

Določanje lastnosti tripsina, imobiliziranega na površino membrane iz celuloznega acetata

Properties Determination of Trypsin, Immobilized on the Surface of Cellulosic Acetate Membrane

A. Kranjc¹, Č. Stropnik, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor

Prejem rokopisa - received: 1995-10-04; sprejem za objavo - accepted for publication: 1995-12-22

V prispevku je opisana metoda kovalentne imobilizacije tripsina na površino asimetrične porozne membrane iz celuloznega acetata. Določene so pretočne lastnosti in debeline membrane pred imobilizacijo encima in po njej, aktivnost tripsina v raztopini in lastnosti tripsina v območju pH od 2 do 12. Potek hidrolize površine membrane smo potrdili s primerjavo ATR spektrov pred hidrolizo in po njej. Aktivnost imobiliziranega tripsina smo določili z Anson-ovo metodo in jo primerjali z aktivnostjo tripsina v raztopini.

Ključne besede: imobilizacija, membrana, tripsin, aktivnost

In this paper the method for covalent immobilization of Trypsin on the surface of asymmetric porous membrane from cellulosic acetate is described. Flux properties and thickness of the membranes before and after immobilization have been determined. Activity of the Trypsin in the solution and the properties of the Trypsin in pH range from 2 to 12 have been estimated. Hydrolysis of the surface of membrane has been confirmed by comparison the ATR spectrum before and after hydrolysis. The activity of immobilized Trypsin has been determined by using Anson procedure and it has been compared with the activity of Trypsin in the solution.

Key words: immobilization, membrane, Trypsin, activity

1 Uvod

Imobilizacija je lokalizacija molekul encima v procesu katalize. Poznana je vrsta imobilizacijskih metod^{1,2}, med katerimi je kovalentna vezava eksperimentalno najzahtevnejša.

Imobilizacija tripsina na površino membrane iz celuloznega acetata (CA) poteka v več stopnjah³. Najprej membrano površinsko hidroliziramo z NaOH (slika 1.a), pri tem nastajajo hidroksilne skupine celuloze, ki so sposobne reagirati

z aktivirajočim reagentom. Kot aktivirajoči reagent uporabimo triklortriazin (TCT). Nukleofilna aromatska substitucija hidroksilne skupine z enim klorovim atomom triazinskega obroča poteče v nekaj minutah pri sobni temperaturi (slika 1.b). Zamenjava drugega klorovega atoma poteče le z močnejšimi nukleofili, kot je npr. -NH₂ skupina proteinov (slika 1.c).

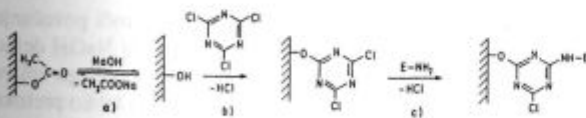
2 Eksperimentalno delo

Imobilizacija tripsina na površino celulozno acetatne membrane

Asimetrično porozno membrano iz celuloznega acetata (CA) smo pripravili z mokrim procesom fazne inverzije⁴ iz raztopine CA (14,8% CA, 63% acetona, 2,3% Mg(ClO₄)₂, 19,9% H₂O). Debelina nanosa je bila 0,25 mm, kot netopilo smo uporabili deionizirano vodo pri sobni temperaturi.

Površino membrane smo 30 minut hidrolizirali z 0,1 M NaOH in jo spirali s 1000 ml deionizirane vode eno uro pri sobni temperaturi. Uspešnost hidrolize smo ugotovili s primerjavo ATR spektrov površine membrane pred hidrolizo in po njej (Perkin-Elmer, model 1600 FT-IR). Nato smo površino membrane kondicionirali s topli padajoče polarnosti; uporabili smo metanol (50 ml, 20 min), butanol (50 ml, 20 min) in benzen (50 ml, 20 min).

Za aktivacijo površine membrane smo uporabili 50 ml nasičene raztopine s-triklorotriazina v benzenu. Aktivacija je po-



Slika 1: Imobilizacija tripsina na površino membrane iz CA:

- hidroliza površine membrane iz CA
- aktivacija površine membrane s TCT
- kovalentna imobilizacija encima

Figure 1: Immobilization of Trypsin on the surface of CA membrane:

- hydrolysis of the surface of CA membrane
- activation of the membrane surface by TCT
- covalent immobilization of the enzyme

¹ Andreja KRANJC, dipl.inž.kem.tehn.
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Univerza v Mariboru
2000 Maribor, Smetanova 17

tekala eno uro pri sobni temperaturi, nato smo membrano ponovno spirali z deionizirano vodo (1000 ml, 120 min, T = 0°C).

Na površino membrane smo ob mešanju nalili 50 ml raztopine tripsina (0,118 g/ 250 ml) v 0,001 M HCl. Reakcijo imobilizacije smo vodili eno uro, nato smo membrano spirali z deionizirano vodo dve uri (1000 ml) in z 0,09% NaCl (6 x 1000 ml) šest dni.

