

Kamila WLIZŁO¹, Jolanta POLAK¹, Marcin GRAŹ¹, Jolanta BRYJAK², Anna JAROSZ-WILKOŁAZKA¹

e-mail: kamila.wlizlo@poczta.umcs.lublin.pl

¹ Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin² Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemii, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Zastosowanie unieruchomionej lakazy grzybowej w biotransformacji związków aromatycznych

Wstęp

Nowoczesna biotechnologia przemysłowa coraz częściej działa w oparciu o działanie enzymów jako katalizatorów reakcji syntezy związków chemicznych, co stanowi przyjazną środowisku alternatywę dla ich chemicznej syntezy. Jednym z takich enzymów jest lakaza, która należy do klasy oksydoreduktaz i wykazuje szeroki potencjał aplikacyjny. Istnieje szereg doniesień o możliwości jej zastosowania w wielu różnych procesach biotechnologicznych, jednakże wdrożenie ich na skalę przemysłową w dalszym ciągu jest zbyt kosztowne, gdyż wiąże się ze zbyt dużymi kosztami oczyszczania enzymu. Dlatego też zintensyfikowano badania nad opracowaniem preparatu enzymatycznego, charakteryzującego się wysoką stabilnością i możliwością wielokrotnego zastosowania w procesie przemysłowym. Otrzymanie takiego preparatu możliwe jest dzięki różnorodnym technikom immobilizacji lakazy [Asgher *et al.*, 2014]. Związanie cząsteczki enzymu ogranicza negatywne oddziaływanie warunków środowiska reakcji takich jak wartość pH, temperatura czy też obecność rozpuszczalników organicznych [Rao *et al.*, 2014]. Jedną z technik immobilizacji lakazy jest jej kowalencyjne wiązanie z nierozpuszczalnymi nośnikami za pomocą różnych grup funkcyjnych, obecnych na powierzchni nośnika lub wprowadzonych na ich powierzchnię za pomocą różnych aktywatorów.

Celem prezentowanej pracy był dobór nośnika pod kątem jego zastosowania do unieruchamiania lakazy grzybowej stosowanej jako unieruchomiony biokatalizator do procesów transformacji bezbarwnych prekursorów w barwne produkty. Przebadano nośniki wykonane z różnych materiałów, w których aktywowano różne grupy funkcyjne w celu kowalencyjnego wiązania lakazy z nośnikiem.

Badania doświadczalne

Materiał biologiczny

Badania prowadzono z zastosowaniem lakazy grzybowej uzyskanej z płynnej hodowli szczepu *Cerrena unicolor* (CU139), znajdującego się w Kolekcji Grzybowej Zakładu Biochemii UMCS.

Warunki hodowli

Szczep *C. unicolor* przechowywano na szalkach *Petriego* zawierających 10 ml podłoża maltozowego (MEA) o następującym składzie [g/l]: glukoza (10), ekstrakt maltozowy (4), agar (2). Czternastodniowe hodowle stacjonarne szczepu CU139 prowadzono na podłożu PDB o składzie [g/l]: ekstrakt ziemniaczany (4), glukoza (20). Wyrośnięte hodowle homogenizowano i przenoszono do bioreaktora o pojemności 10 l zawierającego 7 l podłoża *Lindeberga* i *Holme'a* o składzie [g/l]: glukoza (10), asparagina (1,5), NaNO₃ (3), MgSO₄ × 12 H₂O (0,5), KH₂PO₄ (0,47), Na₂HPO₄ × 12 H₂O, ekstrakt drożdżowy (0,1) oraz mikroelementy. Napowietrzaną, płynną hodowlę *C. unicolor* prowadzono przez 10 dni w 25 °C.

