IMOBILIZACE CELULOLYTICKÝCH ENZYMŮ NA NOSIČE Z POLYETHYLENTEREFTALÁTU A POLYAKRYLAMIDU

MIROSLAVA ZICHOVÁ[a], EVA STRATILOVÁ[b], MICHAL ROSENBERG[c] a JIŘINA OMELKOVÁ[a]

[a] Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, [b] Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovensko, [c] Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technologie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko xczichova@fch.vutbr.cz

Došlo 19.1.2015, přepracováno 22.6.15, přijato 18.8.15.

Klíčová slova: celulolytické enzymy, imobilizace, polyethylentereftalát, Sorsilen, Eupergit C

Úvod

Celulolytické enzymy jsou zodpovědné za biokonverzi celulosy na zkvasitelné cukry. Jedná se o multikomponentní enzymový systém, který obsahuje tři hlavní složky – endo-l,4-β-D-glukanasy, exo-l,4-β-D-glukanasy a β-glukosidasy[1]. Celulosa je nejdříve štěpena synergickým působením endoglukanas a exoglukanas. Endoglukanasy (EC 3.2.1.4) degradují náhodně amorfní oblasti celulosy a uvolňují glukooligosacharidy a celobiosu. Exoglukanasy (EC 3.2.1.91) postupně odštěpují celobiosu z neredukujícího konce celulosy. Tato degradace je pak doprovázena štěpením meziproduktů na glukosu působením β-glukosidas (EC 3.2.1.21)[2].

Zkvasitelné cukry vzniklé hydrolýzou celulosy mohou být fermentovány kvasinkami nebo bakteriemi, a tak lze získat další cenné metabolity, např. bioetanol, jedno z nejpoužívanějších alternativních paliv. Vzhledem k velkému množství celulosových odpadů, které jsou celosvětově produkovány zemědělstvím a potravinářským průmyslem, mají celulolytické enzymy obrovský potenciál při řešení této problematiky. V současnosti jsou proto hledány možnosti, jak nejlépe aplikovat celulolytické enzymy v rámci biotechnologických degradačních procesů.

Průmyslové aplikace enzymů jsou často komplikovány jejich některými vlastnostmi, které lze do určité míry pozitivně ovlivnit imobilizací. Hlavním důvodem pro použití enzymů v imobilizované formě je umožnění lepší manipulace s enzymem a jeho snadné oddělení od produktu, což usnadňuje efektivní využití a opětovné použití enzymů. Imobilizované enzymy lze použít při kontinuálních operacích (tzv. fixed-bed) a často mívají zvýšenou tepelnou a operační stabilitu[3].

Jedním z nejznámějších komerčních nosičů pro imobilizaci je Eupergit C, kopolymer methakrylamidu, *N*,*N*-methylen-bis-methakrylamidu a glycidylmethakrylátu, obsahující reaktivní oxiranové funkční skupiny, které vytvářejí kovalentní vazbu s aminovými a thiolovými skupinami proteinů v širokém rozmezí pH (1–12) (cit.[4]).

Polyethylentereftalát (PET) je polymer relativně inertní, hydrofobní a bez funkčních skupin, které jsou nezbytné pro kovalentní imobilizaci enzymu[5]. Nicméně enzymy mohou být na PET vázány adsorpcí.

Jako nosič pro imobilizaci glykanohydrolas byly navrhnuty drcené PET láhve[6]. Jeho předností je, že byl získán využitím odpadů a je ekonomickou alternativou k dostupným komerčním nosičům. Cílem této práce je imobilizovat celulolytický komplex na tento nosič, charakterizovat ho a porovnat jeho vlastnosti s celulolytickým komplexem imobilizovaným na další dva komerční nosiče, výše zmíněný Eupergit C a Sorsilen, práškovitý polyethylentereftalát vzniklý přesrážením PET z taveniny kaprolaktamu. Díky tomuto postupu přípravy má Sorsilen pórovitý povrch a hodnota jeho měrného povrchu je až o dva řády vyšší než PET připravený mechanickým mletím[7].

