

JOLANTA BRYJAK
TOMASZ KOŹLECKI

Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

Stabilność lakazy w obecności cieczy jonowych

Wstęp

Ciecze jonowe są zwykle definiowane jako związki złożone wyłącznie z jonów i które są w stanie ciekłym w temperaturach poniżej temperatury wrzenia wody. Gwałtownie rosnące zainteresowanie tymi związkami, określanymi jako zaawansowane zielone rozpuszczalniki przyszłości [1], wynika przede wszystkim z bardzo małej prężności par, niepalności, dużej stabilności termicznej i elektrochemicznej oraz zdolności do rozpuszczania szerokiej gamy związków organicznych i nieorganicznych, nierozpuszczalnych w wodzie. Szczególnie atrakcyjna jest możliwość sterowania właściwościami fizykochemicznymi cieczy jonowych poprzez dobór budowy kationu i anionu, co nadaje im nazwę *projektowane rozpuszczalniki*, a liczbę możliwych kombinacji kation-anion szacuje się na 10^{18} .

Pierwsze doniesienia, dotyczące zastosowania cieczy jonowych w biokatalizie, pojawiły się w 2000 roku [1]. Rosnące zainteresowanie aktywnością i stabilnością enzymów w obecności cieczy jonowych, jako rozpuszczalników lub współrozpuszczalników, zostało podsumowane w pracach przeglądowych [1, 2]. Większość badań dotyczy lipaz, podczas gdy dane o stabilności proteaz i peroksydaz są nieliczne. Natomiast sporadycznie badania dotyczą lakaz [3], mimo że ich substraty są słabo rozpuszczalne w wodzie. Lakazy należą do oksydoreduktaz o szerokiej specyficzności substratowej, prowadzące biotransformacje związków fenolowych o dużym potencjalnym znaczeniu w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym i spożywczym. Niska rozpuszczalność substratów w wodzie wymusza stosowanie współrozpuszczalników organicznych, co zwykle wywołuje szybką inaktywację enzymu. Celem niniejszej pracy jest zbadanie stabilności lakazy w obecności trzech wybranych imidazoliowych cieczy jonowych o różnym stężeniu i oszacowanie możliwości ich wykorzystania w biotransformacjach związków fenolowych.

Materiały i metody

Tetrafluoroboran 1-butylo-3-metyloimidazoliowy [bmim][BF₄] zakupiono we *Fluka*. Bromek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy [bmim][Br] i bromek 1-dodecylo-3-metyloimidazoliowy [C₁₂mim][Br] otrzymano przez ogrzewanie we wrzącym izopropanolu równomolowych ilości odpowiedniego bromku alkilowego i metyloimidazolu. Po 48–72 h odparowano rozpuszczalnik, pozostałość rozpuszczano w acetonie i dodawano n-heksan do wydzielenia warstwy cieczy jonowej. Po dekantacji rozpuszczalnika, czynność powtórzono czterokrotnie, a następnie odparowano rozpuszczalniki; pozostałość suszono przez 48 h pod zmniejszonym ciśnieniem (2hPa/55°C). Czystość otrzymanych cieczy jonowych potwierdzono metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H i ¹³C NMR (roztwory w D₂O).

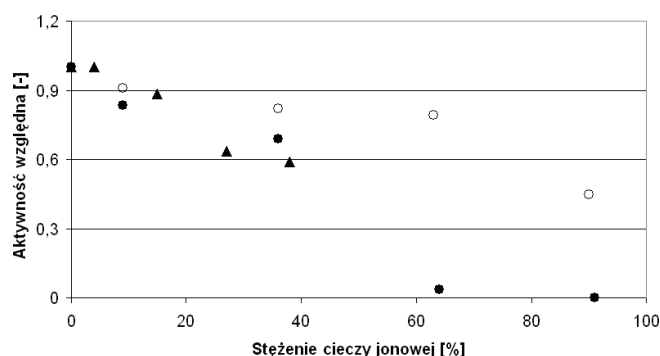
Do badań wykorzystano lakazę otrzymywaną ze szczepu *Cerreia unicolor* (Bull.ex.Fr.) Murr, No 139, z kolekcji kultur Wydziału Biochemii Uniwersytetu Lubelskiego. Skład pożywki i metody izolacji enzymu opisano uprzednio [4]. Aktywność lakazy oznaczano kinetycznie w 30°C, stosując syringaldazyne, jako substrat. Celem zbadania wpływu stężenia cieczy jonowych na aktywność i stabilność lakazy, zbuforowane (pH 5,2) roztwory cieczy jonowych o stężeniach od 5 do 91%, preinkubowano w 30°C, po czym dodawano roztwór enzymu, intensywnie mieszano i wykonywano pomiar aktywności. W badaniach stabilności, próbki pobierano w różnych interwałach czasowych i oznaczano aktywność. Parametry kinetyczne reakcji inaktywacji wyznaczono metodą regresji nieliniowej (*OriginPro 7.5*).

