

JOANNA KMIECIK
MAREK WÓJCIK

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich, Bydgoszcz

Immobilizacja lipazy metodą zol-żel

Wstęp

Lipazy (EC 3.1.1.3) należą do najszerzej stosowanych w biotechnologii enzymów. Katalizują one bardzo wiele reakcji [1]. Oprócz typowych, jak enancjoselektywna hydroliza, estryfikacja i transestryfikacja, przyspieszają także reakcje laktonizacji, polimeryzacji (polimery optycznie czynne), syntezy amidów i peptydów, a nawet – wydawać by się mogło – nietypowe dla nich reakcje utlenienia (synteza peroksy kwasów w układach dwufazowych) [2]. Istnieją pewne ograniczenia stosowania enzymów w ich naturalnej (natywnej) formie. Większość z nich udaje się pokonać poprzez zastąpienie form natywnych preparatami immobilizowanymi. Spośród wielu opracowanych do tej pory metod immobilizacji w ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się tzw. procesowi zol-żel. Jest to metoda zamykania enzymu wewnątrz trójwymiarowej sieci tlenku metalu, głównie krzemu, otrzymywanej na drodze żelowania mieszaniny reakcyjnej, zawierającej roztwór danego enzymu. Jako związki wyjściowe najczęściej stosowane są alkilowe pochodne kwasu monokrzemowego $\text{Si}(\text{OH})_4$ – akloksysilany, o ogólnym wzorze $\text{Si}(\text{OR})_4$, w których R oznacza grupę alkilową. Tworzenie żelu jest następstwem hydrolizy alkoksylanów, prowadzącej do utworzenia silanoli ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$), które następnie kondensują między sobą lub z alkoksylanami, dając siloksany ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) [3].

Tradycyjnie proces ten przeprowadza się w bloku, który następnie poddawany jest suszeniu i rozdrabnianiu. Z uwagi na niewielkie wymiary otrzymywanych cząstek biokatalizatora ($\sim 0,1-0,4\text{mm}$) oddzielenie go od produktów reakcji i wielokrotne użycie przysparza szereg problemów. Celem niniejszej pracy było ich rozwiązanie poprzez zastosowanie magnetytu jako dodatku, umożliwiającego łatwą i skuteczną separację, przy użyciu pola magnetycznego (prostego magnesu).

Materiały i odczynniki

Do otrzymywania immobilizowanego biokatalizatora stosowano następujące materiały:

- lipazę z *Candida rugosa* (Typ VII, numer produktu L1754, *Sigma-Aldrich*);
- tetrametoksylan (TMOS, *Fluka*), będący prekursorem alkoksylanowym w metodzie zol-żel;
- poli(alkohol winylowy), (PVA, *Fluka*), używany jako stabilizator;
- fluorek sodu (NaF, *Zakłady Azotowe Tarnów*), stanowiący katalizator;
- magnetyt (Fe_3O_4 w postaci proszku o rozmiarach ziaren $< 5\ \mu\text{m}$, *Sigma-Aldrich*);

W oznaczeniach aktywności biokatalizatora stosowano octan p-nitrofenylu (pNPA, *Sigma-Aldrich*). Krzywą wzorcową sporządzono dla produktu reakcji p-nitrofenolu (pNP),

który także pochodził z firmy *Sigma-Aldrich*. Rozpuszczalnikiem do pNPA i pNP był 96% etanol czysty z *POCH S.A.*

