154 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³. Z kolei, w przypadku napowietrzania badanego PFC powietrzem atmosferycznym analogiczna wartość maksymalnego stężenia tlenu rozpuszczonego w PFD była niższa i wyniosła $0,138 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³. Prawdopodobną przyczyną wykazanej różnicy jest absorpcja gazów innych niż tlen zawartych w powietrzu atmosferycznym (np. CO₂).

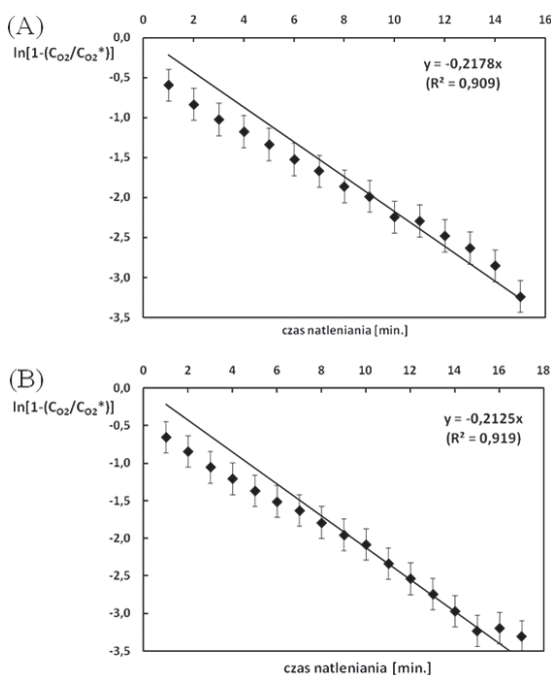
Wyznaczenie wartości objętościowego współczynnika przenikania masy *K_La* jest konieczne do określenia ilościowej charakterystyki transportu masy w układzie dwufazowym PFD – tlen/powietrze. Objętościowy współczynnik przenikania masy obliczono z bilansu:

$$V \frac{dC_{O_2}}{dt} = K_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) V \quad (2)$$

Dla warunków początkowych procesu natleniania: *t* = 0, *C*_{O₂} = 0; równ. (2) przyjmuje postać:

$$\ln\left(1 - \frac{C_{O_2}}{C_{O_2}^*}\right) = -K_L a t \quad (3)$$

Na rys. 1 przedstawiono zależności opisane równ. (3) w funkcji czasu natleniania czystym tlenem (100 % O₂; Rys. 1A) oraz powietrzem atmosferycznym (21 % O₂; Rys. 1B).



Rys. 1. Wykres zależności $\ln[1 - (C_{O_2}/C_{O_2}^*)] = -K_L a t$ w funkcji czasu natleniania PFD czystym tlenem (A) oraz powietrzem atmosferycznym (B)

W badanym układzie ciecz-gaz, do obliczenia rozpuszczalności O₂ w PFD zastosowano równanie równowagi sprowadzone do prawa *Henry'ego*, obowiązujące dla gazów niereagujących z rozpuszczalnikiem. Posługując się prawem *Henry'ego*, wyznaczono stałą *H*:

$$p_{O_2} = H C_{O_2}^* \quad (4)$$

$$H = \frac{101,32}{35,5} = 2,85 \left[\frac{\text{kPa} \cdot \text{m}^3}{\text{mol}} \right] \quad (5)$$

Objętościowy współczynnik przenikania masy *K_La* związany jest z objętościowym współczynnikiem wnikania masy *k_a* w obu fazach następującą zależnością:

$$\frac{1}{K_L a} = \frac{1}{H k_p a} + \frac{1}{k_l a} \quad (6)$$

W przypadku stosowania czystego tlenu:

$$K_L a = k_p a \quad (7)$$

Wyznaczone wartości objętościowych współczynników wnikania masy wynoszą odpowiednio:

- w fazie gazowej $k_p a = 0,051 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$;
- w fazie ciekłej $k_l a = 3,63 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Wnioski

Wykorzystano metodę enzymatyczną do pomiaru stężenia tlenu w PFD poprzez zaadaptowanie techniki wykorzystującej katalityczne działanie dwóch oksydoreduktaz (GOD i POD).

Opracowana metodyka pozwala określić stężenie tlenu w próbce PFD o objętości rzędu mikrolitrów a tym samym wykazuje się dużym potencjałem aplikacyjnym w układach skali mikro wykorzystujących ciekłe PFC.

W ilościowy sposób potwierdzono, że PFD jest wydajnym ciekłym nośnikiem tlenu, który może znaleźć szerokie zastosowanie w miniaturowych układach hodowli komórek.

Oznaczenia

- A* – absorbancja [-]
- BM – enzymatyczny odczynnik BioMaxima
- C*_{O₂} – stężenie O₂ w głębi fazy PFD [mol·dm⁻³]
- C*_{O₂} – stężenie równowagowe O₂ na granicy faz gaz/PFD [mol·dm⁻³]
- GOD – oksydaza glukozy
- H* – stała *Henry'ego* [kPa m³ mol⁻¹]
- K_La* – objętościowy współczynnik przenikania masy [s⁻¹]
- k_a* – objętościowy współczynnik wnikania masy w fazie ciekłej [s⁻¹]
- k_pa* – objętościowy współczynnik wnikania masy w fazie gazowej [mol·m⁻³·s⁻¹·kPa⁻¹]
- p*_{O₂} – ciśnienie tlenu [kPa]
- PFC – ciekłe perfluorowzwiązki
- PFD – perfluorodekalina
- POD – peroksydaza

LITERATURA

- Deschamps J., Menz D.H., Padua A.A.H., Costa Gomes M.F., 2007. Low pressure solubility and thermodynamics of solvation of oxygen, carbon dioxide, and carbon monoxide in fluorinated liquids. *J. Chem. Thermodyn.*, **39**, 847-854. DOI: 10.1016/j.jct.2006.11.012
- Lowe K.C., 2002. Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems. *J. Fluor. Chem.*, **118**, 19-26. DOI: 10.1016/S0022-1139(02)00200-2
- Pilarek M., Szewczyk K.W., 2005. Zastosowania perfluorowzwiązków jako ciekłych nośników gazów oddechowych w medycynie i biotechnologii. *Biotechnologia*, **69**, 125-150
- Pilarek M., Glazyryna J., Neubauer P., 2011. Enhanced growth and recombinant protein production of *Escherichia coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-batch cultures. *Microb. Cell. Factories*, **10**, nr 5. DOI: 10.1186/1475-2859-10-50
- Pilarek M., Brand E., Hillig F., Krause M., Neubauer P., 2012. Enhanced plasmid production in miniaturized high-cell-density cultures of *Escherichia coli* supported with perfluorinated oxygen carrier. *Bioproc. Biosys. Eng.*, **36**, nr 8, 1079-1086. DOI: 10.1007/s00449-012-0861-7
- Riess J.G., 2001. Oxygen carriers ('Blood substitutes') - Raison d'Être, chemistry and some physiology. Blut ist ein ganz besonderer Saft. *Chem. Rev.*, **101**, 2797-2919. DOI: 10.1021/cr970143c
- Riess J.G., 2006. Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Artif. Cells, Blood Subst. Biotech.*, **34**, 567-580. DOI: 10.1080/10731190600973824
- Sobieszuk P., Pilarek M., 2012. Absorption of CO₂ into perfluorinated gas carrier in the Taylor gas-liquid flow in a microchannel system. *Chem. Proc. Eng.*, **33**, 595-602. DOI: 10.2478/v10176-012-0049-3