Experimentální část

Nosiče

PET nosič, připravený podle patentu[6] s průměrnou velikostí částic 0,8 mm; Sorsilen s objemem pórů 2 až 3 $cm^3 g^{-1}$ a měrným povrchem 80–100 $m^2 g^{-1}$, Silon, Planá nad Lužnicí; Eupergit C s velikostí částic 150 μm, Sigma-Aldrich, Německo.

Enzym

Lyofilizovaný komerční preparát – celulolytický komplex z *Trichoderma reesei* ATCC 26921, Sigma-Aldrich, Německo; aktivita při pH 4,8 (octanový pufr 0,05 mol l^{-1}) a 25 °C byla 9,0 mmol min^{-1} mg^{-1}.

Imobilizace celulolytického komplexu

Nosič (1 g) suspendovaný v 0,05 mol l^{-1} octanovém pufru o pH 4,8 (20 ml) byl inkubován s enzymem (0,1 až 30 mg) při 4 °C za třepání. Doba inkubace enzymu s nosiči byla optimalizována tak, že pravidelně (každých 12 hodin, později u Eupergitu C každých 24 hodin) byla stanovována aktivita enzymu v supernatantu, dokud nebyla konstantní. V případě PET nosiče a Sorsilenu probíhala inkubace po dobu 48 hodin, Eupergit C byl ponechán na imobilizaci 11 dní. Po této době byl nosič odstředěn a opakovaně promýván pufrem až do potvrzení nepřítomnosti volného enzymu v supernatantu. Množství navázaného enzymu bylo stanoveno z rozdílu aktivity dodané na imobilizaci a aktivity naměřené v supernatantech. Imobilizované pre-

paráty byly poté uskladněny v octanovém pufru o pH 4,8 při 4 °C.

Charakterizace volného a imobilizovaného celulolytického komplexu

Stanovení aktivity celulolytického komplexu bylo založeno na měření nárůstu redukujících skupin vznikajících během hydrolýzy karboxymethylcelulosy (CMC) jako substrátu pomocí Somogyiovy-Nelsonovy spektrofotometrické metody[8]. Roztok Somogyi I obsahoval 12 g $C_2H_4O_6KNa \cdot 4\ H_2O$, 16 g $NaHCO_3$, 18 g Na_2CO_3 a 144 g Na_2SO_4 na 800 ml destilované vody. Roztok Somogyi II obsahoval 4 g $CuSO_4$, 36 g Na_2SO_4 na 200 ml destilované vody. Nelsonův roztok obsahoval 25 g $(NH_4)_2Mo_7O_4 \cdot 4\ H_2O$ a 3 g $Na_2HAsO_4 \cdot 7\ H_2O$ na 475 ml destilované vody a 21 ml koncentrované H_2SO_4. Pro měření vzorků byla do zkumavky přidána směs Somogyiho roztoků (I a II v poměru 4:1) a následně stejný objem vzorku. Zkumavky byly 10 min ponořeny ve vroucí vodní lázni a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Poté byl přidán Nelsonův roztok (stejný objem jako vzorku) a destilovaná voda (desetinásobek objemu vzorku). Absorbance vzorků byla měřena na spektrofotometru Helios Epsilon (Unicam) při vlnové délce 530 nm.

Aktivita volného a imobilizovaného enzymového komplexu byla stanovena při 25 °C za pH 4,8 (v prostředí 0,05 mol l^{-1} octanového pufru). Reakce probíhala za stáléhо míchání v temperované dvouplášťové nádobce. Aktivita enzymu je vyjádřena v mikromolech redukujících skupin uvolněných 1 mg enzymu nebo 1 g nosiče za 1 min z 1% roztoku CMC. Relativní aktivita je poměr aktivity imobilizovaného enzymu a aktivity stejného množství volného enzymu vyjádřený v procentech.

Operační stabilita imobilizovaných enzymů byla stanovena kontinuálním promýváním kolony naplněné imobilizáty roztokem CMC (0,25 %, pH 4,8) s průtokem 3,5 ml h^{-1} při laboratorní teplotě. Množství redukujících skupin v eluátu bylo pravidelně testováno. Stabilita preparátů uskladněných v octanovém pufru o pH 4,8 při 4 °C byla sledována každých 7 dní po dobu 7 týdnů. Tepelná stabilita byla určena na základě aktivit stanovených po 2 hodinové inkubaci preparátu při určité teplotě (25–80 °C) a následném ochlazení na 25 °C.

