

AGNIESZKA RADUCKA
JOANNA KARCZ

Instytut Inżynierii Chemicznej i Procesów Ochrony Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Szczecin

Ocena wydajności immobilizacji inwertazy wiązanej kowalencyjnie na różnych nośnikach

Wprowadzenie

Inwertaza jako enzym katalizujący reakcje hydrolizy sacharozy do glukozy i fruktozy jest często stosowana w przemyśle spożywczym, zwłaszcza przy produkcji słodzików używanych w browarnictwie, produkcji napojów, dżemów, kremów i jako sztuczny miód [1].

Do prowadzenia procesów przemysłowych coraz częściej wykorzystuje się biokatalizatory będące unieruchomionymi enzymami, gdyż ich zastosowanie pozwala na obniżenie kosztów operacyjnych, wyższą wydajność reakcji, wielokrotność użycia, uniknięcie strat czasu w wyniku usuwania biokatalizatora z mieszaniny reakcyjnej. Ponadto immobilizowany preparat może być bardziej stabilny w środowisku reakcji, a także utrzymuje wysoką aktywność katalityczną. Znanych jest wiele procedur unieruchamiania enzymów, wśród których bogatą grupę stanowią techniki kowalencyjnego wiązania z nośnikiem [1].

Wiązanie kowalencyjne polega na wiązaniu wolnych grup funkcyjnych aminokwasów występujących w enzymie z aktywnymi grupami powierzchni nośnika. W tej metodzie należy wykorzystywać te grupy funkcyjne białka, które nie biorą udziału w katalizie i wiązaniu substratu, ale łatwo ulegają modyfikacji chemicznej. Materiał służący jako „rusztowanie” do wiązania enzymu powinien spełniać pewne wymagania. Zarówno natura fizyczna, jak i właściwości chemiczne nośnika istotnie wpływają na jakość preparatu. Często stosuje się substancje aktywujące powierzchnię nośnika w celu wprowadzenia pożądanych grup funkcyjnych, a także łączniki przestrzenne, które mają za zadanie zapewnić wymaganą „ruchliwość” związanego enzymu umożliwiającą zmianę konformacji podczas zajścia aktu katalitycznego [2].

O jakości powstającego preparatu unieruchomionego enzymu decydują takie parametry, jak ilość związanego enzymu, aktywność enzymu po immobilizacji, stabilność przechowywania i stabilność operacyjna. Immobilizacja enzymów w większości przypadków prowadzi do pogorszenia parametrów kinetycznych, ale jednocześnie podwyższa odporność na zmiany temperatury i wartości pH [3].

Celem tej pracy jest ocena wydajności immobilizacji inwertazy wiązanej kowalencyjnie na różnych nośnikach, przeprowadzona na podstawie dostępnych danych literaturowych.

Analiza ilości związanej inwertazy na nośnikach różnego typu

Materiały stosowane jako matryce do wiązania kowalencyjnego inwertazy mogą być zarówno pochodzenia nieorganicznego, jak i organicznego. Można wśród nich wyróżnić tworzywa mineralne (m.in. szkło [4], pumeks [4], gliny [5], korund

[6]), organiczne pochodzenia roślinnego (np. celuloza [7] czy alginian i chityna [8]), jak również polimerowe (zmodyfikowana polianilina [9], granulowana poliamina [10], hydrożele [11], alkohol poliwinylowy [12] oraz pochodne polimetakrylanu [11]). W wyniku immobilizacji z wykorzystaniem różnych aktywatorów i łączników przestrzennych można uzyskać większą lub mniejszą wydajność wiązania. Istotnym parametrem jest ilość unieruchomionego enzymu w jednostce masy nośnika, gdyż decyduje ona na przykład o tym, jaką wielkość będzie miało wypełnienie w reaktorze kolumnowym, lub jaka będzie masa substancji rozproszonej w reaktorze zbiornikowym z mieszaniem. W tabelicy 1 zestawiono rodzaje nośników stosowanych przez różnych badaczy [1, 4, 5–7, 9–12, 14, 15] do kowalencyjnego wiązania inwertazy EC 3.2.1.26.

