

Michał BLATKIEWICZ<sup>1</sup>, Anna ANTECKA<sup>1</sup>, Stanisław LEDAKOWICZ<sup>1</sup>, Juliane MERZ<sup>2</sup>, Andrzej GÓRAK<sup>1</sup>

e-mail: michal.blatkiewicz@p.lodz.pl

<sup>1</sup> Katedra Inżynierii Bioprocusowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź<sup>2</sup> Anlagen- und Prozesstechnik, Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund, Dortmund, Deutschland

## Zastosowanie procesu frakcjonowania pianowego do zateżenia lakazy z *Cerrena unicolor*

### Wstęp

Wydzielanie, zateżanie i oczyszczanie produktów biologicznych, znane pod pojęciem downstream processing, jest najbardziej energochłonnym i kosztownym elementem ich produkcji [Roque i in., 2004]. Częsteczki pochodzenia biologicznego, takie jak enzymy, są bardzo nietrwałe i wrażliwe na wiele czynników środowiskowych, takich jak podwyższona temperatura, ekstremalne wartości pH, czy niektóre odczynniki chemiczne [Eijsinck i in., 2005]. Przez to standardowe metody chemiczne, takie jak ekstrakcja lub destylacja nie mają zastosowania w procesach oczyszczania enzymów.

Frakcjonowanie pianowe FF (*Foam Fractionation*) jest nowatorską metodą, która może być wykorzystywana do bezpiecznego odzyskiwania produktów biologicznych z zanieczyszczonych mieszanin, którego dodatkową zaletą jest łatwość odzysku z bardzo rozcieńczonych roztworów, dzięki czemu jest wygodnym pierwszym krokiem w wielostopniowych procesach oczyszczania [Merz i in., 2011]. Jest to jeden z procesów separacji pęcherzykowej, w którym część składników mieszaniny migruje do powierzchni międzyfazowej pomiędzy cieczą a gazem [Lemlich, 1968]. Polega on na zasilaniu kolumny zawierającej rozpuszczony produkt inertnym gazem (najczęściej powietrze lub azot), w wyniku czego wytwarza się pianę, która migruje w górę kolumny, a następnie jest odbierana w fazie ciekłej. W rezultacie kondensat piany (*foamate*) zawiera podwyższone stężenie składników powierzchniowo czynnych, takich jak białka, ewentualne surfaktanty, itp. [Gerken i in., 2006]. Dobór odpowiednich parametrów procesu frakcjonowania pianowego, takich jak pH, temperatura, czy odpowiednie detergenty, pozwala na selektywne oczyszczanie pożądaných składników z mieszanin, dzięki czemu w kolumnie może zachodzić efekt rozdzielania chromatograficznego [Maas, 1973].

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu procesu frakcjonowania pianowego na zateżanie lakazy z płynu pochodowlanego szczepu *Cerrena unicolor*.

### Badania doświadczalne

#### Materiały

Szczep *Cerrena unicolor* był hodowany na płytkach agarowych przez 7 dni. Następnie grzybnię homogenizowano z wodą z prędkością 8000 rpm i przenoszono do kolb zawierających 200 ml podłoża *Lindberg-Holm* [1952]. Po 10 dniach zawartość kolb filtrowano, a przesączony płyn pochodowlany, zawierający lakazę, zamrażano w celu zachowania aktywności enzymu.

Bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB) oraz 2,2-azynobis(3etylobenzo tiazolino-6-sulfonowy kwas) (ABTS) firmy *Sigma-Aldrich*.

Woda do rozcieńczenia prób była oczyszczana za pomocą układu *Milli-Q Synthesis A10* (Millipore).

#### Oznaczanie aktywności

Aktywność oznaczana była metodą spektrofotometryczną z użyciem ABTS jako substratu [Majcherczyk i in., 1999]. Mierzono zmianę utlenienia cząsteczek

ABTS w czasie za pomocą aparatu *Multiskan FC* firmy *Thermo Scientific*. Współczynnik ekstynkcji dla ABTS przy długości fali 420 nm wynosi  $\epsilon = 0,04321$  l/(mmol·cm). Wszystkie pomiary aktywności wykonywano w trzech powtórzeniach.

