

Jolanta BRYJAK, Maciej MATYSIK, Wojciech KRAWCZYK

e-mail: jolanta.bryjak@pwr.wroc.pl

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Wykorzystanie lakazy natywnej i immobilizowanej do usuwania p-anizydyny

Wstęp

p-Anizydyna (ANI) jest wykorzystywana w syntezie wielu barwników azowych (np. *Garnet Base GP*, *Apthol AS-SG*) oraz prowadzone są badania nad syntezą nowych barwników, które mogą być wykorzystane w przemyśle tekstylnym [Zahra, 2011] lub w komórkach solarnych [Cao i in., 2010]. Jest to także znany związek kancerogenny, który musi być usuwany ze ścieków przemysłowych. Jedną z możliwości może być utlenianie ANI z udziałem oksydaz, do których należą lakazy.

Lakazy charakteryzują się niewielką specyficznością substratową względem związków fenolowych. Szczególną zaletą tych enzymów jest kataliza nie wymagająca stosowania kofaktorów, gdyż ko-substratem jest tlen rozpuszczony w wodzie. Potencjalne zastosowania lakaz obejmują: oczyszczanie wód, obróbkę pulpy papierniczej, degradację polimerów i ksenobiotyków, konstrukcję biosensorów, syntezę chemoenzymatyczną oraz oksydacyjną polimeryzację [Riva, 2006]. Liczne przykłady zastosowań lakaz w oczyszczaniu ścieków zostały ostatnio wyczerpująco omówione w pracy przeglądowej [Strong i Claus, 2011]. Procesy oczyszczania wody zwykle polegają na reakcji lakazy ze związkiem fenolowym z utworzeniem rodnikowych produktów, które w dalszych etapach ulegają spontanicznej polimeryzacji, tworząc nierozpuszczalne w wodzie oligo- i polimery.

Substraty lakaz są trudno rozpuszczalne w wodzie, a enzym w obecności rodnikowych produktów reakcji zazwyczaj ulega szybkiej inaktywacji. Dlatego celem intensyfikacji reakcji i zwiększenia stabilności enzymu, należy stosować metody typowe dla inżynierii roztworów (np. dodanie ko-rozpuszczalnika) i inżynierii mikrośrodowiska (np. immobilizacja).

Celem badań był dobór takiego ko-rozpuszczalnika i jego stężenia, aby stabilność enzymu natywnego i immobilizowanego w warunkach ciągłego kontaktu z produktami reakcji utleniania ANI była istotnie większa, z jednoczesnym ograniczeniem sorpcji produktów na powierzchni nośnika.

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano lakazę produkowaną przez szczep *Cerrena unicolor*, otrzymany z kolekcji kultur Wydziału Biochemii UMCS w Lublinie. Warunki hodowli grzyba oraz wstępnego oczyszczania lakazy opisano uprzednio [Bryjak i Rekuć, 2010]. Do immobilizacji lakazy wykorzystano nośnik krzemionkowy (Z), akrylowy (A) i z mikrokrystalicznej celulozy (G), których grupy aminowe były aktywowane aldehydem glutarowym, po czym białko było wiązane kowalencyjnie [Zynek i in., 2011].

Aktywność enzymu natywnego lub immobilizowanego mierzono prowadząc procesy w termostатовanym (30°C) mieszalnikowym (200 rpm) reaktorze okresowym, zawierającym 1,25 mM ANI. Próbkę pobierano z reaktora w odstępach 1 min i mierzono absorbancję przy długości fali 540 nm.

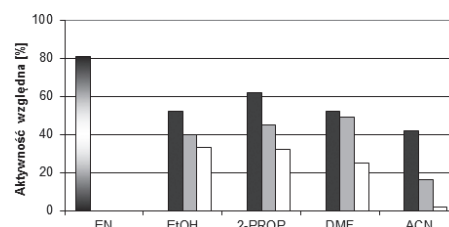
Procesy utleniania ANI z enzymem immobilizowanym prowadzono metodą wstrząsaną w reaktorach o objętości roboczej 100 mL (wytrząsarka *Laboplay*) przy obrotach 60 rpm, w temperaturze 30°C. W reaktorze umieszczano elektrodę tlenową (*Intellical LDO*, *Hach Lange*) i dodawano ANI w ilości zapewniającej stężenie w reaktorze 0,25 mM. Próbkę nośnika do pomiarów aktywności odmywano buforem. Procesy z ANI prowadzono w buforze lub w buforze zawierającym 10% 2-propanol. W reakcjach kontrolnych znajdował się bufor lub bufor zawierający 10% 2-propanol. Analogiczne badania wykonano w reaktorach mieszalnikowych stosując enzym natywny.

