

Marcin LEWAŃCZUK, Agata KUCEWICZ, Jolanta BRYJAK

e-mail: marcin.lewanczuk@pwr.wroc.pl

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Stabilność operacyjna immobilizowanej lakazy w obecności aminofenolu

Wstęp

Opracowanie skutecznych metod stabilizacji enzymów w warunkach procesowych jest konieczne dla ich skutecznego zastosowania w przemyśle. Ma to szczególne znaczenie w przypadku biokatalizatorów prowadzących reakcję z udziałem wolnych rodników, będących czynnikami wywołującymi inaktywację enzymu. W celu zniwelowania ich negatywnego wpływu stosuje się immobilizację enzymów lub dodatek rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą [Truppo i in., 2006; Land i in., 2007]. Substancje te zwiększają rozpuszczalność tlenu oraz hydrofobowych substratów, a także ograniczają udział wolnych rodników w inaktywacji enzymów. Z drugiej strony, dodatek rozpuszczalników organicznych, mieszających się z wodą, często powoduje spadek szybkości reakcji, wynikający z bezpośrednich oddziaływań rozpuszczalnik-białko, prowadzących do zmiany konformacji enzymu albo wyparcia cząsteczek wody z bezpośredniego otoczenia białka [Chen i in., 2003]. Zjawiska te często prowadzą do nieodwracalnej inaktywacji enzymów.

Jednym z biokatalizatorów, którego wydajność pracy próbuje się zwiększyć przez użycie rozpuszczalników organicznych, jest lakaza. Enzym ten należy do rodziny niebieskich oksydoreduktaz. Jest szeroko rozpowszechnioną glikoproteiną, produkowaną głównie przez grzyby, w mniejszym stopniu przez rośliny wyższe oraz niektóre bakterie [Riva, 2006]. Enzym ten w swoim centrum aktywnym zawiera cztery sąsiadujące atomy miedzi, które uczestniczą w utlenianiu licznych związków fenolowych i ich pochodnych, jednocześnie przenosząc cztery elektrony na tlen cząsteczkowy, w wyniku czego powstaje cząsteczka wody [Riva, 2006; Rodriguez-Cauto, 2006].

Lakaza wykazuje szeroką specyficzność substratową, obejmującą fenole, związki fenolowe, aminofenole, aminy aromatyczne, ligniny, hormony steroidowe [Riva, 2006; Rodriguez-Cauto, 2006]. Przy użyciu odpowiednich mediatorów zdolna jest do delignifikacji pulpy drzewnej i utleniania składników o wysokim potencjale redoks, takich jak aromatyczne alkohole [Kurniawati i Nicell, 2007]. Lakaza produkowana jest jako zewnątrz- i wewnątrzkomórkowy enzym i może być wykorzystywana w wielu gałęziach przemysłu. Może być stosowana do oczyszczania ścieków z przemysłu papierniczego czy węglowego, w produkcji biopaliw, do konstrukcji biosensorów oraz w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [Rodriguez-Cauto, 2006]. Jednak głównymi problemami są niska rozpuszczalność większości substratów fenolowych w wodzie, rodnikowe pośrednie produkty reakcji oraz relatywnie duże zużycie tlenu w procesie utleniania.

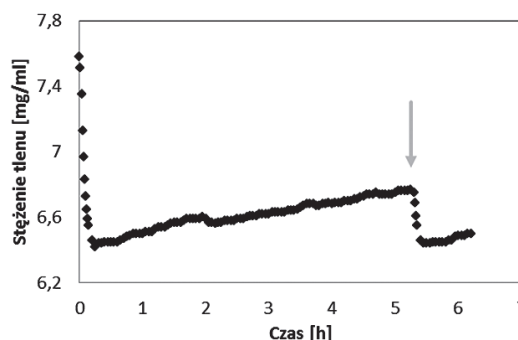
Głównym celem pracy było oszacowanie wpływu 2-propanolu na stabilność procesową lakazy w procesie utleniania 2-aminofenolu. W badaniach wykorzystano lakazę immobilizowaną kowalencyjnie na trzech różnych nośnikach oraz, porównawczo, lakazę natywną. Szczególną uwagę zwrócono na sorpcję produktów reakcji na powierzchni nośników ze związanym enzymem.

