

Imobilizacija tripsina na površino membrane iz celuloznega acetata

Immobilization of Trypsin on the Surface of Cellulosic Acetate Membranes

A. Bezjak, Č. Stropnik, Tehniška fakulteta, Oddelek za kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru.

Poznana je vrsta metod imobilizacije encimov na trdne nosilce. Opisana metoda temelji na kovalentni vezavi tripsina na površino porozne membrane iz celuloznega acetata. Izvedena je korelacija med pretočnimi lastnostmi in debelino membran brez imobiliziranega encima in membran, na katere smo imobilizirali encim. Količino vezanega encima kot beljakovine smo določili z Lowry-jevo metodo, z uporabo Anson-ove metode pa smo poskušali določiti aktivnost imobiliziranega encima.

Ključne besede: membrana, aktivacija, imobilizacija, aktivnost encima

Many methods of the enzyme immobilization have been reported. In this paper described method is based on the formation of covalent linkage between the trypsin and the surface of cellulosic acetate porous membrane. Corelation between the flux properties and thickness of the membranes before and after immobilization of the trypsin was made. For determination of the quantity of the immobilized trypsin Lowry procedure was used; we tried to determine the activity of the immobilized trypsin by using the Anson procedure.

Key words: membrane, activation, immobilization, activity of the trypsin

1 Uvod

Imobilizacija je lokalizacija molekul encima v času kontinuirnega procesa katalize^{1,2}. Uporaba imobiliziranih encimov kaže vrsto prednosti pred uporabo v vodi topnih encimov:

- 1) lahko jih brez ponovnega čiščenja večkrat uporabimo
- 2) ne onesnažujejo produktov bioreakcij
- 3) kažejo večjo obstojnost v širšem območju temperature in pH
- 4) običajno so manj občutljivi na delovanje aktivatorjev in inhibitorjev.

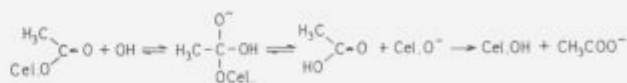
Poznamo veliko različnih metod imobilizacije encimov, ki jih v splošnem klasificiramo na fizikalne in kemijske.

2 Eksperimentalni del

Pripravili smo homogeno raztopino iz 14,8 g celuloznega acetata (CA) (Aldrich-Chemie, deklarirana vsebnost acetilnih skupin je 39,8%) v 63,0 g acetona (Fluka), po osmih urah mešanja pa smo dodali raztopino 2,3 g Mg(ClO₄)₂ (Kemika) v 19,9 ml vode. Membrano smo izdelali s procesom fazne inverzije.

Membrani iz CA smo izmerili pretok deionizirane vode in debelino: $J_v = 28,9 \text{ l/m}^2 \text{ h}$, $d = 78,8 \text{ } \mu\text{m}$.

Tako pripravljeno membrano smo na površini hidrolizirali z uporabo NaOH različnih koncentracij (0,1; 0,5 in 1,0 mol/l).

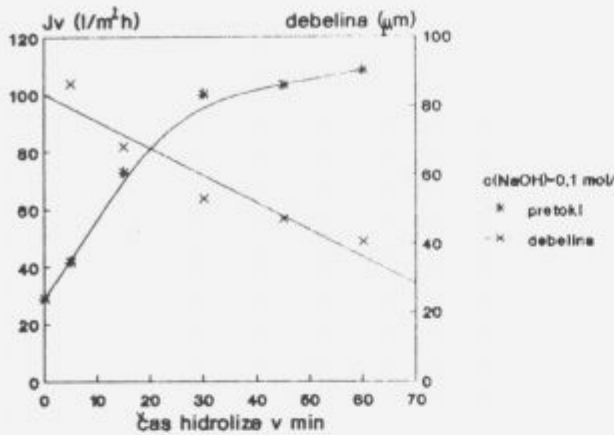


Shema 1: Bazično katalizirana hidroliza celuloznega acetata.