Závislost celulasové aktivity na pH byla testována v rozmezí 3,6–5,6. Stanovení teplotního optima bylo provedeno pro rozmezí teplot 25 až 80 °C.

Kinetické konstanty volného a imobilizovaného enzymového komplexu K_m a v_{lim} byly vypočítány z počátečních rychlostí reakcí. Jako substrát byl použit roztok CMC o koncentracích 1 %; 0,8 %; 0,6 %; 0,4 % a 0,2 %. K_m a v_{lim} byly vypočítány z nelineární regrese programem Origin 8.0.

Změna způsobu účinku imobilizovaného enzymového komplexu byla stanovena viskozimetrií na vysokomolekulární substrát a produkty byly potvrzeny na základě tenkovrstvé chromatografie. Měření poklesu viskozity během degradace substrátu (0,8% CMC) bylo realizováno v Ostwaldově viskozimetru při 30 °C. Současně s měřením viskozity byl v daném čase stanoven přírůstek koncentrace redukujících sacharidů. Produkty enzymové degradace 0,8% hydroxyethylcelulosy (HEC) byly analyzovány tenkovrstvou chromatografií na silikagelu (TLC Silica gel 60, Merk, Německo), eluentem byla směs *n*-butanol-ethanol-voda (10 : 8 : 7) a vyvíjecí směsí 1% orcinol a 10% kyselina sírová v ethanolu.

Výsledky a diskuse

Stanovení optimálního množství navázaného celulolytického komplexu na nosiči

Aktivita získaných imobilizovaných preparátů byla závislá na množství navázaného enzymového komplexu a byla vždy nižší než aktivita stejného množství volného enzymu. U PET nosiče, který měl nejmenší povrch v porovnání s ostatními nosiči, docházelo se zvyšujícím se množstvím adsorbovaného enzymu ke snižování relativní aktivity. Nejvyšší dosažená relativní aktivita byla 1,70 % při navázaných 0,3 mg enzymu na 1 g nosiče. Maximální sorpční kapacita byla 1,16 mg enzymu na 1 g nosiče.

Imobilizovaný enzym na nosiči Sorsilen měl nejvyšší relativní aktivitu (4,56 %), když bylo vázáno 5 mg enzymu na 1 g nosiče. Další zvyšování koncentrace enzymu na nosiči vedlo k poklesu relativní aktivity, což bylo pravděpodobně způsobeno sterickými zábranami vedoucími ke snížení přístupnosti vysokomolekulárního substrátu. Podobný efekt byl pozorován při použití nosiče Sorsilen po imobilizaci endopolygalakturonasy[9].

U enzymu navázaného na Eupergit C docházelo ke zvyšování relativní aktivity se zvyšujícím se množstvím dávkovaného enzymu. Při nejvyšším možném množství navázaného enzymu (1,43 mg g^{-1}) byla relativní aktivita více než 13 %. Důvodem pro takto vysokou relativní aktivitu ve srovnání s předchozími dvěma preparáty je pravděpodobně fakt, že enzym je na Eupergit C vázán kovalentně a tato vazba neovlivňuje negativně přístup substrátu do aktivních center imobilizovaných enzymů.

Stabilita imobilizovaných preparátů v průběhu skladování

Ačkoliv měl nejvyšší relativní aktivitu preparát na nosiči Eupergit C, z hlediska celkové aktivity vykazoval nejlepší výsledky imobilizát Sorsilen, a proto se tento preparát zdál být nejvhodnější pro praktické využití. Tento imobilizát však neměl dobrou skladovací stabilitu, během prvních tří týdnů došlo k poklesu jeho aktivity o téměř 50 %. V případě preparátu s Eupergitem C se pokles aktivity projevil během dvou týdnů, a to o 30 %, a dále už nebyl zaznamenán. Preparát s PET nosičem byl první dva týdny stabilní, a po sedmi týdnech poklesla aktivita o 21 %. Ze všech nosičů je tedy po sledovanou dobu sedmi týdnů nejstabilnější. Ani v jednom případě nebyl pokles aktivity navázaných enzymů spojen s uvolňováním enzymů z testovaných nosičů.