Materiały i metody

Do badań wykorzystano lakazę z huby drzewnej (*Cerrena unicolor*), uzyskaną i unieruchomioną przy użyciu wcześniej opisanej procedury [Rekuć i in., 2006]. Nośnikami wykorzystywanymi do immobilizacji były: granulowana celuloza mikrokrystaliczna, modyfikowana pentaheksylenodiaminą (G), kopolimer akrylanu butylu i dimetakrylanu glikolu etylenowego, modyfikowany etylenodiaminą (BA), żel krzemionkowy,

modyfikowany 2-aminoetylo-3-amino-propylometylo-dimetoksylo-silanem (ZM).

W celu określenia wpływu 2-propanolu na stabilność lakazy w procesie utleniania aminofenolu (AF) wprowadzono 1,8 cm³ enzymu immobilizowanego do 68,2 cm³ 5 mM AF w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5.25 (BFC) lub w BFC z dodatkiem 10% (v/v) 2-propanolu. W procesach kontrolnych stosowano jedynie BFC lub BFC zawierający 2-propanol. Analogiczną metodykę zastosowano w przypadku enzymu natywnego. Wszystkie reakcje prowadzono w temperaturze 30°C, stosując mieszalnikowy reaktor okresowy (enzym natywny i związany z G) lub termostatowaną wytrząsarkę (enzym związany z ZM i AB). W określonych interwałach czasowych z reaktorów pobierano próbki do oznaczeń aktywności lakazy. Celem zapewnienia ciągłej obecności substratu w mieszaninie reakcyjnej, w reaktorach z substratem monitorowano stężenie tlenu (fluorescencyjna elektroda tlenowa; Hach Lange). Sygnałem informującym o znacznym ubytku substratu było spowolnienie szybkości reakcji, powodujące wzrost stężenia tlenu w układzie (Rys. 1) i konieczność dodania nowej porcji substratu.



Rys. 1. Zmiany stężenia tlenu w trakcie procesu utleniania AF. Strzałką zaznaczono moment dodania nowej porcji substratu)

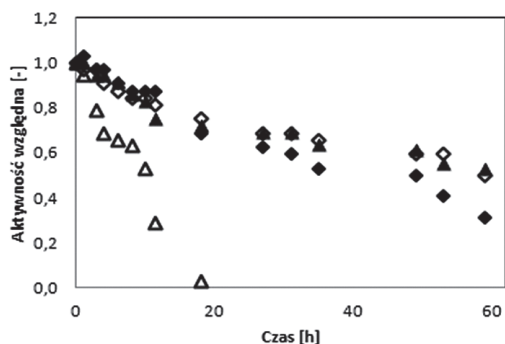
Aktywność lakazy oznaczano spektrofotometrycznie względem 10 mM AF jako substratu ($\lambda = 440$ nm; $T = 30^\circ\text{C}$). Pobrane próbki nośników były wstępnie kilkakrotnie przemywane buforem, celem odmycia zaadsorbowanych na nośniku produktów reakcji. W przypadku enzymu natywnego, pobrane próbki rozcieńczano 20-krotnie roztworem świeżego substratu. Za jedną jednostkę aktywności (U) przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach pomiaru powoduje przyrost absorbancji o 1 w czasie minuty.

Z mieszanin reakcyjnych pobierano również próbki do obserwacji mikroskopowych (*Zeiss Imager.M1m*).

Wyniki i ich omówienie

W trakcie badań nad zastosowaniem natywnej lakazy do biotransformacji AF stwierdzono znaczący spadek stabilności biokatalizatora w obecności substratu i produktów reakcji (Rys. 2; białe trójkąty).