Otrzymanie czystego preparatu lakazy

Oddzielony od grzybni płyn pohodowlany zagęszczono z użyciem membrany filtrującej *Millipore* (punkt odcięcia 10 kDa) do objętości 15 ml. Tak przygotowany preparat naniesiono na kolumnę chromatograficzną ze złożem *HQ-Sepharose* i prowadzono rozdzielanie z zastosowaniem chromatografii cieczowej (FPLC) oraz 1 M roztworu (NH₄)₂SO₄ w 5 mM buforze TRIS-HCl w gradien-

cie 0-50%. Otrzymane frakcje lakazy odsolono na komórce ultrafiltracyjnej z zastosowaniem 5 mM buforu TRIS-HCl i zamrożono do chwili użycia.

Metodyka immobilizacji

Kowalencyjne wiązanie lakazy przeprowadzono dla czterech różnych nośników o charakterystyce przedstawionej w tab. 1.

Tab. 1. Charakterystyka nośników stosowanych do immobilizacji lakazy

Nośnik	Parametry nośnika	Grupa funkcyjna obecna na nośniku	Aktywator/pH
Akrylowy	$d = 0,2 \pm 0,3$ mm $S_{BET} = 690$ m ² /g $V_p = 0,8$ cm ³ /g $d_m = 9,4$ nm	-NH ₂	GLA/7,0
		-OH	DVS/8,2
		-COOH	CDI/5,2
Krzemionkowy (Keiselgel MN APM 1,0)	$d = 0,2 \pm 0,5$ mm $S_{BET} = 270 \pm 302$ m ² /g $V_p = 0,52 \pm 0,57$ cm ³ /g $d_m = 4,0 \pm 4,6$ nm	-NH ₂	GLA/7,0

d - średnica cząsteczek, *S_{BET}* - powierzchnia wiązania, *V_p* - objętość porów, *d_m* - rozmiar porów, DVS - diwinylosulfon, GLA - glutaraldehyd, CDI - karbodiimid

W zależności od rodzaju użytego aktywatora, wiązanie enzymu następowało przez różne grupy funkcyjne obecne na powierzchni nośnika. Rodzaj aktywatora determinował ponadto zastosowanie odpowiedniej metodyki przygotowania nośnika i nanoszenia preparatu enzymatycznego. Przed użyciem wszystkie nośniki zostały dokładnie przepłukane wodą destylowaną a następnie 0,1M buforem fosforanowym o pH 7.

Przygotowanie nośników aktywowanych aldehydem glutarowym (GLA). W celu aktywacji grup aminowych, odsączony nośnik zalano 20 ml 0,1 M buforu fosforanowego pH 7 i 2 ml GLA, a następnie całość wytrząsano (90 rpm) przez 40 minut. Po przepłukaniu nośnika buforem dwukrotnie przemyto go zimnym buforem fosforanowym aż do zaniku zapachu aldehydu, zachowując co najmniej dziesięciominutową przerwę pomiędzy przemyciami. Do tak przygotowanego nośnika dodano 10 ml enzymu zawieszonego w 0,1 M buforze fosforanowym i całość wytrząsano (90 rpm) w temperaturze pokojowej przez 2 godziny a następnie w 4 °C przez 24 godziny.

Przygotowanie nośników aktywowanych diwinylosulfonem (DVS). Nośnik przepłukano buforem fosforanowym i 1 M roztworem Na₂CO₃ a następnie przeprowadzono wytrząsanie 2-godzinną aktywację grup hydroksylowych z zastosowaniem 2 ml DVS, zawieszonego w 10 ml 1 M Na₂CO₃. Po tym czasie nośnik przepłukano wodą destylowaną do uzyskania wartości pH 8 a następnie 0,1 M roztworem Na₂HPO₄. Do tak przygotowanego nośnika dodano 10 ml roztworu enzymu zawieszonego w 0,1 M Na₂HPO₄ i wytrząsano (90 rpm) najpierw przez 2 godziny w temperaturze pokojowej a następnie przez 24 godziny w 4 °C.