Določitev pretokov in debelin membran

Pretočne lastnosti membrane brez imobiliziranega encima, membrane po hidrolizi z NaOH in membrane po imobilizaciji tripsina smo izmerili v ultrafiltracijski celici (Amicon) z volumnom 350 ml pri tlaku 2 bar.

Izmerili smo tudi debeline membrane po posameznih stopnjah reakcije z merilnikom nemagnetnih prevlek na feromagnetnih podlagah (Seltron HD 1).

Določitev pH odvisnosti aktivnosti topnega tripsina

Za določitev aktivnosti topnega tripsina v odvisnosti od pH raztopine (Anson-ova metoda⁵) smo uporabili naravni substrat kazein. Tripsin razgrajuje kazein na produkte, ki so topni v trikloroacetni kislini in absorbirajo svetlobo pri 280 nm.

Ig kazeina smo raztopili v 100 ml puferne raztopine in segrevali na vreli vodni kopeli 15 minut. Za vrednosti pH od 1,98 do 5,02 smo uporabili pufer Britton in Robinson, za vrednosti pH od 6 do 10 Clark-Lubs-ov in za pH 11 in 12 Kolthoff-ov pufer⁶. K 1 ml raztopine kazeina smo dodali 1 ml raztopine

tripsina v 0,001 M HCl (c = 0,225 mg/ml) in inkubirali 20 minut pri temperaturi 35°C. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 3 ml 5% vodne raztopine trikloroacetne kisline. Nastalo oborino nerazgrajenega kazeina smo po tridesetih minutah odstranili s centrifugiranjem (20 min, 1300 obratov/min). Bistri raztopini smo izmerili absorbanco pri 280 nm (Perkin-Elmer, model 552 UV-VIS).

Določitev aktivnosti topnega tripsina pri optimalni vrednosti pH

Za določitev aktivnosti topnega tripsina pri optimalni vrednosti pH smo uporabili Anson-ovo metodo⁵, opisano zgoraj, le da smo raztopino kazeina pripravili v fosfatnem pufru s pH = 7,6 in da smo k 1 ml raztopine kazeina dodali 1 ml raztopine tripsina različnih koncentracij.

Določitev aktivnosti imobiliziranega tripsina

Aktivnost imobiliziranega encima smo določili z delno modificirano Anson-ovo metodo. K 5 ml raztopine kazeina smo dodali 5 cm² membrane z imobiliziranim tripsinom. Reakcija je tekla dva dni pri 35°C. Pred njeno prekinitevjo smo membrano z vezanim encimom odstranili iz reakcijske zmesi.

3 Rezultati in diskusija

Hidroliza površine membrane je prva stopnja imobilizacije tripsina, zato je pomembno, da poteče v zadostnem obsegu. Reakcijo smo potrdili s primerjavo ATR spektrov površine CA membrane pred hidrolizo in po njej, prikazanih na **sliki 2**.

Pojavljanje karakterističnega traku -OH skupine pri 3371,6 cm⁻¹ je dokaz, da je hidroliza potekla.

Primerjava pretočnih lastnosti in debelin nemodificirane membrane, membrane po hidrolizi in membrane po imobilizaciji je podana v **tabeli 1**.

Tabela 1: Primerjava pretokov in debelin membran
Table 1: Comparison of the flux and thickness of the membranes

membrana	debelina (l/m ² h)	debelina (μm)
nemodificirana	28,9	78,8
po hidrolizi	100,0	53,0
po imobilizaciji	95,2	65,7

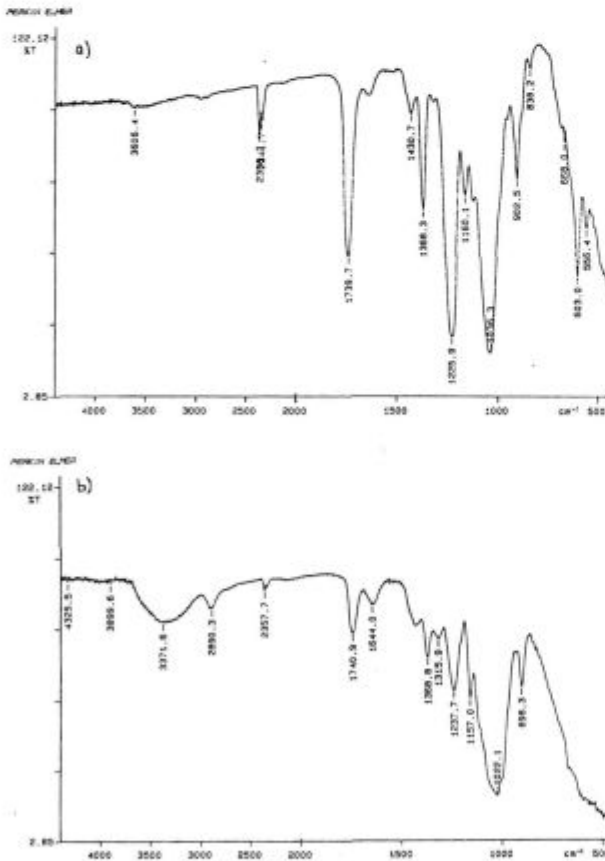
Hidroliza površine membrane z NaOH povzroči povečanje pretokov skozi membrano in njeno stanjšanje, saj NaOH delno raztaplja CA. Proces imobilizacije tripsina nima večjega vpliva na pretočne lastnosti in debelino membrane, zato lahko preteko skozi membrano zmanjšamo s skrajšanjem časa hidrolize.