Tabela 1
Rodzaje nośników stosowanych do kowalencyjnego wiązania inwertazy EC 3.2.1.26

Nośnik	Rodzaj nośnika	Źródło
N1	piasek szklarski	<i>Ginalska</i> i wsp. [4]
N2	skopolimeryzowana polianilina	<i>Chen</i> i wsp. [9]
N3	pumeks	<i>Ginalska</i> i wsp. [4]
N4	nylon-6	<i>Amaya-Delgado</i> i wsp. [14]
N5	mezostrukturalne komórkowe gąbki	<i>Szymańska</i> i wsp. [15]
N6	mikrokulki alkoholu poliwinylowego	<i>Akgöl</i> i wsp. [12]
N7	żele krzemionkowe	<i>Szymańska</i> i wsp. [15]
N8	montmorylonit	<i>Sanjay</i> i <i>Sugunan</i> [5]
N9	poli(2-hydroksylo-metakrylan)	<i>Altinok</i> i i wsp. [11]
N10	szkło porowate	<i>Ginalska</i> i wsp. [4]
N11	granulowany dimer poliamidu	<i>Tümtürk</i> i wsp. [10]
N12	polimerowe nośniki/hydrożele	<i>Altinok</i> i wsp. [11], <i>Tümtürk</i> i wsp. [10]
N13	porowaty korund	<i>Geankoplis</i> i wsp. [6]
N14	DEAE-celuloza	<i>Abdellah</i> i wsp. [7]
N15	chemicznie modyfikowany silikażel (GA-N-CSMG)	<i>David</i> i wsp. [1]

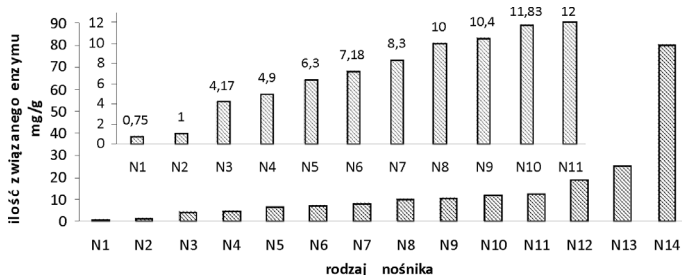
Na podstawie tych danych literaturowych określono, ile mg enzymu (inwertazy) wiąże się w 1 gramie danego nośnika. Wielkość tę przyjęto jako miarę wydajności immobilizacji. Wyniki dla kolejnych czternastu nośników (od N1 do N14) z tabelicy 1 zostały przedstawione na rys. 1. Spośród porównywanych na rys. 1 nośników najmniej wydajny jest nośnik N1

Tablica 2

Aktywność właściwa unieruchomionej inwertazy na nośnikach z różną ilością związanego enzymu

Lp.	Nośnik	Ilość związanej inwertazy mg _{enzymu} /g nośnika	Aktywność właściwa U/mg _{enzymu}	Aktywność na jednostkę masy nośnika U/g nośnika	Warunki oznaczenia t[°C]/ C _S [M]/ pH	Źródło
1.	Modyfikowany silikażel GA-N-CSMG (N15)	723	340,2	246 000	45/ 0,146/ 4,5	David i wsp. [1]
2.	DEAE-celuloza (N14)	80	83,3	6 664	37/0,17 / 4,5	Abdellah i wsp. [7]
3.	Nylon-6 (N4)	4,95	1200	5 940	50/ 0,3/ 5,0	Amaya-Delgado i wsp. [14]

(piasek szklarski, 0,75 mg_{enzymu}/g nośnika), a najbardziej – N14 (DEAE-celuloza, 80 mg_{enzymu}/g nośnika). Jednak największa wydajność cechuje nośnik N15, dla którego ilość związanej inwertazy wynosi aż 723 mg_{enzymu}/g nośnika. Ze względu na bardzo dużą rozpiętość wyników charakteryzujących nośniki N1 oraz N15, dane dla tego ostatniego nośnika nie zostały zamieszczone na rys. 1.