Wyniki badań i ich omówienie

Badania nad możliwością utleniania ANI z udziałem lakazy rozpoczęto od doboru takiego stężenia substratu, aby szybkość utraty aktywności enzymu nie była zbyt duża. W tym celu w reakcjach testowych zastosowano stężenia ANI od 0,2 do 1,0 mM (dane nieprezentowane) i wykazano, że enzym natywny w obecności najniższego zastosowanego stężenia ANI ulega całkowitej inaktywacji już po 5 h. Uważa się, że główną przyczyną inaktywacji jest tworzenie się wczesnych rodnikowych produktów reakcji, które modyfikują cząsteczkę białka, powodując rozfałdowanie struktury III-rzędowej. Oznacza to, że nie należy stosować zbyt dużych stężeń ANI i korzystniejsze jest w takich przypadkach dozowanie substratu o niższym stężeniu w kilku porcjach (również [Manda i in., 2006]).

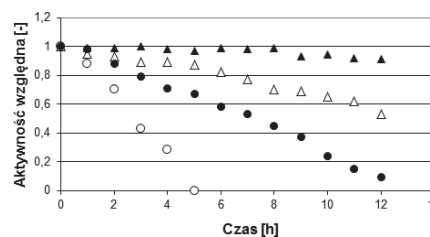
Stabilizacja rodników w mikrootoczeniu enzymu

Jedną z metod stabilizacji rodników w mikrootoczeniu enzymu może być dodanie mieszającego się z wodą rozpuszczalnika organicznego, jednak jego stężenie należy tak dobrać, aby nie wywoływało dodatkowej utraty aktywności. We wcześniejszych badaniach wykazano, że dimetyloformamid, etanol, acetonitryl i 2-propanol w stężeniach powyżej 20% objętościowych wywołują szybką inaktywację lakazy [Bryjak i in., 2012], dlatego w dalszych testach wykorzystano powyższe rozpuszczalniki w stężeniach 10÷20% (Rys. 1). Poszukując ko-rozpuszczalnika najbardziej zachowawczego dla enzymu, wybrano 10% 2-propanol, jako pozwalający uzyskać ponad 60% aktywności enzymu po 56 h inkubacji w 30°C.



Rys. 1. Aktywność natywnej lakazy po 56 h inkubacji w 30°C (pH 5,3) w buforze (EN) oraz w obecności etanolu (EtOH), 2-propanolu (2-PROP), dimetyloformamidu (DMF) i acetonitrylu (ACN) o stężeniach 10% (słupki ciemnoszare), 15% (słupki jasnoszare) i 20% (słupki białe)

Procesy utleniania ANI prowadzono w reaktorze okresowym z dodatkiem 10% 2-propanolu, z serią 3 procesów kontrolnych (Rys. 2). W trakcie procesów z ANI monitorowano stężenie tlenu, celem określenia momentu, w którym należy dodać kolejną porcję substratu. Założono, że po początkowym spadku stężenia tlenu, jego powolny wzrost może być sygnałem wyczerpywania się substratu lub/ oraz utraty aktywności enzymu. Jeżeli kolejna porcja substratu powodowała dalszy spadek stężenia tlenu, to oznaczało, że enzym nadal jest reaktywny. Ta-



