

AGNIESZKA RADUCKA

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Szczecin

TADEUSZ OGOŃSKI

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Szczecin

Analiza możliwości wielokrotnego zastosowania matrycy wykonanej z pumeksu do kowalencyjnego wiązania inwertazy EC 3.2.1.26

Wprowadzenie

Enzymatyczna hydroliza sacharozy z użyciem inwertazy (β -D-fruktofuranazy, EC 3.2.1.26) stanowi konkurencję dla stosowanej w przemyśle kwaśnej hydrolizy tego dwucukru, m.in. dlatego, że zapobiega powstawaniu barwnych produktów ubocznych (furfural) [1]. W celu poprawienia stabilności operacyjnej w zadanych warunkach pH i temperatury oraz uniknięcia zanieczyszczenia produktu biokatalizatorem stosuje się enzymy osadzone na nośnikach. Nośnik spełnia rolę rusztowania, jednak często zmienia właściwości enzymu [2]. Aby osiągnąć wysoką wydajność wiązania zarówno nośnik jak i enzym należy poddać modyfikacji chemicznej. O wartości biokatalizatora decydują więc nie tylko właściwości enzymu, ale również cechy fizykochemiczne nośnika, jego dostępność, koszt, nietoksyczność i zdolność do regeneracji [3]. Inwertazę można związać kowalencyjnie z pumeksem [4, 5]. Pumeks jest występującym w przyrodzie minerałem krzemianowym o wysokiej porowatości, powstającym w wyniku erupcji wulkanicznej. Cechuje się wysoką trwałością, niskim zasoleniem, jest sterylny, nie ulega zbrylaniu, nie jest pożywką dla mikroorganizmów. Jego wysoka zdolność do adsorpcji i zatrzymania wody powoduje, że może on być stosowany do immobilizacji enzymów [6]. Celem niniejszej pracy jest zbadanie przydatności procedury aktywacji chemicznej pumeksu warunkującej reakcję z inwertazą do regeneracji matrycy i wykorzystania jej do immobilizacji kolejnej partii enzymu.

Metodyka

Pomiary właściwości katalitycznych inwertazy unieruchomionej na pumeksie wykonano po zakończeniu następujących po sobie dwóch cykli: aktywacji i regeneracji, przeprowadzonych wg procedury opisanej przez Ginalska i wsp. [5] i opartej na badaniach własnych [4].

Aktywacja. Pierwszy cykl, którego celem było wykonanie z surowego pumeksu matrycy do immobilizacji inwertazy obejmował następujące etapy:

1. *Usunięcie zanieczyszczeń fizycznych, organicznych i wprowadzenie na powierzchnię matrycy grup hydroksylowych.* Granulowany pumeks (125–160 μm) trawiono 5% HNO_3 w temp. pokojowej i płukano wodą destylowaną w temp. 60°C, intensywnie mieszając mieszadłem magnetycznym i odpowietrzając pompą wodną. Procedurę trawienia i płukania powtarzano trzykrotnie. W celu usunięcia zanieczyszczeń organicznych z powierzchni pumeksu i wpro-

wienia na nią czynnych grup hydroksylowych, zawiesinę gotowano w 5% HNO_3 przez 45 minut, potem chłodzono. Po 24 godzinach kwas dekantowano, a pumeks przemywano wielokrotnie wodą destylowaną (mieszając i odpowietrzając za pomocą pompy wodnej). Odpłukiwanie kwasu kontynuowano w komorze ultradźwiękowej. Wolny od zanieczyszczeń pumeks suszono pod próżnią w temp. 40–50°C.