Metody

Immobilizacja

Znaczące jest zastosowanie komercyjnego magnetytu, którego właściwości magnetyczne umożliwiają prostą separację biokatalizatora od roztworu oraz jego wielokrotne użycie. Lipazę zazwyczaj immobilizuje się z użyciem 1M roztworu NaF, a proces żelowania trwa od 15 do 120 s [4–6]. Przeprowadzone wcześniej badania [7] z mniejszymi stężeniami fluorku sodu pozwalają stwierdzić, że czas żelowania ulega wydłużeniu bez znaczącego wpływu na aktywność, co pozwala na łatwiejsze operowanie mieszaniną reakcyjną. Zastosowano więc NaF o stężeniu 0,01 M. Przygotowano roztwór lipazy (40 mg/ml) w 0,02 M buforze fosforanowym o pH = 7, po czym zawieszono w nim magnetyt. Do naczynia reakcyjnego wprowadzono 7,5 ml tej mieszaniny, dodano 1,5 ml 4% roztworu PVA oraz 0,75 ml roztworu NaF. Mieszanina poddana została homogenizacji przez 15s po czym dodano TMOS w ilości: I seria – 6,5 ml, II seria – 8 ml i dalej homogenizowano. Następnie całość przeniesiono do plastikowych pojemników. Pojemniki zamknięto i umieszczono w temp. 4°C na czas dojrzewania żelu – 24 h, a następnie otworzono i pozostawiono żele w tych samych warunkach do wysuszenia – kolejne 7–10 dni. Gotowe bloki kserożeli rozdrobniono w porcelanowym moździerzu i poddano separacji metodą analizy sitowej. Frakcję o wymiarach 0,1–0,325 mm poddano badaniom aktywności.

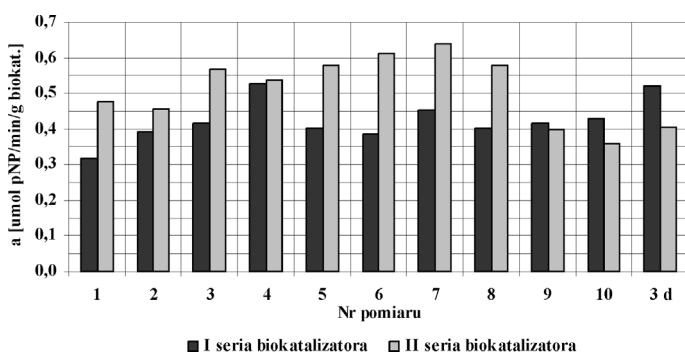
Badania aktywności biokatalizatora

Określeniu aktywności lipazy posłużyła reakcja enzymatycznej hydrolizy pNPA do pNP [1, 8]. Odpowiednią naważkę biokatalizatora wprowadzano do naczynia reakcyjnego, zawierającego 0,02 M bufor fosforanowy o pH = 7, które następnie umieszczano na mieszadle magnetycznym i termostatowano w temp. 37°C. Gdy mieszanina osiągnęła pożądaną temperaturę dodawano 40 μl etanolowego roztworu pNPA. Reakcja trwała 10 min, po czym natychmiast odseparowywano biokatalizator od roztworu za pomocą prostego przyrządu własnego pomysłu, skonstruowanego przy zastosowaniu magnesu. Aktywność lipazy określano poprzez pomiar absorbancji roztworu preakcyjnego przy długości fali $\lambda = 400\ \text{nm}$, korzystając ze spektrofotometru UV-VIS (*Jasco V-530*) oraz programu *Spectra Manager*.

Wyniki i ich omówienie

Aktywność wyrażona została w μmol produktu, tworzono go przez 1 g biokatalizatora w czasie 1 minuty ($\mu\text{mol pNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{biokat.}}$). Oprócz stężenia produktu pNP w roztworze preakcyjnym, obliczane przez program *Spectra Manager*,

uwzględniono zatem także rzeczywiste naważki biokatalizatora i czas trwania reakcji. Sprawdzono dokładność metody oznaczania aktywności poprzez pomiar absorbancji 4 próbek tego samego biokatalizatora. Błędy pomiaru były nie większe niż $\pm 3,5\%$ wartości rzeczywistej. Zbadano możliwość jego wielokrotnego użycia – po zakończeniu reakcji odseparowywano go magnetycznie od roztworu i umieszczano w świeżej porcji buforu. Czynność powtarzano 10 razy, po czym pozostawiono użyty biokatalizator na 3 doby w temp. 4°C i ponownie zmierzono jego aktywność. Wyniki przedstawiono na rys. 1. Oznaczenia są następujące: nr pomiaru 1–10 oznacza kolejny pomiar, natomiast 3d – pomiar wykonany na tych samych naważkach biokatalizatora po 3 dobach przechowywania ich w temp. 4°C .