Aktywność była definiowana jako ilość enzymu katalizująca reakcję utleniania 1  $\mu$ mol ABTS przez minutę, a obliczano ją z użyciem następującego wzoru:

$$act \left[ \frac{U}{l} \right] = \frac{\Delta E \cdot D \cdot V_t}{\Delta t \cdot V_s \cdot d \cdot \epsilon} \quad (1)$$

gdzie:

$\Delta E$  – zmiana absorbancji;  $D$  – współczynnik rozcieńczenia [-];  $V_t$  – objętość próby [ $\mu$ l];  $\Delta t$  – czas pomiaru [min];  $V_s$  – objętość próbki enzymu [ $\mu$ l];  $d$  – wysokość próby w zagłębieniu [mm];  $\epsilon$  – współczynnik ekstynkcji [l/mmol cm].

#### Aparatura

Aparat do frakcjonowania pianowego stanowiła kolumna składająca się z części cieczerwowej (długość 18cm i średnica 3 cm) wyposażonej w element rozpraszający gaz, wykonany ze szkła spiekane, oraz z części pianowej (długość 56cm i średnica 1,6cm) wyposażonej w odbieralnik do piany (Rys. 1).

Eksperyment rozpoczynano od włączenia przepływu gazu i ustalenia jego natężenia na poziomie 2,4l/h. Następnie napełniano część cieczerwową kolumny roztworem o objętości 80 ml. Wytworzoną pianę odbierano za pomocą kolby ssawkowej wyposażonej w lejek, co pozwalało na rozbicie piany do fazy ciekłej. Eksperymenty prowadzono do momentu, w którym piana rozpadała się przed dotarciem do odbieralnika, po czym odbierano próby kondensatu piany oraz retentatu pozostałego w kolumnie.

Wszystkie eksperymenty prowadzono w temperaturze pokojowej.

### Wyniki i dyskusja

Podstawowym parametrem charakteryzującym skuteczność zateżenia enzymu jest współczynnik podziału aktywności  $K_{act}$ , definiowany jako stosunek aktywności enzymatycznej w kondensacie piany do aktywności w retentacie.

$$K_{act} = \frac{act_F}{act_R} \quad (2)$$

gdzie:

$act_F$  – aktywność w kondensacie piany, [U/l]

$act_R$  – aktywność w retentacie, [U/l]

Drugim parametrem jest współczynnik odzysku  $Y$ , który definiuje się jako stosunek aktywności enzymu w kondensacie piany do aktywności enzymu wprowadzonego do układu.

$$Y = \frac{V_F \cdot act_F}{V_{mi} \cdot act_{mi}} \quad (3)$$

gdzie:

$V_F$  – objętość kondensatu piany, [ml]

$act_F$  – aktywność w kondensacie piany, [U/l]

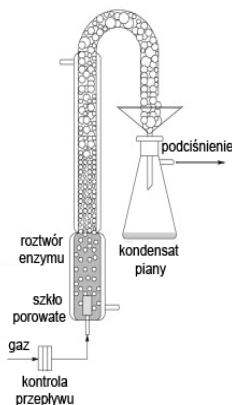
$V_{mi}$  – objętość wprowadzonej mieszaniny, [ml]

$act_{mi}$  – aktywność wprowadzonej mieszaniny, [U/l]

#### Badanie wpływu pH

Celem pierwszej serii eksperymentów było znalezienie optymalnej wartości pH dla układu. Do płynu pochodowlanego nie wprowadzono żadnych dodatków przed umieszczeniem go w kolumnie.