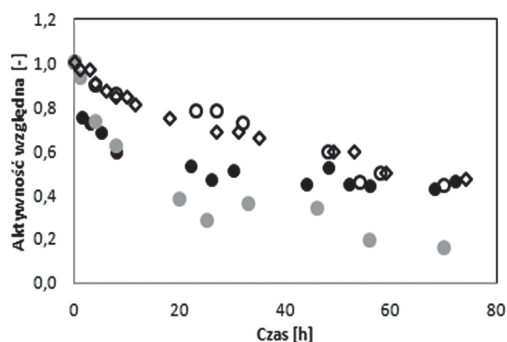
Ponieważ w reakcjach z lakazą powstają rodnikowe produkty pośrednie założono, że w obecności rozpuszczalnika organicznego mieszającego się z wodą powinno dojść do stabilizacji rodników i zwiększenia stabilności enzymu. W niezależnych badaniach wytypowano 2-propanol o stężeniu 10%, który nie wywołuje tak znacznej inaktywacji enzymu w AF (Rys. 2; czarne romby) w porównaniu z utratą aktywności enzymu w buforze (Rys. 2; białe romby). Poczynione wstępne założe-



Rys. 2. Stabilność lakazy natywnej w 30°C i w obecności: (◇) BFC, (◆) 10% 2-propanolu, (△) 5mM AF, (▲) 5mM AF i 10% 2-propanolu

nie o stabilizacji enzymu z 2-propanolu znalazło pełne potwierdzenie, o czym świadczy porównanie przebiegów utraty aktywności enzymu w obecności AF i AF z dodatkiem rozpuszczalnika (Rys. 2; białe i czarne trójkąty, odpowiednio). Ponieważ otrzymano znaczący wzrost stabilności enzymu w obecności substratu i 2-propanolu, postanowiono przetestować w sposób analogiczny układy z immobilizowaną lakazą.

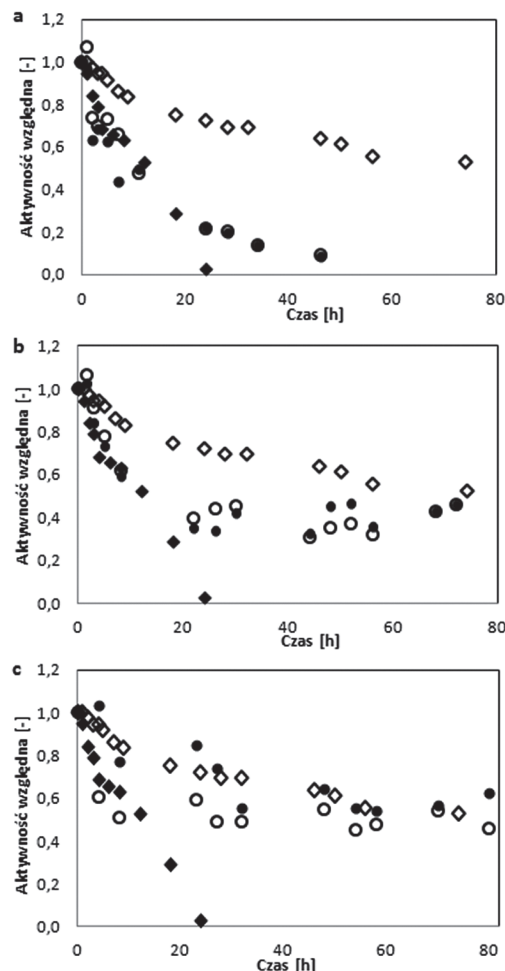
W badaniach wstępnych wykorzystano lakazę związaną kowalencyjnie z nośnikiem BA, ZM oraz G i wykonano testy stabilności w 30°C. Z danych zamieszczonych na rys. 3 wynika, że enzym natywny oraz immobilizowany na nośnikach BA i ZM zachowuje po 3 dniach 30% początkowej aktywności, podczas gdy immobilizacja na nośniku G powoduje wyraźną destabilizację lakazy.



Rys. 3. Stabilność lakazy w BFC w 30°C: lakaza natywna (●) oraz immobilizowana na nośnikach BA (○), G (●) oraz ZM (●)