Przygotowanie nośników aktywowanych karbodiimidem (CDI). Nośnik przepłukano dwukrotnie 0,1 M roztworem KH₂PO₄. W celu aktywowania grup karboksylowych do nośnika dodano 2 ml CDI i 10 ml 0,1 M KH₂PO₄ a następnie całość mieszało przez 20 minut. Po tym czasie nośnik przepłukano wodą destylowaną oraz 0,1 M KH₂PO₄. Do tak przygotowanego nośnika dodano 10 ml enzymu zawieszonego w 0,1 M roztworze

KH_2PO_4 i wytrąsano (90 rpm) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej a następnie przez 24 godziny w 4 °C.

Wytlukiwanie niezwiązanego enzymu. Po upływie 24 godzin wszystkie nośniki przepłukano 0,1 M buforem fosforanowym *pH* 7 w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek enzymu, czyli do momentu, kiedy absorbancja roztworu mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm spadnie poniżej 0,01. W zebranych eluatach fosforanowych oznaczono stężenie białka metodą *Lowry'ego* oraz aktywność lakazy z użyciem ABTS jako substratu. W kolejnym etapie prowadzono trzykrotne płukanie nośników 0,5 M roztworem NaCl w odstępach co 10 minut, trzykrotne płukanie buforem fosforanowo-cytrynianowym *pH* 5 w odstępach co 30 minut a następnie płukanie 0,5 M buforem TRIS-HCl oraz płukanie wodą destylowaną.

Pomiar aktywności unieruchomionej lakazy

Aktywność lakazy unieruchomionej na nośniku była oznaczana z zastosowaniem 0,25 mM ABTS w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o wartości *pH* 5,3 w temperaturze 30 °C. Pomiar aktywności odczytywano poprzez zmianę wartości absorbancji w ciągu 30 s przy długości fali 414 nm.

Aktywność operacyjna unieruchomionej lakazy

Aktywność operacyjna lakazy unieruchomionej na nośniku została określona dla procesu transformacji prekursora AHBS w produkt barwny. W celu określenia ilości cykli transformacyjnych dla 10 ml mieszaniny 1 mM prekursora AHBS w 100 mM buforze winianowym o wartości *pH* 5, prowadzono reakcję transformacji z zastosowaniem 25 mg nośnika z unieruchomioną lakazą. Po godzinnej reakcji odczytywano wartość absorbancji produktu przy długości fali 436 nm, która była charakterystyczna dla otrzymanego produktu barwnego. Po tym czasie nośnik przepłukiwano buforem winianowym do zaniku barwy pozostałego produktu, po czym nośnik zalewano świeżą porcją prekursora w buforze. W trakcie oznaczenia przeprowadzono cztery takie cykle reakcji.

Wyniki

W pierwszym etapie badań określono stężenie białka i aktywność lakazy w eluatach fosforanowych, otrzymanych po procesie unieruchamiania oraz aktywność lakazy związanej z nośnikiem. Otrzymane wartości białka w eluatach pozwoliły na średnie określenie ilości białka związanego z nośnikiem (Tab. 2).

Uzyskane dane pozwoliły stwierdzić, że największy procent białka związany został na nośniku akrylowym, sfunkcjonalizowanym grupami aminowymi i aktywowanym glutałdehydem (62%). Najniższe wartości odnotowano dla nośnika akrylowego z grupami hydroksylowymi i aktywowanego diwinylosulfonem, z którym związało się tylko 13% białka. Na podstawie pomiarów aktywności lakazy określono wydajność immobilizacji (Tab. 3), która wyraża procent związanej aktywności lakazy z nośnikiem w porównaniu z aktywnością lakazy natywnej użytej do immobilizacji. Największą wydajność immobilizacji uzyskano na nośniku krzemionkowym (7,3%), z którym lakaza została związana poprzez grupy aminowe.