Scheme 1: Basic catalysed hydrolysis of cellulose acetate.

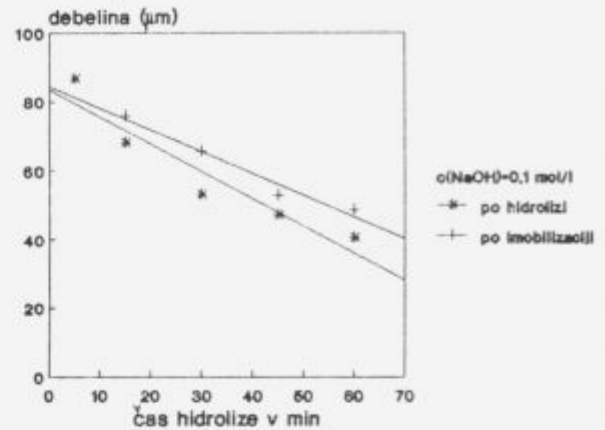
Hidroliza membrane je povzročila povečanje pretokov deionizirane vode in tanjšanje debeline membrane, kar potrjuje, da NaOH delno raztaplja membrano.

Za aktivacijo površinsko hidrolizirane membrane iz CA smo uporabili TCT^{2,3} (1,3,5-triklortriazin, Merck), ki je pogosto uporabljen reagent. Na hidrolizirano membrano smo nalili nasičeno raztopino TCT v benzenu, ki onemogoča hidrolizo TCT. Pri tej nukleofilni aromatski substituciji je potekla zamenjava enega klorovega atoma triazinskega obroča s hidroksilno skupino na celulozi. Reakcija aktivacije membrane je potekala 1 min, nato smo (po spiranju z benzenom) imobilizirali tripsin (Difco): 20 ml vodne raz-



Slika 1: Odvisnost pretokov deionizirane vode in debelin membrane od časa hidrolize, $C(\text{NaOH}) = 0.1 \text{ mol/l}$.

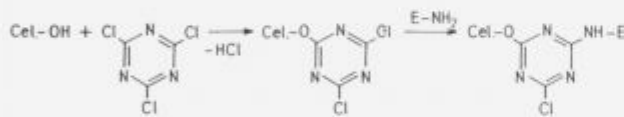
Figure 1: The deionised water fluxes and thicknesses of the membrane as a function of hydrolysis time, $C(\text{NaOH}) = 0.1 \text{ mol/l}$.



Slika 2: Primerjava debeline membran po hidrolizi in po imobilizaciji.

Figure 2: Comparison of the membranes thickness after the hydrolysis and after the immobilization.

topine tripsina (2,5 g/100 ml) smo nalili na membrano. Reakcija je potekala 10 min, nato smo membrano spirali z deionizirano vodo. Na shemi 2 predstavlja E-NH_2 tripsin z aktivno amino skupino na proteinskem delu encima (E), preko katere lahko poteka imobilizacija.



Shema 2: Reakcija aktivacije membrane in imobilizacije tripsina.

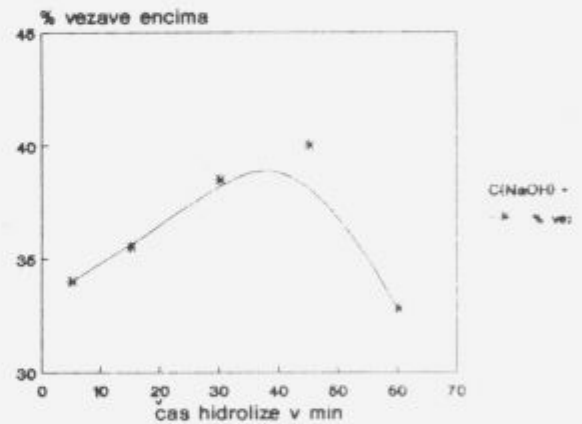
Scheme 2: Activation of the membrane surface and trypsin immobilization.

Imobilizacija encima povzroči povečanje debeline membrane.