Badania zasadnicze skupiły się na ocenie wpływu 2-propanolu na przebieg procesu utleniania AF z udziałem lakazy immobilizowanej. Wcześniejsze wyniki sugerowały, że osiągnięcie wyższej stabilności związanego enzymu niż lakazy natywnej w buforze będzie bardzo trudne, jeżeli możliwe. Natomiast przypuszczano, że enzym związany z nośnikiem G nie pozwoli otrzymać zadowalającej stabilności. Otrzymane wyniki (Rys. 4) w znacznym stopniu potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia. Na przedstawionych wykresach zamieszczono porównawczo dane dla stabilności enzymu natywnego w obecności substratu (Rys. 4; czarne romby), co pozwala szybko oszacować wpływ immobilizacji (czarne koła) na stabilizację/destabilizację lakazy w mieszaninie reakcyjnej. I tak stwierdzono początkową destabilizację i późniejszą niewielką stabilizację lakazy po jej związaniu z nośnikiem G, następnie początkowy brak wpływu i późniejszą bardzo wyraźną stabilizację na poziomie 40% aktywności wyjściowej dla nośnika ZM oraz istotną stabilizację lakazy związanej z nośnikiem BA. W zasadzie można stwierdzić, że immobilizacja stabilizuje enzym we wszystkich badanych przypadkach, natomiast najbardziej interesujące wyniki otrzymuje się po związaniu enzymu z nośnikiem BA.

Analizując wpływ dodania 2-propanolu do substratu w przypadku stosowania enzymu immobilizowanego (Rys. 4; białe i czarne punkty), nie stwierdzono zwiększenia stabilności lakazy jeżeli zastosowano nośnik G lub ZM, a nawet niewielką destabilizację w przypadku nośnika BA. Natomiast odnosząc wyniki do kontroli z enzymem natywnym



Rys. 4. Stabilność lakazy immobilizowanej na nośniku: (a) G, (b) ZM, (c) BA; dla układów: (◆) enzym natywny i AF, (◇) enzym natywny, AF i 2-propanol, (●) enzym immobilizowany i AF, (○) enzym immobilizowany, AF i 2-propanol

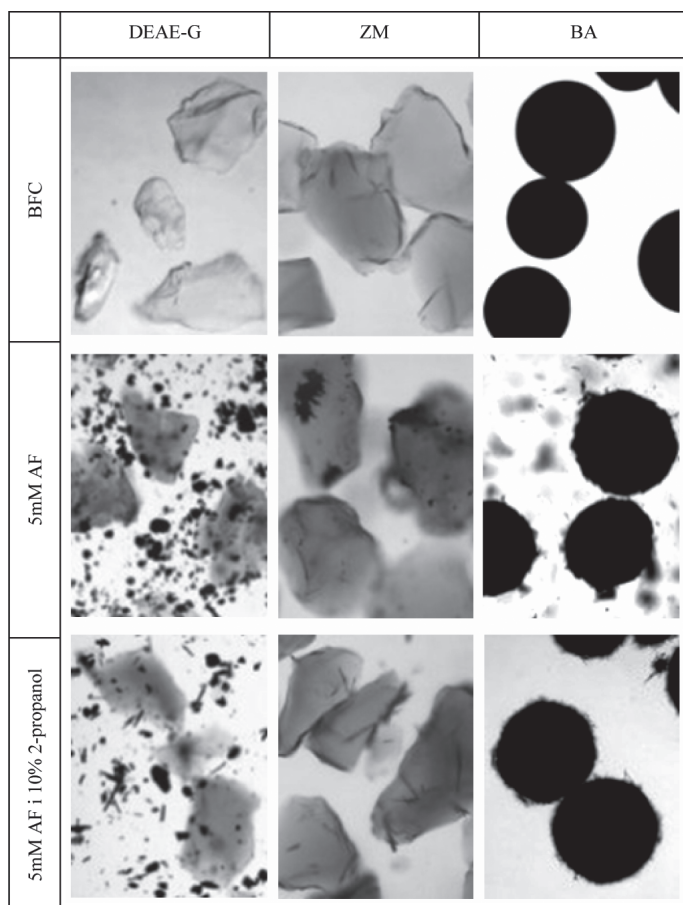
(Rys. 4; białe romby i białe koła), zbliżone wyniki otrzymano jedynie w przypadku użycia enzymu związanego z nośnikiem BA. Zatem, enzymatyczne utlenianie AF może być prowadzone efektywnie w obecności enzymu natywnego, ale wprowadzenie 2-propanolu w ilości 10% jest czynnikiem wymaganym, aby uzyskać zwiększoną stabilność biokatalizatora. Natomiast wiążąc enzym z nośnikiem BA można prowadzić utlenianie AF bez konieczności dodania 2-propanolu, utrzymując zadowalającą aktywność enzymu. Badania stabilności lakazy związanej z tym nośnikiem kontynuowano do 180 h (dane nieprezentowane), sukcesywnie dodając porcje substratu i po tym czasie uzyskano około 50% aktywności wyjściowej. Można zatem stwierdzić, że otrzymany preparat posiada zadowalającą stabilność operacyjną.

