

Immobilizacja lipazy w sieci silikażelu

Joanna M. JAKUBIAK – Katedra Inżynierii Chemicznej i Bioprocusowej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz; Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń; Marek J. WÓJCIK – Katedra Inżynierii Chemicznej i Bioprocusowej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, 65, 4, 343-346

Wstęp

Wykorzystanie enzymów w ich naturalnej natywnej formie w procesach biotransformacji napotyka na wiele ograniczeń, spośród których najbardziej istotne są problemy z oddzieleniem ich od produktów reakcji oraz związane z tym problem braku możliwości ich powtórnego użycia. Dobrym rozwiązaniem są metody immobilizacji, wiążące lub zamykające enzymy w układach heterogenicznych, nierozpuszczalnych w wodzie, ale zapewniających dyfuzję substratów i produktów. Bieżąca praca skupiona jest na metodzie pułapkowania lipazy wewnątrz trójwymiarowej, porowatej sieci tlenku krzemu, powstałej w procesie hydrolizy i polikondensacji najbardziej znanego przedstawiciela alkoksylanów (organicznych pochodnych kwasu krzemowego) – tetrametoksylanu (TMOS). Metoda ta nazywana jest procesem zol-żel, ponieważ na skutek hydrolizy alkoksylanów $Si(OR)_4$ do silanoli ($=Si-OH$) powstaje zol, który następnie, w wyniku wzajemnej kondensacji silanoli lub ich kondensacji z alkoksylanami, przechodzi w żel [1]. Znane są trzy metody hydrolizy TMOS: kwasowa [2, 3], zasadowa [4] oraz zachodząca pod wpływem roztworów soli fluorkowych, takich jak fluorek sodu (NaF) [5 ÷ 7]. Pierwsze dwie pozwalają tylko na przeprowadzenie immobilizacji lipazy w bloku. W takim przypadku roztwór enzymu wprowadzany jest razem z hydrolizatem TMOS do buforu, co wywołuje natychmiastowe żelowanie. Trzecia metoda, która w jednej operacji łączy reakcję hydrolizy i proces polikondensacji, stwarza nowe możliwości prowadzenia procesu immobilizacji lipazy metodą emulsyjną, z pominięciem procesu kruszenia bloku. Katalizatorem stosowanym powszechnie w tej metodzie jest roztwór NaF o stężeniu 1 M. Przy tak dużym stężeniu natychmiastowa hydroliza i polikondensacja TMOS prowadzi do żelowania całej mieszaniny [5, 6, 8], więc immobilizacja również może być prowadzona tylko w bloku. Celem pracy było spowolnienie procesu żelowania, poprzez zastosowanie bardziej rozcieńczonych roztworów NaF oraz sprawdzenie, jaki wpływ może to mieć na aktywność biokatalizatora. Prowadzenie spowolnienia procesu stwarzałoby możliwość manipulacji żelującą mieszaniną i prowadzenia procesu zol-żel w emulsji.

Materiały

Enzym: lipaza z *Candida rugosa* (Typ VII, numer produktu: LI 754, Sigma-Aldrich), tetrametoksylan (TMOS, Fluka), fluorek sodu (NaF, POCh), poli(alkohol winylowy) (PVA, Fluka), tributeryna (Sigma), wodorotlenek sodu naważka analityczna 0,1 M (NaOH, POCh), chlorek wapnia ($CaCl_2$, POCh), chlorek potasu (KCl, POCh), diwodorofosforan(V) sodu (NaH_2PO_4 , POCh), wodorofosforan(V) dwusodu dwunastowodny ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, POCh), fenoloftaleina (POCh).

Metody

Immobilizacja

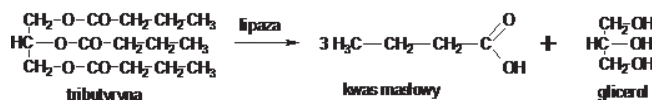
Do naczynia reakcyjnego wprowadzono wodny roztwór lipazy (29,4 mg/ml) i dodano do niego 4% wodny roztwór poli(alkoholu winylowego) i fluorku sodu o stężeniach: 1 mol/dm³, 0,1 mol/dm³ oraz 0,01 mol/dm³. Układ poddano intensywnemu mieszaniu przez kilka sekund dla dokładnego wymieszania składników, po czym dodano tetrametoksylan (TMOS) i dalej mieszano. Następnie mie-

szanie reakcyjną szybko przelewano do plastikowych pojemników z zamknięciem i umieszczono w lodówce, w temperaturze 4°C w celu dojrzewania żelu, na okres 2 h. Pojemniki otworzono i pozostawiono na 10 dni do wysuszenia. Uzyskane bloki kserozeli kruszono w porcelanowym moździerzku, a otrzymany drobnokrystaliczny proszek poddano analizie sitowej. Do badań aktywności wybrano frakcje o wymiarach ziaren: 0,1-0,2 mm oraz 0,325-0,5 mm.