Rys. 1. Ilość związanej inwertazy w zależności od rodzaju użytego nośnika

Oprócz wydajności immobilizacji należy brać pod uwagę również aktywność właściwą immobilizowanego preparatu, określaną w międzynarodowych jednostkach aktywności enzymu U, odniesionych do jednostki masy enzymu. Jednostkę U definiuje się jako taką ilość enzymu, która katalizuje przemianę jednego mikromola substratu w ciągu 1 minuty. Oszacowane przez różnych badaczy [1, 7, 14] wartości aktywności właściwej unieruchomionej inwertazy dla przypadków, w których z nośnikiem wiąże się najwięcej enzymu (nośniki N15 oraz N14), lub stosunkowo mało (nośnik N4), zostały przedstawione w tablicy 2. Dodatkowo podano warunki oznaczenia, gdyż mają one istotny wpływ na aktywność właściwą. Powinno się ją oznaczać w temperaturze 30°C i optymalnych warunkach prowadzenia procesu (m.in. pH oraz stężenia substratu) [16]. Z porównania podanych w tablicy 2 wartości aktywności właściwej unieruchomionej inwertazy na różnych nośnikach wynika, że duże wartości tej aktywności odpowiadają dużym ilościom związanej inwertazy na nośniku (dane dla N15 oraz N14). Wyjątek stanowią dane otrzymane dla nośnika N4, gdzie aktywność właściwa wyrażona w U/mg enzymu jest bardzo duża, biorąc pod uwagę małą ilość związanej inwertazy w przeliczeniu na gram nośnika.

Podsumowanie

Z przeprowadzonej na podstawie danych literaturowych oceny wydajności immobilizacji inwertazy związanej kowalen-

cyjnie na różnych nośnikach wynika, że na wyróżnienie zasługuje modyfikowany chemicznie silikażel [1], gdyż, jak wskazują dane zamieszczone w tablicy 1, w 1 gramie tego nośnika wiąże się 723 mg inwertazy. Jest to wielkość od kilku do nawet kilkaset razy większa niż w przypadku pozostałych nośników. Stosunkowo dobre wyniki można też osiągnąć dla DEAE-celulozy [7], ponieważ ilość związanego enzymu średnio wynosi 80 mg/g DEAE-celulozy. Natomiast w większości przypadków na matrycy wiąże się kilkanaście, a nawet tylko kilka mg enzymu w 1 gramie nośnika. Jednak oprócz ilości związanego enzymu ważna jest także jego aktywność. Na przykład, w przypadku stosunkowo małej ilości inwertazy unieruchomionej na nylonie-6, jej aktywność właściwa jest jednak bardzo duża w stosunku do porównywanych nośników (wynosi 1200 U/mg_{enzymu}). Na ten wynik mają niewątpliwie wpływ warunki oznaczenia, a szczególnie stężenie C_S sacharozy, które było prawie dwukrotnie większe w porównaniu z wartościami stężenia C_S przyjętymi w przypadku nośników N15 oraz N14.

LITERATURA

1. A. E. David, N. S. Wang, V. C. Yang, A. J. Yang: J. Biotechnol., **125**, 395 (2006).
2. L. Cao: Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Application and Design, Weinheim, Wiley-VCH, 2005.
3. Elementy enzymologii, pod red. J. Witwickiego i W. Ardelta, Warszawa, PWN, 1984.
4. G. Ginalska, A. Belcarz, J. Łobarzewski, T. Wolski: Biotechnologia, **1**, nr 44, 226 (1999).
5. G. Sanjay, S. Sugunan: Catal. Commun. **7**, 1005 (2006).
6. C.J. Geankoplis, E. R. Haering, M. C. Hu: Ind. Eng. Chem. Res. **26**, 1810 (1987).
7. H.A. Abdellah, T.H.A. Baker, L.A. Shekib, S.M. El-Iraqi: Food Chem. **43**, nr 5, 369 (1992).
8. L. Gómez, H.L. Ramírez, M.L. Villalonga, J. Hernández, R. Villalonga: Enzym. Microb. Technol. **38**, 22 (2006).
9. Y. Chen, E.T. Kang, K.G. Neoh, K.L. Tan: Eur. Polym. J. **36**, 2095 (2000).
10. H. Tümtürk, F. Arslan, A. Disli, Y. Tufan: Food Chem. **69**, 5 (2000).
11. H. Altınok, S. Aksoy, H. Tümtürk, N. Hasirci: Russ Chem B+, International Edition, **55**, nr 10, 1860 (2006).
12. S. Akgöl, Y. Kaçar, A. Denizli, M. Y. Arýca: Food Chem. **74**, 281 (2001).
13. M.Y. Arýca, G. Bayramođlu: J. Mol. Catal. B: Enzym. **38**, 131 (2006).
14. L. Amaya-Delgado, M.E. Hidalgo-Lara, M.C. Montes-Horcasitas: Food Chem. **99**, 299 (2006).
15. K. Szymańska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Białoń, A. B. Jarzębski: Micropor. Mesopor. Mat. **99**, 167 (2007).
16. A. Zgirski, R. Gondko: Obliczenia biochemiczne, Warszawa, PWN, 1998.