Operační stabilita imobilizovaných preparátů

Operační stabilita imobilizovaných preparátů byla stanovena během konstantního průtoku roztoku substrátu (CMC) kolonou a je znázorněna na obr. 1. Aktivita imobilizovaného enzymu na PET nosiči se ustálila po 48 hodinách procesu, během kterých došlo k výraznému poklesu až na 30 % původní hodnoty, přičemž v průběhu následujících 20 dnů již nebyl zaznamenán pokles. U preparátu se Sorsilenem došlo k poklesu aktivity po dvou dnech až o 90 % a po dalších třech dnech aktivita klesla na nulu. Za tento jev je zřejmě odpovědná vysoká nespecifická sorpční kapacita nosiče, kdy došlo k jeho zahlcení substrátem. Aktivita preparátu s Eupergitem C poklesla po prvních dvou dnech o 32 %, poté byl pokles jen velmi pozvolný a aktivita se pohybovala okolo 30 % původní hodnoty.

Tepelná stabilita

Imobilizace neměla pozitivní účinek na tepelnou stabilitu celulolytického komplexu. Z obr. 2 lze vidět, že preparáty s PET nosičem a Eupergitem C vykazovaly podobné vlastnosti, neboť stabilita zůstala nezměněna až do teploty 50 °C a při vyšších teplotách postupně klesala, podobně jako tomu bylo u volného enzymového komplexu. Preparát se Sorsilenem se ukázal jako velmi teplotně nestabilní, již při teplotě 50 °C nevykazoval žádnou aktivitu. Důvodem by mohla být zvýšená sorpce substrátu na nosič v důsledku zrychlení jeho přenosu při zvýšené teplotě. Sorpce substrátu na tento nosič byla pozorována už při zjišťování operační stability tohoto preparátu (viz výše).

Optimalizace pH a teplotní optimum

Optimální pH pro preparát s PET nosičem se nezměnilo ve srovnání s hodnotou pro volný enzym a bylo 4,8. V případě druhých dvou preparátů došlo k posunu optima pH na hodnotu 4,6 pro preparát se Sorsilenem a 4,4 pro preparát s Eupergitem C. Tento jev je vysvětlen tím, že změny chování v závislosti na pH mohou souviset s nábojem jak enzymu, tak nosiče[10].

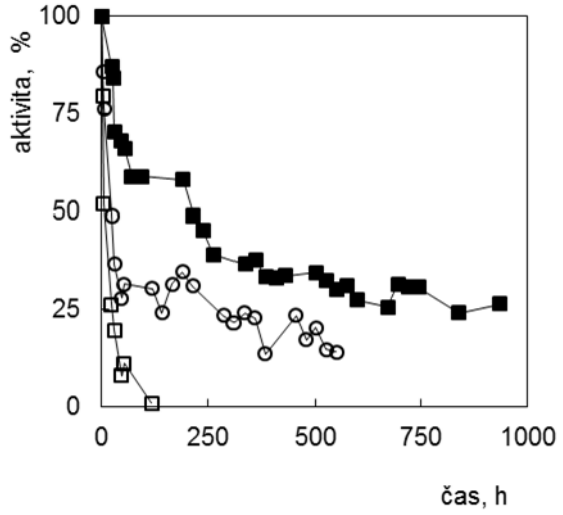
Teplotní optimum enzymu imobilizovaného na PET nosič a Eupergit C zůstalo stejné jako u volného enzymu, a to 60 °C. Imobilizát Sorsilenu měl teplotní optimum při 50 °C. Tato hodnota je však ovlivněna skutečností, že celulolytický komplex imobilizovaný na Sorsilen je při teplotách vyšších než 50 °C nestabilní (viz Tepelná stabilita).