Podczas prowadzenia długoterminowych procesów, w których ubytek substratu był sukcesywnie uzupełniany, zaobserwowano pojawianie się dużych ilości produktu, wytrącającego się w postaci aglomeratów w mieszaninie reakcyjnej i na powierzchni nośników. Zjawisko to było obserwowane podczas wcześniejszych badań z immobilizowaną lakazą i w obecności innych substratów, jednak ich nasilenie było niewielkie, głównie ze względu na krótsze czasy reakcji. Należy podkreślić, że problem wytrącania się produktów reakcji i ich sorpcji na nośnikach, jakkolwiek występujący bardzo często, w publikacjach jest pomijany. W celu zobrazowania stopnia nasilenia tego zjawiska, pobierano próbki nośnika wraz z mieszaniną reakcyjną i poddawano je obserwacjom mikroskopowym przy 100-krotnym powiększeniu. Przykładowe zdjęcia, wykonane po 48 h utleniania AF z udziałem stosowanych preparatów immobilizowanych oraz w obecności i bez 2-propanolu, przedstawiono w tab.1. Próbkami kontrolnymi były preparaty inkubowane w buforze. Należy jeszcze zaznaczyć, że wytrącanie produktów utleniania AF miało miejsce również w przypadku stosowania enzymu natywnego.

Analiza zdjęć mikroskopowych wykazała, że zarówno typ zastosowanego nośnika jak i obecność 2-propanolu ma wpływ na ilość wytrąconych produktów na powierzchni nośników oraz ich obecność w roztworze. W przypadku lakazy związanej z nośnikiem G, nie obserwowano tworzenia się dużych skupisk produktu reakcji na powierzchni międzyfazowej, natomiast w roztworze obserwowano znaczne ilości dimerycznego produktu wykrystalizowanego w formie igieł. Natomiast w reakcji bez dodatku 2-propanolu, produkt przede wszystkim występował jako liczne i bezpostaciowe aglomeraty. Oznacza to, że chemiczne powinowactwo matrycy celulozowej i produktów reakcji jest niewielkie.

Nieco większe powinowactwo produktów reakcji do matrycy nośnika obserwowano podczas stosowania preparatu ZM, przy czym brak 2-propanolu powodował tworzenie skupisk produktów na powierzchni, a ich morfologia była zbliżona do form produktów obserwowanych

Tab. 1. Zdjęcia mikroskopowe nośników po 48 godzinach procesu utleniania AF, powiększenie 100-krotne



w roztworze AF bez 2-propanolu podczas reakcji z preparatem G. Z kolei obecność propanolu powodowała tworzenie się krystalicznych igieł na powierzchni nośnika. Natomiast największe powinowactwo produktów reakcji do powierzchni nośnika zanotowano dla matrycy BA, przy czym, ponownie, dodatek 2-propanolu promował powstawanie form krystalicznych. Dodatkowo, ilość wytrącających się produktów na nośniku była tak znacząca, że utrudniała jego odmycie przed przystąpieniem do pomiarów aktywności.

Podsumowanie i wnioski

Podczas badań nad wykorzystaniem lakazy do utleniania AF zauważono bardzo szybki spadek stabilności natywnego biokatalizatora. Jednakże dodanie 2-propanolu, w ilości 10% objętościowych, pozwoliło utrzymać aktywność biokatalizatora na poziomie obserwowanym w buforze. Ponieważ enzym natywny może być wykorzystany w danym procesie jednokrotnie, dlatego w dalszych badaniach zastosowano lakazę związaną kowalencyjnie z trzema różnymi nośnikami. Głównym celem