Tab. 2. Porównanie zawartości białka przed i po immobilizacji lakazy

Białko		Rodzaj nośnika			
		Akryl. (GLA)	Akryl. (DVS)	Akryl. (CDI)	Krzem. (GLA)
w preparacie lakazy przed immobilizacją	[mg/g]	10,8	5,4	4,7	8,3
niezwiązane z nośnikiem	[mg/g]	4,1	4,8	2,7	6,8
na nośniku	[mg/g]	6,7	0,7	2	1,5
związane z nośnikiem	[%]	62	13	42	18

Tab. 3. Aktywność lakazy przed i po immobilizacji (wyrażona w jednostkach aktywności U na gram nośnika)

Aktywność		Rodzaj nośnika			
		Akryl. (GLA)	Akryl. (DVS)	Akryl. (CDI)	Krzem. (GLA)
enzymu natywnego w buforze	[U/g]	1476,6	1108,9	1139,3	1132,1
enzymu niezwiązanego z nośnikiem	[U/g]	80,11	105,09	91,87	15,25
przewidywana na nośniku	[U/g]	1396,51	1003,86	1047,43	1116,83
enzymu zmierzona na nośniku	[U/g]	74,62	5,75	15,79	81,65
wydajność immobilizacji	[%]	5,3	0,6	1,5	7,3

W przypadku zastosowania nośnika akrylowego z grupami hydroksylowymi pomimo aktywacji za pomocą diwinylosulfonu, otrzymano najniższą wydajność immobilizacji lakazy (0,6%).

Ponadto na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że procentowa ilość związanej białka nie przekładała się na procentową aktywność unieruchomionej lakazy (Tab. 2).

W dalszej części badań immobilizowaną lakazę zastosowano do transformacji bezbarwnego prekursora AHBS w barwny produkt o potencjalnym zastosowaniu jako barwnik tekstylny. Przeprowadzono cztery jednogodzinne cykle transformacji, po których zmierzono spektrofotometrycznie wartość absorbancji produktu przy długości fali 436 nm.

Tab. 4. Ilość produktu transformacji prekursora AHBS (Abs 436 nm), powstałego w czasie czterech (I-IV) 1-godzinnych cykli transformacji przez lakazę unieruchomioną na nośnikach

Nośnik	Ilość produktu (Abs 436 nm)			
	I cykl	II cykl	III cykl	IV cykl
Akrylowy (GLA)	2,9	2,2	0,3593	0,372
Akrylowy (DVS)	0,06	0,047	0,035	0,0272
Akrylowy (CDI)	0,101	0,091	0,012	0,0101
Krzemionkowy (GLA)	3,33	3,02	0,275	0,2531

Na podstawie uzyskanych wyników (Tab. 4) stwierdzono, że największą ilość produktu transformacji prekursora AHBS otrzymano z udziałem lakazy unieruchomionej na nośnikach akrylowym i krzemionkowym, zawierających grupy aminowe i aktywowanymi aldehydem glutałowym. W czasie IV cyklu wydajność transformacji w przypadku trzech nośników była dużo niższa i wynosiła od 8 do 13% i tylko w przypadku nośnika akrylowego aktywowanego diwinylosulfonem wynosiła 45%.

Wnioski

Stwierdzono, że najlepszym nośnikiem do unieruchomienia lakazy jest krzemionka z aminowymi grupami funkcyjnymi, aktywowana glutałdehydem. Pomimo niskiego procentu białka związanej z tym nośnikiem, aktywność unieruchomionej lakazy oraz aktywność operacyjna podczas transformacji prekursora AHBS były najwyższe.

Powstający w dużych ilościach produkt może w dużym stopniu ograniczać dostęp substratu do centrum lakazy, zmniejszając przez to wydajność procesu, co uwidoczniło się w drugim cyklu reakcji.

LITERATURA

- Asgher M., Shahid M., Kamal S., Muhammad H., Iqbal N., 2014, Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **101**, 56- 66 <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.016>
- Rao M. A., Sclza R., Acevedo F., Diez M. C., Gianfreda L., 2014, Enzymes as useful tool for environmental purposes, *Chemosphere*, **107**, 145-162 <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.059>