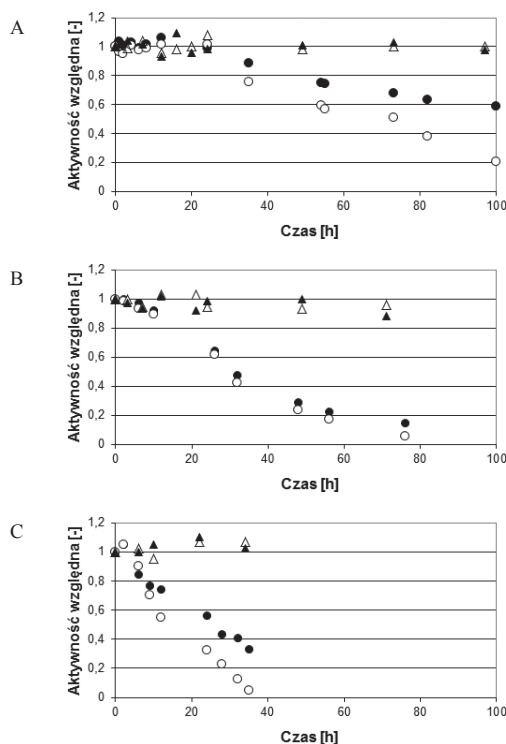
Rys. 2. Aktywność lakazy natywnej w czasie procesu utleniania anizydyny o stężeniu 0,2 mM w buforze (○) lub w buforze zawierającym 10% 2-propanol i 0,2 mM ANI (●). Procesy kontrolne: aktywność podczas przetrzymywania w buforze (▲) i w buforze zawierającym 10% 2-propanol (△)

kie postępowanie umożliwiało utrzymywanie w roztworze reakcyjnym dużych ilości produktów w formie rodnikowej.

Analiza uzyskanych wyników potwierdziła stabilizujący wpływ 2-propanolu na reaktywność lakazy w obecności produktów; po 12 h reakcji enzym zachował około 10% aktywności początkowej, natomiast podczas reakcji w buforze lakaza uległa całkowitej inaktywacji już w 5 h procesu. Zauważono również, że w warunkach otwartego reaktora mieszalnikowego spadek stężenia tlenu nie był na tyle duży, aby limitował szybkość reakcji.

Utlenianie anizydyny z udziałem lakazy immobilizowanej

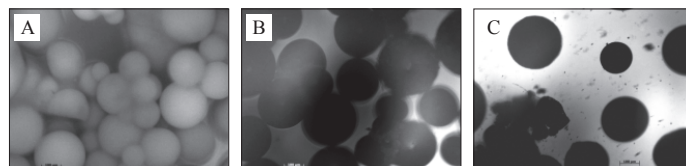
W dalszej kolejności wykonano serię procesów z wykorzystaniem enzymu immobilizowanego na 3 różnych nośnikach (Rys. 3). Podczas prowadzonych procesów monitorowano stężenie tlenu i najszybszy jego spadek uzyskano dla preparatu z nośnikiem akrylowym w 1 h procesu, po czym stężenie wzrastało bardzo powoli (dane nieprezentowane). Kolejne porcje substratu dodawano zatem co 2 h, a następnie co 4-10 h, stosownie do utraty aktywności. Natomiast w celu testowania stabilności enzymu, z reaktora pobierano próbkę nośnika, intensywnie odmywano buforem do zaniku charakterystycznego czerwonego zabarwienia, po czym oznaczano aktywność.



Rys. 3. Aktywność lakazy immobilizowanej na nośniku A (A), Z (B) i G (C) w czasie procesu utleniania anizydyny o stężeniu 0,2 mM w buforze (○) lub w buforze zawierającym 10% 2-propanol i 0,2 mM ANI (●). Procesy kontrolne: aktywność podczas przetrzymywania w buforze (▲) i w buforze zawierającym 10% 2-propanol (△)

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że o ile enzym natywny po 5 h reakcji z ANI utracił aktywność, to po immobilizacji i przy ciągłej obecności produktów reakcji zanotowano 20% początkowej szybkości reakcji po 25 h (G), 55 h (Z) i po 100 h (A). Natomiast dodatek 2-propanolu wydłużył funkcjonowanie enzymu natywnego ponad dwukrotnie (12-13 h), a w przypadku preparatów immobilizowanych nie miał wpływu (Z) lub wywoływał dodatkową stabilizację (G; z 25 do 40 h) albo stabilizował bardzo wyraźnie (A; po 100 h reakcji zachowało się około 60% aktywności początkowej).