Wyniki i ich omówienie

W badaniach zastosowano trzy ciecze jonowe, [bmim][Br], [C₁₂mim][Br] oraz [bmim][BF₄], które wstępnie zrównoważono buforem do pH 5,2, a następnie zbadano wpływ różnych stężeń cieczy jonowych na aktywność lakazy (Rys. 1).

Wykazano, że [bmim][Br], w stężeniach powyżej 60%, powoduje całkowitą utratę aktywności enzymu, natomiast w przypadku [C₁₂mim][Br], ograniczeniem w doborze stężenia cieczy jonowej była zbyt duża lepkość roztworu. Można zatem stwierdzić, że w przypadku obu hydrofilowych cieczy jonowych, dynamika spadku aktywności lakazy ze wzrostem stężenia cieczy do 40% była zbliżona. W badaniach wykorzystano również hydrofobowy preparat handlowy [bmim][BF₄], który pozwalał zachować istotnie wyższe aktywności w roztworach o stężeniach 63 i 90%, co może być wynikiem faktu ograniczonej mieszalności cieczy jonowej z wodą oraz tworzeniem emulsji w obecności białka.

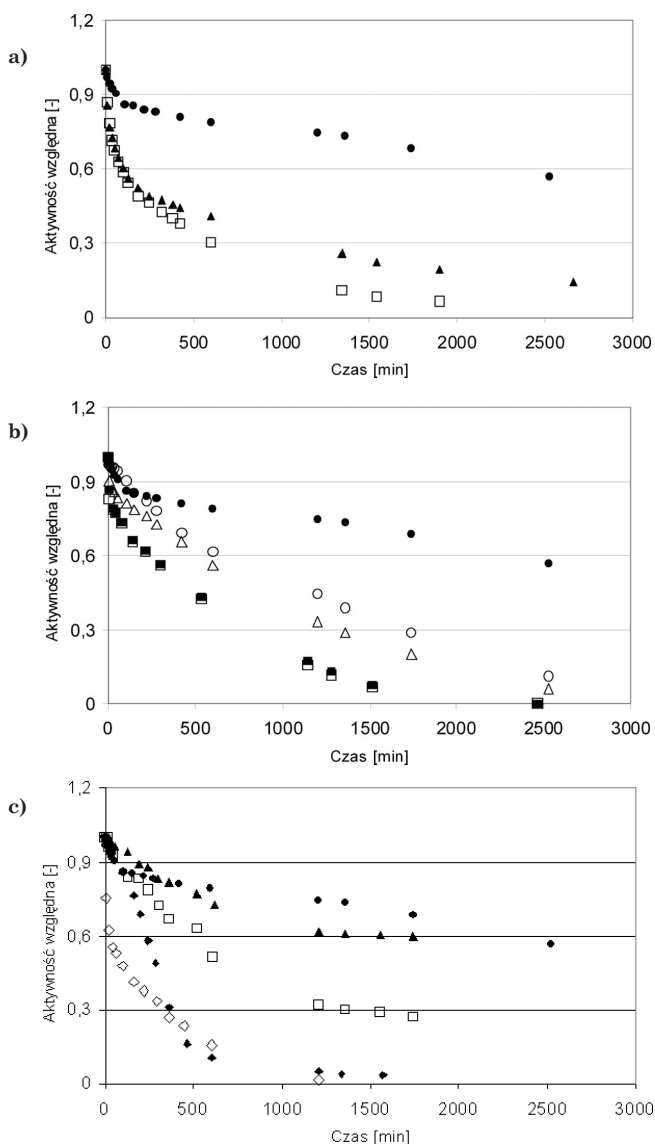
Dynamikę spadku aktywności enzymatycznej w czasie 2 dni zbadano dla kilku wybranych stężeń cieczy jonowych (Rys. 2). Otrzymane wyniki ponownie wskazały na niską stabilność lakazy w bardziej hydrofilowej cieczy jonowej [bmim][Br], w której już przy stężeniu 9% inaktywacja była zbliżona do obserwowanej dla stężenia 37%. Zastosowanie



Rys. 1. Wpływ stężenia [bmim][Br] (●), [C₁₂mim][Br] (▲) oraz [bmim][BF₄] (○) na aktywność początkową lakazy

cieczy bardziej hydrofobowej – $[C_{12}mim][Br]$ – ograniczyło szybkość inaktywacji w obecności niższych stężeń cieczy, jakkolwiek ewidentnym wskazaniem do stosowania cieczy jonowej w biotransformacjach z lakazą, jest wykorzystanie hydrofobowej cieczy jonowej $[bmim][BF_4]$. Ciecz ta tworzy z wodą układy dwufazowe, przechodzące w emulsje po dodaniu białka enzymatycznego.