Enzymová kinetika

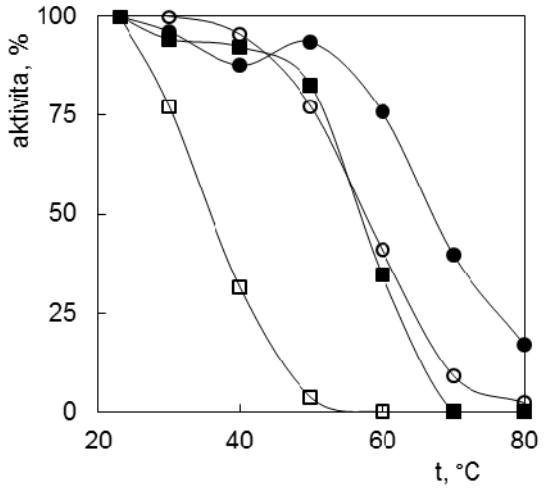
Kinetika imobilizovaných enzymů vykazovala chování podle modelu Michaelise a Mentenové. Po imobilizaci byl pozorován pokles limitních rychlostí u všech preparátů ve srovnání s volným enzymem (tab. I). S největší pravděpodobností byl tento pokles způsoben sterickými zábranami nebo sníženou katalytickou účinností enzymu. Hodnota K_m pro enzym imobilizovaný na PET nosič a Eupergit C se také snížila, což bylo pozorováno i u celulolytického enzymu navázaného na methakrylátový polymerní nosič Eudragit S-100 (cit.[11]).

Způsob účinku

Měřením poklesu viskozity bylo zjištěno, že u volného komplexu enzymů převládalo štěpení substrátu náhod-



Obr. 1. **Srovnání relativní aktivity imobilizátů při kontinuálním použití v koloně.** Podmínky: substrát 0,25 % CMC s průtokem 3,5 ml.h^{-1} při laboratorní teplotě a pH 4,8; ○ PET nosič, ■ Eupergit C, □ Sorsilen



Obr. 2. **Srovnání tepelné stability volného enzymu a imobilizovaných enzymových komplexů.** Podmínky stanovení: 2 h inkubace preparátů při dané teplotě, ochlazení na 25 °C a stanovení aktivity na 1% CMC při 25 °C a pH 4,8; ● volný enzym, ○ PET nosič, ■ Eupergit C, □ Sorsilen

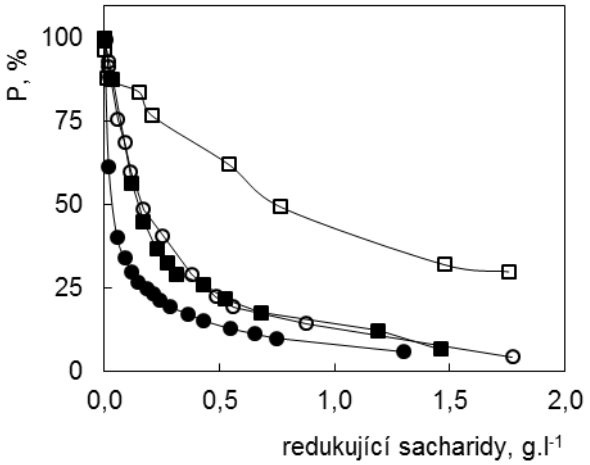
Tabulka I
Hodnoty kinetických konstant

	K_m [g l^{-1}]	v_{lim} [mmol min^{-1} mg^{-1}]
Volný enzym	13,856	103,093
PET nosič	3,123	1,139
Sorsilen	14,165	0,736
Eupergit C	3,076	3,212

ným způsobem, tj. nejdříve se uplatňovaly endoglukanasy a vznikaly nižší oligosacharidy. Dimery a monomery se tvořily až ke konci reakce. Imobilizace na PET nosič ani kovalentní vazba na Eupergit C nezpůsobila výrazné změny ve způsobu degradace polymerního substrátu (obr. 3). Způsob účinku imobilizovaných celulolytických enzymů byl změněn jen v případě adsorpce na Sorsilen, kdy štěpení neprobíhalo náhodně, ale postupovalo podél řetězce molekuly substrátu. K podobnému zjištění dospěla studie imobilizace polygalakturonasového komplexu na Sorsilen[12]. Postupné štěpení bylo potvrzeno i analýzou produktů degradace na tenké vrstvě, kdy u volného enzymu a enzymu imobilizovaného na PET nosič a Eupergit C byly v počátečních fázích reakce detegovány jen oligosacharidy. Monomer a dimer byl detegován jen u hydrolýzy polymerního substrátu enzymem imobilizovaným na Sorsilen.