Oznaczanie aktywności biokatalizatorów

Sprawdzeniu aktywności immobilizowanej lipazy posłużyła reakcja modelowa – hydroliza tributeryny do glicerolu i kwasu masłowego:

Wydzielony w reakcji kwas masłowy określano ilościowo metodą



Rys. 1. Reakcja hydrolizy tributeryny

miareczkowania alkalimetrycznego wobec fenoloftaleiny. Jako tytrant stosowano wodny roztwór wodorotlenku sodu (NaOH) o stężeniu 0,05 mol/dm³.

Dyskusja wyników

Wyniki obserwacji jakościowych szybkości tworzenia się trwałego żelu biokatalizatora zestawiono w tabelicy 1. Pokazują one, że zastosowanie dziesięcio- i stukrotnego rozcieńczenia roztworu katalizatora – fluorku sodu – spowodowało wydłużenie czasu żelowania, który wzrastał proporcjonalnie do wzrostu rozcieńczenia.

Tabelica 1

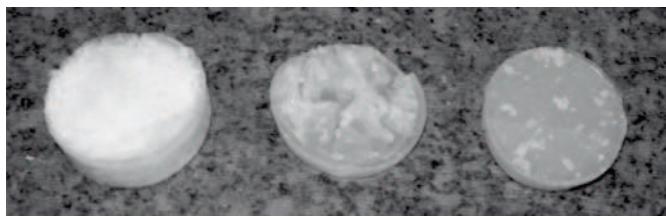
Wyniki obserwacji jakościowych czasu żelowania

Stężenie NaF, mol/dm ³	Czas żelowania, min.	
	Próba 1	Próba 2
1,00	0,08	0,08
0,10	3,00	4,00
0,01	20,00	17,50

Zaobserwowano zmniejszenie objętości żelu podczas jego suszenia, a także jego popęknięcie, spowodowane stresem kapilarnym, powstałym na skutek nierównomiernego rozkładu działania sił kapilarnych na ściany porów o zmiennej średnicy. Zaskakująca okazała się zależność zaobserwowanej gęstości pęknięć w kserozelu od użytego stężenia katalizatora – fluorku sodu (rys. 2).

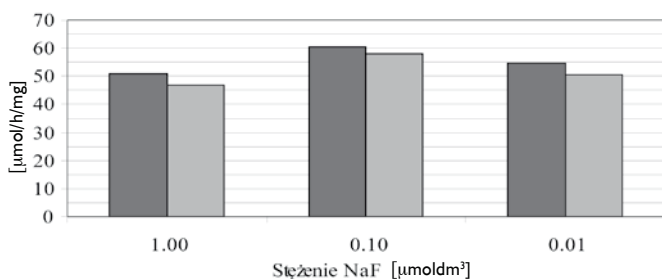
Gęstość ta malała wraz ze spadkiem stężenia fluorku sodu, użytego do hydrolizy TMOS. Podczas kruszenia zaobserwowano także zmienną twardość i wytrzymałość mechaniczną bloków. Najtwardszy i najbardziej wytrzymały okazał się blok otrzymany w wyniku użycia roztworu NaF o stężeniu 0,1 mol/dm³. Najmniej wytrzymały, i najbardziej kruchy, okazał się blok otrzymany przy użyciu roztworu NaF o stężeniu 1 mol/dm³, zaś blok otrzymany przy użyciu roztworu NaF

o stężeniu $0,01 \text{ mol/dm}^3$, charakteryzował się pośrednią twardością i wytrzymałością mechaniczną. Wiedza ta pozwoliła zaplanować badania nad procesem zol-żel prowadzonym w emulsji.



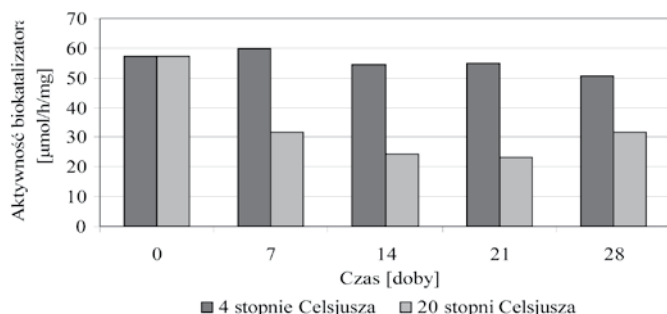
Rys. 2. Fotografia popękanych bloków biokatalizatorów przygotowanych z użyciem katalizatora – fluorku sodu o następujących stężeniach (od lewej): 1 mol/dm^3 ; $0,1 \text{ mol/dm}^3$ oraz $0,01 \text{ mol/dm}^3$