Białka odznaczają się największą hydrofobowością w pH równym



Rys. 1. Schemat aparatury do frakcjonowania pianowego [Burghoff, 2011]

Tab. 1. Badanie wpływu pH

pH	czas [min]	objętość kondensatu piany [ml]	objętość retentatu [ml]	współczynnik podziału, $K_{act}$	współczynnik odzysku, $Y$
7,0	Niewystarczająca stabilność piany				
6,0	Niewystarczająca stabilność piany				
5,0	Niewystarczająca stabilność piany				
4,0	23	5	73	3,26	0,13
3,5	34	4,1	75	2,50	0,11
3,0	Niewystarczająca stabilność piany				

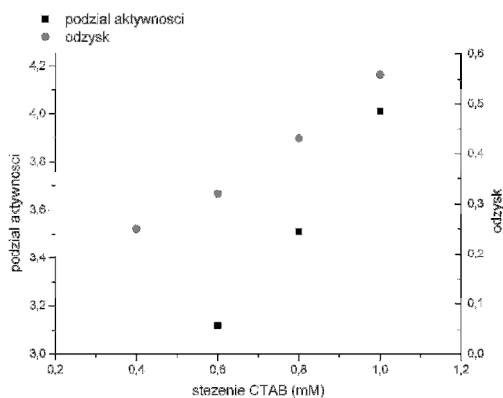
ich punktowemu izoelektrycznemu [Bhattacharya i in., 1991]. Szczep *Cerrena unicolor* produkuje przynajmniej 2 izoforny lakazy, których punkty izoelektryczne znajdują się w przedziale pH 3,5÷4,0 [Michniewicz i in., 2005].

Zbadano zachowanie układu dla 6 różnych wartości pH w zakresie 3,0÷7,0. Wyniki przedstawiono w tab. 1.

Tylko w przypadku wartości pH 3,5 i 4,0 stabilność piany była wystarczająca, aby zaszedł proces frakcjonowania pianowego. Uzyskane ilości kondensatu piany były niewielkie ze względu na brak dodatku detergentu, co skutkowało bardzo małymi współczynnikami odzysku enzymu. Dla pH 4,0 stężenie enzymu w kondensacie piany było ponad trzykrotnie wyższe niż w retencji. Odzysk był nieznacznie lepszy niż w przypadku pH 3,5.

### Wpływ CTAB

Do kolejnych prób płynu pochodzącego dodawano detergent – bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB) w odpowiednich stężeniach, aby określić jak dodatek surfaktantu wpływa na wydajność procesu frakcjonowania. Przetestowane zostały cztery stężenia CTAB: 0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM; 1,0 mM. Wszystkie próby miały wartość pH ustaloną na 4,0. Wyniki przedstawiono na rys. 2.



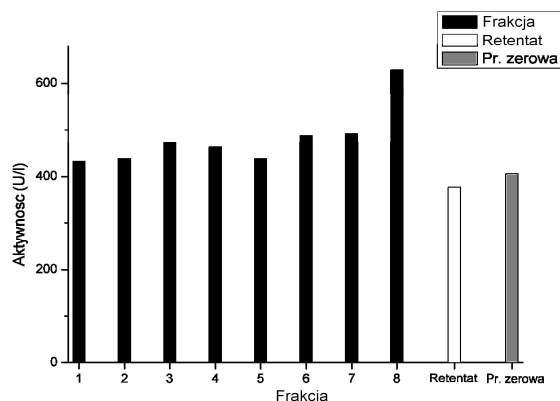
Rys. 2. Wpływ różnych stężeń CTAB

Największy współczynnik podziału zaobserwowano dla stężenia detergentu 1,0 mM, wynoszący około 4. Wraz ze zwiększaniem stężenia CTAB we wprowadzanej mieszaninie, obserwowano stopniowy wzrost współczynnika odzysku enzymu. Dla stężenia CTAB równego 1,0 mM sięgał on 56%, co wskazuje na dobrą wydajność procesu w wyższym stężeniu detergentu.