Závěr

Nosiče z drcených PET lahví a Eupergit C se jeví jako vhodné k imobilizaci celulolytického enzymového komplexu, protože oba mají dobrou operační, skladovací i tepelnou stabilitu a nemění způsob účinku enzymového komplexu. Sorsilen, přestože měl nejvyšší sorpční kapacitu a enzym imobilizovaný na tento nosič vykazoval nejvyšší celkovou aktivitu, se neosvědčil z důvodu nízké operační, skladovací i tepelné stability. Příprava nosiče z odpadních PET lahví je navíc ekonomicky výhodná, a tak by tento imobilizovaný preparát mohl být vhodný i pro průmyslové využití.



Obr. 3. **Závislost poklesu viskozity substrátu na nárůstu koncentrace redukujících skupin během hydrolýzy**. Podmínky stanovení: substrát 0,8% CMC; pH 4,8; 30 °C; ● volný enzym, ○ PET nosič, ■ Eupergit C, □ Sorsilen

LITERATURA

1. Podrepšek, G. H., Primožič M., Knez Ž., Habulin M.: Chem. Eng. Trans. *27*, 235, (2012).
2. Kuhad R. C., Gupta, R., Singh A.: Enzyme Res. *2011*, 1.
3. Sheldon R. A.: Adv. Synth. Catal. *349*, 1289 (2007).
4. Katchalski-Katzir E., Kraemer D. M.: J. Mol. Catal. B: Enzym. *10*, 157 (2000).
5. Gancarz I., Bryjak J., Zynek K.: Appl. Surf. Sci. *255*, 8293 (2009).
6. Omelková J., Zichová M. (Vysoké učení technické v Brně): ÚPV 303640 (2013).
7. Kubánek V., Budín J.: Chem. prům. *26*, 599 (1976).
8. Somogyi M.: J. Biol. Chem. *195*, 19 (1952).
9. Rexová-Benková Ľ., Omelková J., Kubánek V.: Collect. Czech. Chem. Commun. *47*, 2716 (1982).
10. Romo-Sánchez S., Camacho C., Ramirez H. L., Arévalo-Villena M.: Adv. Biosci. Biotechnol. *5*, 517 (2014).
11. Yu Y., Yuan J., Wang Q., Fan X., Wang P.: Appl. Biochem. Biotechnol. *166*, 1433 (2012).
12. Rexová-Benková Ľ., Stratilová E., Kubánek V.: Kvasný Prům. *8*, 177 (1984).

M. Zichová[a], E. Stratilová[b], M. Rosenberg[c], and J. Omelková[a] *([a] Institute of Food Science and Biotechnology, Technical University, Brno, [b] Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava,[c] Institute of Biotechnology and Food Science, Slovak Technical University, Bratislava):* **Immobilization of Cellulolytic Enzymes on Poly(ethylene terephthalate) and Polyacrylamide Carriers**

A cellulolytic complex was immobilized on poly(ethylene terephthalate) (PET) carrier Sorsilen, polyacrylamide carrier Eupergit C and a newly developed carrier from crushed PET bottles. The properties of immobilized enzymes such as pH and temperature optima, thermal stability, storage and operational stability, enzyme kinetics and the mode of action of immobilized enzymes were determined. The results showed that the carrier from crushed PET bottles and Eupergit C seem to be suitable for immobilization of this enzyme complex since both have relatively good operational, storage and thermal stability, and do not change the mode of action of the enzyme complex. The carrier from waste PET bottles is also inexpensive; so the immobilized preparation could be suitable for industrial use.