Dotychczasowe badania miały za zadanie dobranie takich warunków reakcji, w których lakaza zachowuje stabilność w obecności rodnikowych produktów reakcji. Jednak odmywanie nośnika z wytrąconych produktów reakcji nie odzwierciedla problemów związanych z katalizą heterogeniczną, a przede wszystkim z ewentualną sorpcją produktów na nośnikach. Wykonane zdjęcia mikroskopowe dla najlepszego układu z nośnikiem akrylowym (Rys. 4) wykazały, że w reakcji prowadzonej



Rys. 4. Zdjęcia mikroskopowe nośnika akrylowego po immobilizacji (A), po reakcji z ANI w buforze (B) oraz po reakcji z ANI w buforze z dodatkiem 10% 2-propanolu (C)

w buforze na powierzchni nośnika wytrąciły się duże ilości produktów, tworząc lśniącą i względnie jednolitą powłokę, przy nieznacznej ich ilości w roztworze zewnętrznym. Z kolei powierzchnia nośnika, pochodzącego z mieszaniny reakcyjnej, zawierającej dodatkowo propanol, zmieniła kolor, natomiast aglomeraty produktów znajdowały się głównie w roztworze zewnętrznym.

Podsumowanie i wnioski

Głównym celem badań był dobór takiego rodzaju ko-rozpuszczalnika i jego stężenia, aby uzyskać zwiększoną stabilność enzymu natywnego w obecności rodnikowych produktów reakcji utleniania ANI. Wstępne testy wykazały, że 2-propanol w stężeniu 10% nie wywołuje istotnie zwiększonej inaktywacji enzymu i został wykorzystany do dalszych badań.

Stabilizujące działanie 2-propanolu na lakazę natywną potwierdzono, gdyż w porównaniu z procesem bez ko-rozpuszczalnika, czas funkcjonowania enzymu wydłużył się ponad dwukrotnie; do 12 h.

Celem dodatkowego zwiększenia stabilności lakazy, w procesach zastosowano również 3 preparaty z enzymem związanym kowalencyjnie, co wydłużyło czas działania enzymu do 40 h (G), 80 h (Z) i ponad 100 h (A). We wszystkich przypadkach zaobserwowano sorpcję utlenionych produktów na powierzchni nośników, przy czym jej nasilenie zależało od rodzaju matrycy: G>Z>A. Połączenie powyższych informacji pozwala wyciągnąć wniosek, że utrata obserwowanej reaktywności w znacznym stopniu była spowodowana ograniczoną dostępnością substratu do enzymu, wynikającą z sorpcji produktów na granicy faz ciecz/ciało stałe. Wykonane zdjęcia mikroskopowe w pełni potwierdziły wizualne obserwacje.

Dodanie do mieszanin reakcyjnych 10% 2-propanolu miało dodatkowo ograniczyć sorpcję produktów. Takie zjawisko zaobserwowano wyłącznie w układzie z nośnikiem A. Można zatem, dobierając matrycę do immobilizacji oraz przez dodanie odpowiedniego ko-rozpuszczalnika, zwiększyć stabilność operacyjną lakazy, jednocześnie ograniczając wytrącanie się produktów na granicy faz ciecz-ciało stałe.

LITERATURA

- Bryjak J., Rekuć A., 2010. Effective purification of *Cerrena unicolor* laccase using microfiltration, ultrafiltration and acetone precipitation. *Appl. Biochem. Biotech.*, **16**, 2219-2235. DOI: 10.1007/s12010-009-879-9
- Cao Z., Nandhikonda P., Penuela A., Nance S., Heagy M.D., 2010. N-aryl arenedicarboximides as tunable panchromatic dyes for molecular solar cells. *Int. J. Photoenergy*, **2010**, art. ID 264643. DOI: 10.1155/2010/264643
- Manda K., Hammer E., Mikolasch A., Gordes D., Thurow K., Schauer F., 2006. Laccase-induced derivatization of unprotected amino acid L-tryptophan by coupling with p-hydroquinone 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide. *Amino Acids* **31**, 409-419. DOI: 10.1007/s00726-005-0276-8
- Riva S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TIBTECH* **24**, 219-226. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.03.006
- Strong P.J., Claus H., 2011. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech.*, **41**, 373-434. DOI: 10.1080/10643380902945706
- Zahra A.A.T.A., 2011. Synthesis, characterization and spectroscopic properties of new azo-dyes and azo-metal complexes derived from 8-hydroxyquinoline. *Basrah J. Sci.*, **29**, nr 1C, 15-36
- Zynek K., Bryjak J., Szymańska K., Jarzębski A.B., 2011. Screening of porous and cellular materials for covalent immobilisation of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Biotech. Bioproc. Eng.*, **16**, 180-189. DOI: 10.1007/s12257-010-0011-5
- Badania były finansowane z projektu N N209 119337 (2009-2012)**