2. *Aktywacja matrycy i wprowadzenie łącznika przestrzennego.* 1 g suchego pumeksu zawieszano w 5 ml 2% roztworu γ -APTES w acetonie. Odciągano powietrze jednocześnie mieszając zawiesinę przez 45 min. Następnie nośnik odsączano i suszono (24 godz., 40–50°C). Aktywną matrycę umieszczano w 5 cm^3 5% roztworu aldehydu glutarowego (łącznik przestrzenny) w buforze octanowym (0,01 mol/ dm^3 ; pH 4,7) w szczelnie zamkniętym naczyniu, odpowietrzano i pozostawiano na 30 minut. Powstałe wiązania iminowe zredukowano NaBH_4 przez 5 minut w temperaturze 4°C. Matrycę z łącznikiem przestrzennym przemywano kilkakrotnie buforem octanowym.
3. *Formowanie matrycy i immobilizacja białka.* Aktywną matrycę zawieszoną w buforze octanowym (0,01 mol/ dm^3 ; pH 4,7) umieszczano w szklanej kolumnie w taki sposób, aby zapewnić jednorodne ułożenie złoża i uniknąć obecności pęcherzyków powietrza. Przed użyciem kolumnę przemywano H_2SO_4 , a układ rurek doprowadzających i odprowadzających buforem octanowym. Na tak uformowaną matrycę nanoszono – w układzie zamkniętym, w temperaturze pokojowej, przy przepływie wywołanym pompą ssąco-tłoczącą – roztwór białka o aktywności inwertazy. Bazę roztworu stanowił bufor octanowy, objętość cyrkulującego roztworu była równa 5 cm^3 , a czas nanoszenia wynosił 1 godzinę. Enzym otrzymywano z liofilizowanych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Stężenie białka w ekstrakcie mieściło się w granicach 4,08–4,24 $\cdot 10^{-1}$ g/ dm^3 .
- 3a. *Określenie ilości związanego białka.* Ilość unieruchomionego na matrycy białka określano metodą pośrednią polegającą na obliczeniu różnicy zawartości białka w roztworze przed rozpoczęciem i po zakończeniu procesu nanoszenia. Przedłużenie czasu nanoszenia białka do 24 godzin nie wpłynęło istotnie na wydajność wiązania białka z nośnikiem. Po zakończeniu nanoszenia kolumnę przepłukiwano dwukrotnie 5 cm^3 buforu octanowego, w którym również oznaczano białko. Oznaczenia wykonywano metodą Lowry'ego [7]. Każdy pomiar powtarzano trzykrotnie.

3b. *Oznaczenie aktywności inwertazy.* Aktywność wykonanego biokatalizatora oznaczano badając kinetykę inwersji sacharozy, w temperaturze pokojowej, w środowisku buforu octanowego ($0,01 \text{ mol/dm}^3$; pH 4,7). Oznaczenia wykonywano w układzie zamkniętym (naczynko reakcyjne + moduł katalityczny) o objętości 7 cm^3 . Stężenie początkowe sacharozy wynosiło $0,05 \text{ mol/dm}^3$. W układzie zastosowano podwójny system mieszania cieczy reakcyjnej (mieszanie magnetyczne zawartości naczynka reakcyjnego i wymuszona cyrkulację mieszaniny reakcyjnej przez pionowy moduł katalityczny). Szybkość cyrkulacji dobrano tak, aby nie ograniczyć szybkości inwersji. Postęp reakcji mierzono badając szybkość przyrostu stężenia glukozy w mieszaninie reakcyjnej. Zależność ta, w przedziale $\Delta t = 0\text{--}30 \text{ min.}$, była prostoliniowa. Za jednostkę aktywności inwertazy przyjęto taką aktywność enzymu, która przekształca 1 mol substratu w produkty w czasie 1 sekundy w optymalnych warunkach (bufor octanowy o stężeniu $0,01 \text{ mol/dm}^3$, pH 4,7) przy stężeniu początkowym substratu zapewniającym maksymalną szybkość reakcji ($\geq 0,05 \text{ mol/dm}^3$).

Regeneracja. Po upływie dwóch miesięcy zużyta matrycę poddano procesowi regeneracji obejmującej etapy podobne do procesu aktywacji. Nośnik zdjęty z kolumny, w celu usunięcia pozostałości enzymu i innych zanieczyszczeń, trawiono 5% HNO_3 w temperaturze pokojowej, aktywowano w temperaturze wrzenia (5% HNO_3 , 45 minut), płukano wodą destyloowaną i suszono pod próżnią w temperaturze $40\text{--}50^\circ\text{C}$. Następnie matrycę poddawano procesowi silanizacji, wprowadzono łącznik przestrzenny, redukowano wiązania iminowe, formowano złożę modułu katalitycznego, nanoszono białko i oznaczano aktywność związanej inwertazy. Ilość związanego białka określano jak w punkcie 3a. Zakładając wysoką aktywność złoża stężenie początkowe sacharozy podniesiono do $0,06 \text{ mol/dm}^3$.

Wyniki

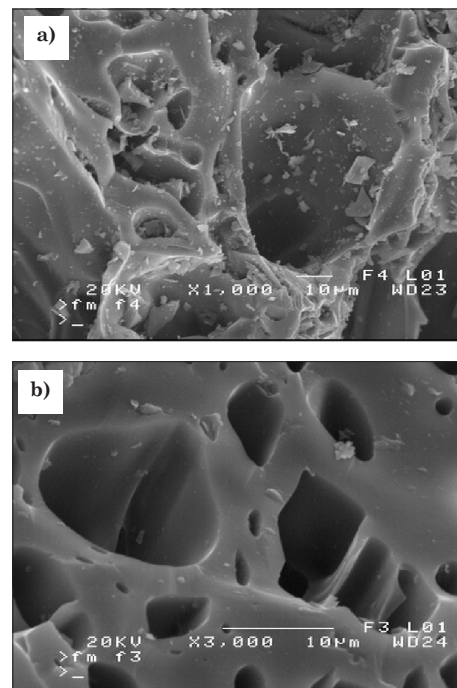
Skuteczność opisanej w pracy procedury oczyszczania powierzchni surowego pumeksu od zanieczyszczeń (etap 1) przedstawiono na rys. 1, a liczbowe dane doświadczalne i obliczone na ich podstawie wartości zebrano w tabelicy 1.