### Zmiana wydajności frakcjonowania pianowego w czasie

Ostatnim krokiem było przeprowadzenie eksperymentu, w którym odbierano próby kondensatu pianowego w równych odstępach czasu i porównywano aktywności enzymu w poszczególnych frakcjach. Wartość pH ustalono na 4,0, a stężenie CTAB na 0,4 mM. Frakcje odbierano co 5 minut od momentu odbioru pierwszej porcji piany do momentu całkowitego wypienienia, co dało 8 frakcji. Aktywności poszczególnych frakcji, pozostałego retentatu oraz wprowadzanej mieszaniny przedstawiono na rys. 3.

Z rys. 3. można wywnioskować, że transport enzymu do piany jest podobny w trakcie trwania całego procesu, ponieważ aktywności poszczególnych frakcji są do siebie zbliżone.



Rys. 3. Aktywność enzymu w cyklicznie pobieranych frakcjach

### Wnioski

Płyn pochodzący ze szczepu *Cerrena unicolor* zawiera wystarczającą substancję powierzchniowo czynnych, aby proces frakcjonowania pianowego zaszedł bez dodatku detergentów, ale stabilna piana pojawia się dopiero w wartościach pH bliskich punktowemu izoelektrycznemu zawartej w nim lakazy.

Dodatek CTAB w stężeniu 1,0 mM pozwala na uzyskanie podobnych współczynników podziału co w przypadku czystego płynu pochodzącego, ale z ponad czterokrotnie wyższym odzyskiem.

Eksperyment z odbieraniem frakcji piany w równych odstępach czasowych wykazał, że układ badanego enzymu i badanego detergentu nie wykazuje istotnych zmian w przenoszeniu enzymu do piany w trakcie trwania procesu.

### LITERATURA

- Bhattacharya P., Ghosal S.K., Sen K., 1991. Effect of physicochemical parameters on the separation of proteins from human placental extract by using a continuous foam fractionating column. *Sep. Sci. Technol.*, **26**, 1279–1293. DOI: 10.1080/01496399108050532
- Eijsink V.G.H., Gåseidnes S., Borchert T.V., van den Burg B., 2005. Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.*, **22**, 21–30. DOI: 10.1016/j.bioeng.2004.12.003
- Gerken B.M., Nicolai A., Linke D., Zorn H., Berger R.G., Parlar H., 2006. Effective enrichment and recovery of laccase C using continuous foam fractionation. *Sep. Pur. Tech.*, **49**, 291–294. DOI: 10.1016/j.seppur.2005.09.015
- Lemlich R., 1968. Adsorptive bubble separation methods – foam fractionation and allied techniques. *Ind. Eng. Chem.*, **60**, 16–29 DOI: 10.1021/ie50706a005
- Lindeberg, G., Holm, G., 1952. Occurrence of tyrosinase and laccase in fruit bodies of mycelia of some Hymenomycetes. *Physiol. Plant.*, **5**, 100–114. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1952.tb08234.x
- Maas K., 1973. Adsorptive bubble separation methods, in: *Methodicum Chemicum*. Academic Press, New York
- Majcherczyk A., Johannes C., Hüttermann A., 1999. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51** (2), 267–276
- Merz J., Burghoff B., Zorn H., Schembecker G., 2011. Continuous foam fractionation: Performance as a function of operating variables. *Sep. Pur. Tech.*, **82**, 10–18. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.07.023
- Michniewicz, A. Ledakowicz, S. Urlich, R. Hofrichter, M. 2005. Biosynteza i separacja kompleksu lakazowego na dwa izoenzymy z *Cerrena unicolor*. *Chem. Eng. Equip.*, **4**, 56–57.
- Roque A.C.A., Lowe C.R., Taipa M.A., 2004. Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechn. Progr.*, **20**, 639–654. DOI: 10.1021/bp030070k

**Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu UMO-2013/11/B/ST8/00337 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Autorzy dziękują Dr Juliane Merz za udostępnienie aparatury.**