Rezultati določitve pH odvisnosti aktivnosti tripsina so prikazani na **sliki 3**.

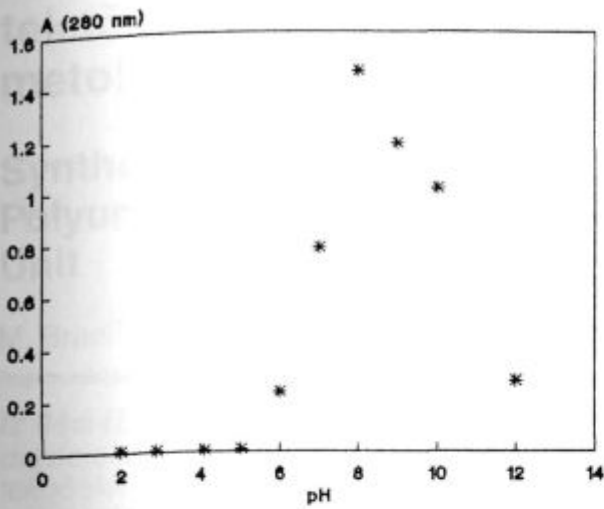
Ugotovili smo, da leži pH optimum delovanja tripsina med 7 in 8, kar se ujema s podatki iz literature⁷. Pri optimalni vrednosti pH smo določili aktivnost tripsina v raztopini iz umeritvene krivulje, prikazane na **sliki 4**, z ekstrapolacijo vrednosti na začetno hitrost reakcije.

Iz **slike 4** izračunamo, da 1 mg tripsina vsebuje 0,4 TU^{Cas} aktivnostnih enot.

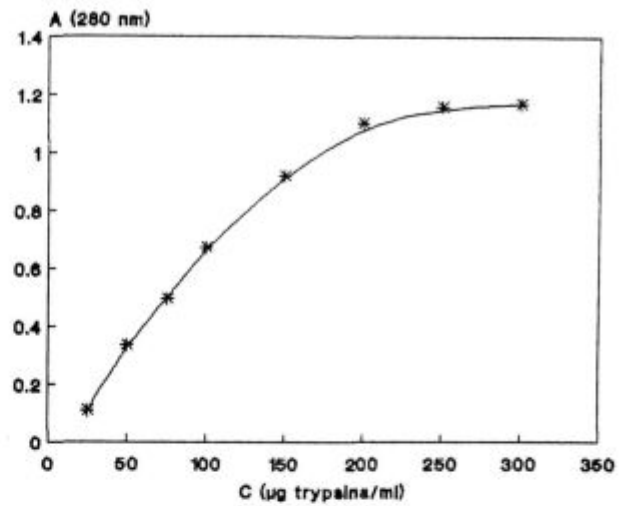
Iz meritev aktivnosti imobiliziranega tripsina smo ugotovili, da je tripsin, imobiliziran na 5 cm² površine membrane iz CA, enako aktiven kot 0,56 μm tripsina v raztopini.



Slika 2: ATR spektri: a) nemodificirana membrana b) membrana po hidrolizi
Figure 2: ATR spectra: a) unmodified membrane b) membrane after hydrolysis



Slika 3: Aktivnost tripsina v odvisnosti od pH
Figure 3: Activity of the Trypsin as a function of pH



Slika 4: Umeritvena krivulja za določitev aktivnosti tripsina
Figure 4: Calibration curve for activity determination of Trypsin

4 Literatura

- ¹ O. Zaborisky: *Immobilized Enzymes*, CTR Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1973
- ² R. A. Messing: *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, Academic Press, New York, 1975
- ³ G. Kay, E. M. Crook: Coupling of enzymes to cellulose using chloro-s-triazines, *Nature*, 216, 1967, 524

- ⁴ D. Podvršnik: *Fazno inverzne membrane iz celuloznega acetata*, Magistrsko delo, Ljubljana, 1991
- ⁵ H. U. Bergmeyer, K. Gawehn: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie Weinheim, 1975, 1056
- ⁶ *Laboratorijski priručnik*, SKD, Ljubljana, 1967
- ⁷ P. D. Boyer, *The Enzymes*, Academic Press, New York, 1970