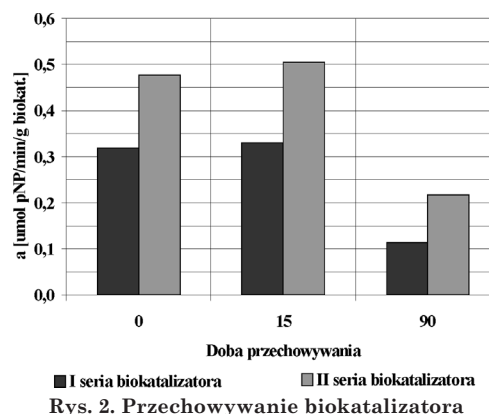


Rys. 1. Wyniki pomiarów aktywności biokatalizatora

Określono także wydajność immobilizacji jako procent aktywności biokatalizatora w odniesieniu do aktywności lipazy natywnej, przy czym ilość enzymu była równa jego zawartości w biokatalizatorze, a do porównania wzięto średnią wartość z 10 kolejnych pomiarów aktywności. Zbadano ponadto możliwość długotrwałego przechowywania biokatalizatora (Rys. 2).

Przygotowano dwie serie biokatalizatora, różniące się ilością TMOS użytego podczas immobilizacji. Oznacza to, że jednakowe naważki tych biokatalizatorów mają inną zawartość lipazy i nie można ich bezpośrednio ze sobą porównywać.

Badania obu serii wykazały, że biokatalizator w kolejnych pomiarach zachowuje swoją aktywność i można go używać wielokrotnie. Początkowy wzrost aktywności można tłumaczyć procesem stopniowego zwilżania biokatalizatora, czyli etapem w którym substrat nie dociera jeszcze do wszystkich cząsteczek lipazy w sieci żelu. Wahania wartości w dalszych pomiarach najprawdopodobniej wynikają z najwolniejszego etapu procesu, jakim jest dyfuzja, zależna w dużej mierze od mieszania układu, które jest utrudnione z uwagi na magne-



Rys. 2. Przechowywanie biokatalizatora

tyczne właściwości biokatalizatora. Badanie wykazało ponadto, że ten sam biokatalizator zachowuje swą aktywność po 3 dobach przechowywania w temp. 4°C . Wydajność immobilizacji dla I serii biokatalizatora wyniosła $36,2\%$, dla II zaś $48,0\%$.

Wyniki pomiarów aktywności świadczą, że w ciągu pierwszych 15 dób przechowywania biokatalizatorów w temp. 4°C (Rys. 2) aktywność praktycznie nie ulega zmianie. Dopiero pomiar po 90 dobach wskazuje na stopniowy spadek aktywności, wynoszący dla serii I i II odpowiednio $35,7$ i $45,5\%$ względem ich aktywności początkowej.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że immobilizacja lipazy z *Candida rugosa* metodą zol-żel, przy zastosowaniu dodatku magneytu, pozwala uzyskać biokatalizator, który można łatwo i szybko oddzielić od roztworu reakcyjnego. Jego aktywność w przypadku wielokrotnego użycia zostaje zachowana. Ponadto można go długotrwale przechowywać, jednakże wówczas aktywność ulega stopniowej utracie.

LITERATURA

1. A. Salis i inni: Biocatal. and Biotrans. **23**, 381 (2005).
2. E. Haliniarz, B. Lejczak: Wiadom. Chem. **50**, 193 (1996).
3. N.N. Khimich: Glass Physics and Chemistry **30**, nr 5, 430 (2004).
4. M.T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp: Biotechnol. Bioeng. **49**, 527 (1996).
5. C.M.F. Soares i inni: J. Mol. Catal. B: Enzym. **29**, 69 (2004).
6. H. Noureddini, X. Gao: J. Sol-Gel Sci. Tech. **41**, 31 (2007).
7. J. Kmieciak: Immobilizacja lipazy metodą zol-żel. Praca magisterska wykonana w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Bioprosesowej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego, Bydgoszcz, 2007.
8. P. Hara, U. Hanefeld, L. T. Kanerva: J. Mol. Catal. B: Enzym. **50**, 80 (2008).