Aktywność wyrażono jako liczbę μmoli kwasu masłowego, tworzono przez 1 mg lipazy zawartej w biokatalizatorze, w czasie 1 h . Typowe wyniki badań aktywności biokatalizatorów przygotowanych z użyciem katalizatora o 3 stężeniach przedstawiono na rysunku 3. Sprawdzono także zależność pomiędzy wymiarem liniowym ziaren biokatalizatora, a jego aktywnością. Dla każdego z 3 biokatalizatorów wybrano dwie frakcje ziaren – o wymiarach $0,1-0,2 \text{ mm}$ oraz $0,325-0,5 \text{ mm}$. Badania (rys. 3) wykazały największą aktywność biokatalizatora, do przygotowania którego użyto roztwór NaF o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$, mniejszą $0,01 \text{ mol/dm}^3$, zaś najmniejszą 1 mol/dm^3 . Różnice nie były jednak duże. Ponadto biokatalizator o większym wymiarze liniowym, w obu przypadkach wykazywał mniejszą aktywność.



Rys. 3. Wpływ stężenia użytego podczas immobilizacji roztworu NaF i rozmiarów ziaren biokatalizatorów na ich aktywność

Spowodowane było to mniejszą dostępnością cząsteczek enzymu, umiejscowionych w głębi większych ziaren, dla substratu, a co za tym idzie, występowaniem większych oporów dyfuzyjnych.



Rys. 4. Zmiany aktywności biokatalizatora podczas przechowywania w temperaturze otoczenia (20°C) oraz 4°C

Przeprowadzono cykl pomiarów aktywności, mających określić wpływ warunków przechowywania biokatalizatora na jego stabilność. W tym celu biokatalizator przechowywano w dwóch pojemnikach: w temperaturze otoczenia (ok. 20°C) oraz 4°C i w określonych odstępach czasu dokonywano pomiarów jego aktywności. Wyniki przedstawiono na rysunku 4.

Zmiany aktywności w czasie były podobne dla wszystkich trzech biokatalizatorów – zaobserwowano większą utratę aktywności podczas przechowywania w temperaturze otoczenia, powodowaną zapewne szybszą dezaktywacją enzymu.

Podsumowanie i wnioski

Podsumowując przeprowadzone badania procesu immobilizacji lipazy metodą zol-żel oraz badania aktywności i stabilności otrzymanych biokatalizatorów, można sformułować następujące wnioski:

- Zastosowanie mniejszego stężenia katalizatora (NaF) skutkuje spowolnieniem procesu żelowania i ma nieznaczny wpływ na aktywność otrzymanego biokatalizatora
- Wielkość ziaren biokatalizatora ma niewielki wpływ na jego aktywność
- Temperatura przechowywania biokatalizatora ma istotny wpływ na jego stabilność.

Literatura

1. Khimich N.N.: *Synthesis of silica gels and organic-inorganic hybrids on their base*. Glass Physics and Chemistry 2004, **30**, 5, 430.
2. Kuncova G., Szilva J., Hetflejs J., Sabata S.: *Catalysis in organic solvents with lipase immobilized by sol-gel technique*. Journal of Sol-Gel Science and Technology 2003, **26**, 1183.
3. Livage J., Coradin T., Roux C.: *Encapsulation of biomolecules in silica gels*. Journal of Physics: Condensed Matter 2001, **13**, R673.
4. Braun S., Rappoport S., Zusman R., Avnir D., Ottolenghi M.: *Biochemically active sol-gel glasses: The trapping of enzymes*. Materials Letters 2007, **61**, 2843.
5. Nouredini H., Gao X.: *Characterization of sol-gel immobilized lipases*. Journal of Sol-Gel Science and Technology 2007, **41**, 31.
6. Reetz M.T., Zonta A., Simpelkamp J.: *Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials*. Biotechnology and Bioengineering 1996, **49**, 527.
7. Xu Song-wei, Jiang Zhong-yi, Lu Yang, Wu Hong, Yuan Wei-Kang: *Preparation and catalytic properties of novel alginate-silica-dehydrogenase hybrid biocomposite beads*. Industrial & Engineering Chemistry Research 2006, **45**, 511.
8. Soares C.M.F., dos Santos O.A., Olivo J.E., de Castro H.F., de Moraes F.F., Zanin G.M.: *Influence of alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2004, **29**, 69.

Mgr inż. Joanna M. JAKUBIAK jest absolwentką Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy (2007). Obecna na studiach doktoranckich Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (od 2007). Pracuje w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Bioprocusowej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe: immobilizacja enzymów, biotechnologia.

Dr hab. inż. Marek J. WÓJCIK ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Szczecińskiej (1968). Stopień doktora uzyskał w 1978 r. na Politechnice Warszawskiej, a w 1990 r. stopień doktora habilitowanego. Kierownik Katedry Inżynierii Chemicznej i Bioprocusowej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe – inżynieria bioprocusowa, modelowanie procesów biotransformacji, otrzymywanie immobilizowanych biokatalizatorów.