Po trzykrotnym trawieniu i płukaniu matrycy z jej powierzchni zostają usunięte widoczne na zdjęciu (Rys. 1a) drobiny zanieczyszczeń, co świadczy o głębokiej penetracji me-

diów w strukturę matrycy i upoważnia do wyciągnięcia wniosku o ich równie skutecznej ingerencji chemicznej.

Analiza danych z tabelicy 1 ujawnia natomiast, że stosunkowo wysoka wydajność immobilizacji po cyklu aktywacji (88,1%) ulega znacznemu obniżeniu po cyklu regeneracji (24,7%).

Ilość białka związanego ze zregenerowaną matrycą jest 3,4-krotnie mniejsza. W konsekwencji szybkość i wydajność 1 gramowego modułu katalitycznego spada. Spadek aktywności jest jednak mniejszy od spadku wydajności immobilizacji gdyż, co istotne, rośnie 1,79-krotnie aktywność właściwa biokatalizatora.



Rys. 1. Powierzchnia pumeksu a) przed i b) po usunięciu zanieczyszczeń (cykl 1, etap 1). Zdjęcia wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (dr inż. St. Lenart, Zakład Metaloznawstwa i Odlęwnictwa, ZUT Szczecin)

Wnioski

Wyniki otrzymane w przeprowadzonym doświadczeniu prowadzą do następujących wniosków: 1) Granulowany pumeks jest nośnikiem, który można regenerować i stosować wielokrotnie do wiązania inwertazy z *Saccharomyces cerevisiae*, 2) Pojemność matrycy wykonanej z pumeksu zależy od sposobu modyfikacji chemicznej jej powierzchni, 3) Jednorazowa modyfikacja chemiczna matrycy nie gwarantuje pełnej aktywności otrzymanego biokatalizatora, 4) Wykonanie wydajnego biokatalizatora pumeks-inwertaza powinien poprzedzać proces aktywacji matrycy polegający na przeprowadzeniu, co najmniej dwóch, następujących po sobie, cyklów modyfikacji chemicznej powierzchni – aktywacji i regeneracji.

LITERATURA

1. P. W. van der Poel, H. Schiweck, T. Schwartz: Zuckertechnologie. Berlin, Rüben- und Rohrzuckergewinnung, 2000.
2. J. Synowiecki, S. Wołosowska, Biotechnologia 2, 77, 7 (2007).
3. L. Cao: Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Application and Design. Weinheim, Wiley-VCH, 2005.
4. T. Ogoński, T. Dziaman, M. Siemiątkowski, R. Drozd: Materiały Konferencji Naukowej „Biotechnologia w Polsce”. Gdańsk, 25–28 września 2002.
5. G. Ginalska, A. Belcarz, J. Lobarzewski, T. Wolski, Biotechnologia 1, nr 44, 226 (1999).
6. M. Kitis, E. Karakaya, N.O. Yigit, G. Civelekoglu, A. Akcil: Water Res., 33, 1652 (2005).
7. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

Tablica 1
Wpływ procesu aktywacji i regeneracji matrycy na właściwości biokatalizatora wykonanego z pumeksu (1,0 g) i inwertazy z *Saccharomyces cerevisiae*

Określana wielkość	Aktywacja (cykl I)	Regeneracja (cykl II)
Ilość białka użytego do immobilizacji, [g]	$2,04 \cdot 10^{-3}$	$2,12 \cdot 10^{-3}$
Ilość białka pozostałego w roztworze, [g]	$2,44 \cdot 10^{-4}$	$1,60 \cdot 10^{-3}$
Ilość białka związanego z matrycą, [g]	$1,80 \cdot 10^{-3}$	$5,24 \cdot 10^{-4}$
Wydajność immobilizacji, [%]	88,1	24,7
Szybkość inwersji ($\Delta t = 0\text{--}30 \text{ min.}$), [mol/(dm ³ s)]	$1,63 \cdot 10^{-5}$	$8,49 \cdot 10^{-6}$
Wydajność inwersji ($t = 30 \text{ min.}$), [%]	56,6	40,5
Aktywność właściwa inwertazy, [kat/g białka]	$9,1 \cdot 10^{-3}$	$16,2 \cdot 10^{-3}$