Analiza wyników, przedstawionych na rys. 2, wykazała, że dynamika zmian aktywności lakazy jest jakościowo różna dla 3 różnych cieczy jonowych. Celem weryfikacji tej hipotezy, wyznaczono parametry reakcji inaktywacji enzymu. W doborze modelu kierowano się informacją, że lakaza z *C. unicolor* jest produkowana w formie izoenzymów, różniących się m.in. stabilnością termiczną (forma labilna i stabilna) [5]. Zatem, założono



Rys. 2. Wpływ stężenia $[bmim][Br]$ (a), $[C_{12}mim][Br]$ (b) oraz $[bmim][BF_4]$ (c) na stabilność lakazy w 30°C. Stężenia cieczy jonowych: (●) – 0%; (○) – 4%; (▲) – 9%; (△) – 15%; (■) – 27%; (□) – 37%; (◆) – 63%; (◇) – 90%

Tablica 1
Wartości parametrów reakcji inaktywacji lakazy w obecności cieczy jonowych o różnych stężeniach

Ciecz jonowa	Stężenie cieczy jonowej, [%]	A, [-]	k_1 , [1/min]	k_2 , [1/min]
enzym natywny	0	0,290±0,009	0,0943±0,0189	0,00014±0,00002
$[bmim][Br]$	9	0,411±0,013	0,0296±0,0028	0,00060±0,00004
	36	0,355±0,009	0,0371±0,0025	0,00128±0,00004
$[C_{12}mim][Br]$	4	0,045±0,017	0,0231±0,0231	0,00070±0,00003
	15	0,106±0,010	0,1990±0,1526	0,00083±0,00003
	27	0,174±0,012	0,1796±0,0633	0,00136±0,00006
	38	0,175±0,012	0,4023±0,3195	0,00142±0,00006
$[bmim][BF_4]$	9	0,451±0,009	0,0014±0,0001	10^{-7}
	36	0,813±0,022	0,0014±0,0001	10^{-7}
	63	1,012±0,053	0,0025±0,0003	10^{-7}
	90	0,382±0,011	0,1311±0,0152	0,00227±0,00009

model, w którym każda z izoform ulega nieodwracalnej inaktywacji zgodnie z kinetyką reakcji I-rzędu. W tym przypadku, obok 2 stałych szybkości inaktywacji k_1 i k_2 , należy wyznaczyć udział formy labilnej w puli enzymu (A). Wartości stałych wyznaczono metodą regresji nieliniowej z równania (1)

$$a_t = a_0 [A \exp(-k_1 t) + (1 - A) \exp(-k_2 t)] \quad (1)$$

gdzie:

- a – aktywność początkowa (a_0) lub w czasie t (a_t);
- k – stała szybkości inaktywacji formy labilnej (k_1) i stabilnej (k_2);

i zamieszczono w tablicy 1.

Analiza danych potwierdziła zróżnicowany wpływ zastosowanych cieczy jonowych na szybkość inaktywacji lakazy. Stosując $[bmim][Br]$, obserwuje się zwiększenie udziału frakcji labilnej enzymu, przy zmniejszonej stałej szybkości inaktywacji tej frakcji, a przede wszystkim wyraźny wpływ tej cieczy jonowej na wzrost szybkości inaktywacji frakcji stabilnej, decydującej o stabilności enzymu w procesach długoterminowych. Dodatek bardziej hydrofobowej cieczy – $[C_{12}mim][Br]$ – przede wszystkim powoduje duży spadek zawartości frakcji labilnej i jej szybszą inaktywację, przy niewielkim wpływie na szybkość inaktywacji frakcji stabilnej. Natomiast obliczenia dla silnie hydrofobowej cieczy jonowej, niemieszającej się z wodą – $[bmim][BF_4]$ – dały zaskakujące wyniki. Do stężenia 63% obserwuje się duży wzrost frakcji labilnej, przy niewielkich zmianach w szybkości inaktywacji tej frakcji oraz frakcję stabilną z praktycznie stałą i bardzo niską szybkością inaktywacji. Jedynie stężenie 90% pozwalało uzyskać typową dla lakazy dynamikę spadku aktywności.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że lakaza jest enzymem dobrze tolerującym kontakt z hydrofobową cieczą jonową $[bmim][BF_4]$ i że do około 10% zawartości tej cieczy w roztworze nie powinno się obserwować zwiększonego spadku aktywności enzymu.

LITERATURA

1. F. van Rantwijk, R.A. Sheldon: Chem. Rev. **107**, 2757 (2007).
2. Z. Yang, W. Pan: Enzyme Microb. Technol. **37**, 19 (2005).
3. A.P.M. Tavares, O. Rodriguez, E.A. Macedo: Biotechnol. Bioeng. **101**, 201 (2008).
4. A.J.H. Al-Adhami, J. Bryjak, B. Greb-Markiewicz, W. Peczyńska-Czoch: Process Biochem. **37**, 1387 (2002).
5. A. Michniewicz, R. Ulrich, S. Ledakowicz, M. Hofrichter: Appl. Microbiol. Biotechnol. **69**, 682 (2006).