tych badań było oszacowanie możliwości zwiększenia stabilności operacyjnej enzymu poprzez immobilizację i, dodatkowo, poprzez dodanie rozpuszczalnika. Wykazano, że lakaza związana z nośnikiem G nie wykazuje zwiększonej stabilności, podczas gdy zastosowanie matryc ZM i BA pozwala otrzymać preparaty enzym-nośnik o zadawalającym stopniu stabilizacji. Natomiast we wszystkich badanych przypadkach nie stwierdzono potrzeby stosowania dodatku rozpuszczalnika organicznego w układach z enzymem immobilizowanym. Spośród zastosowanych nośników najlepsze wyniki uzyskano dla lakazy unieruchomionej na BA; mimo spadku aktywności enzymu w czasie pierwszych 100 h procesu do poziomu 50% aktywności wyjściowej, do 180 h nie obserwowano dalszych zmian.

Istotnym problemem, który pojawił się w trakcie badań, była sorpcja trudno rozpuszczalnych w wodzie produktów reakcji na powierzchni nośników. Utrudniała ona szczególnie pomiary aktywności enzymu w czasie oceny jego stabilności. Wykonanie obserwacji mikroskopowych ujawniło, że we wszystkich badanych przypadkach dodanie 2-propanolu do mieszaniny reakcyjnej powoduje powstawanie osadu produktów z dominującymi kryształami w formie igieł, podczas gdy bez propanolu większość produktu to bezpostaciowe aglomeraty. Dodatkowo, ilość zaadsorbowanego produktu silnie zależała od zastosowanego nośnika, przy czym największe powinowactwo dimerów AF zanotowano dla nośnika BA, o największej stabilności operacyjnej.

Podsumowując można stwierdzić, że mimo licznych zalet immobilizowanych enzymów, nie można ich zastosować w układach, w których produkty reakcji charakteryzują się silną tendencją do aglomeracji lub/ oraz krystalizacji. Mimo licznych doniesień o możliwościach wykorzystania immobilizowanych lakaz w biotransformacjach związków fenolowych, takich jak fenol i jego pochodne [Duran *in. in.*, 2002], należy zwrócić uwagę na fakt, że w większości przypadków w badaniach wykorzystywano substraty o niskim stężeniu i nie uzupełniano ich ubytków kolejnymi porcjami. Zatem, można było nie zaobserwować omawianego w tej pracy problemu sorpcji produktów na nośnikach. Natomiast generalnym wnioskiem jest wskazanie korzystnego układu reakcyjnego dla utleniania AF i innych pochodnych fenolowych, których produkty ulegają aglomeracji: należy stosować enzym natywny oraz dobrany rozpuszczalnik organiczny, pozwalający zwiększyć stabilność lakazy w obecności substratu i produktów reakcji.

LITERATURA

- Chen Q.X., Liu X.D., Huang H., 2003. Inactivation kinetics of mushroom tyrosinase in the dimethyl sulfoxide solution, *Biochemistry-Moscow*, 68, 644-649. DOI: 10.1023/A:1024665709631
- Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A., Gianfreda L., 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *Enzyme Microbial Tech.*, 31, 7, 907-931. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00214-4
- Kurniawati S., Nicell J.A., 2007. Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol, *Enzyme Microb. Technol.* 41, 353-361. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.03.003
- Land E.J., Ramsden C.A., Riley P.A., 2007. The mechanism of suicide-inactivation of tyrosinase: A substrate structure investigation, *Tohoku J., Exp. Med.* 212, 341-348. DOI: 10.1620/tjem.212.341
- Rekuć A., Kruczkiewicz P., Kiełczyński R., Jastrzebska B., Bryjak J., 2006. Produkcja laktazy i jej immobilizacja na wybranych nośnikach, *Acta Sci Pol., Biotechnologia* 5, 3-15
- Riva S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry, *TIBTECH* 24, 219-227. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.03.006
- Rodríguez Couto S., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnol. Adv.* 24, 500-513. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003
- Truppo M.D., Kim J., Brower M., Madin A., Sturr M.G., Moore J.C., 2006. A novel resolution of a pharmaceutically important bridged bicyclic ketone intermediate via selective enzymatic reduction with a commercially available ketoreductase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 38, 158-162. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.01.001

Badania były finansowane z projektu badawczego N N209 119337 (2009-2012).