Določitev količine vezanega encima kot beljakovine: Uporabili smo Lowry-jevo metodo^{4,5}, po kateri količino proteina določimo spektrofotometrično. Metoda temelji na določanju količine aminokislin, saj dajeta L-triptofan in L-tirozin s Folin-Ciocalteu-ovim fenolnim reagentom (Kemika) modro obarvane komplekse. Absorbanco smo merili na aparatu Specol 10 pri 600 nm. Količino vezanega encima kot beljakovine smo v odvisnosti od časa hidrolize določili iz umeritvene krivulje.

Določitev aktivnosti imobiliziranega tripsina:

Za določitev aktivnosti imobiliziranega tripsina smo uporabili Anson-ovo metodo^{6,7}. Tripsin razgrajuje kazein (Merck) na produkte, ki so topni v trikloroacetni kislini in absorbirajo svetlobo pri 280 nm. Umeritveno krivuljo smo pripravili tako, da je reakcija med kazeinom (1 g kazeina/100 ml fosfatnega pufra, $\text{pH}=7,6$) in vodno raztopino tripsina

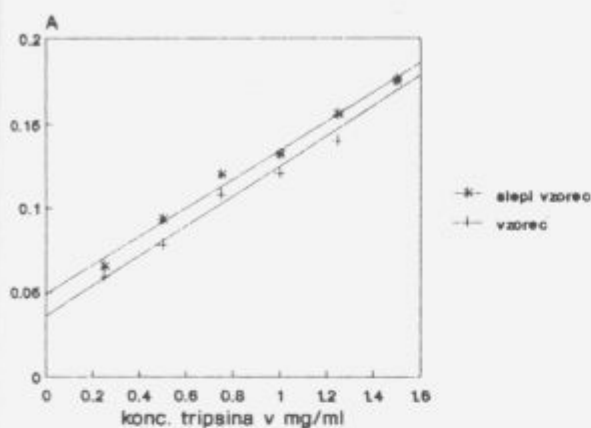


Slika 3: Odstotek vezanega encima kot beljakovine v odvisnosti od časa hidrolize.

Figure 3: Per cent of immobilized protein as a function of hydrolysis time.

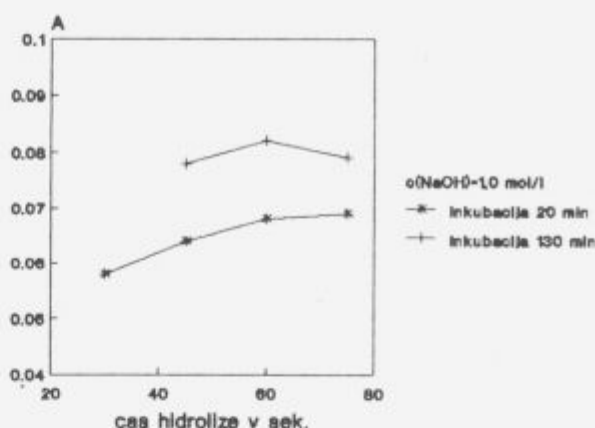
(različne koncentracije) potekala 20 minut pri temperaturi 35°C in smo jo prekinili z dodatkom trikloroacetne kisline. S centrifugiranjem smo odstranili nerazgrajen kazein, raztopini pa izmerili absorbanco pri 280 nm; ker so bile vrednosti absorbanco za slepi vzorec višje kot za vzorec, smo posneli UV-VIS spekter.

Poskušali smo določiti aktivnost imobiliziranega encima. Pri reakciji med kazeinom in na površino CA membrane imobiliziranim tripsinom, ki smo jo vodili 20 min, so imele izmerjene vrednosti absorbanco nižjo vrednost od slepega vzorca. S podaljšanjem časa reakcije na 130 min so se izmerjene vrednosti absorbanco povišale,



Slika 4: Umeritvena krivulja za določitev aktivnosti tripsina, imobiliziranega na površino membrane.

Figure 4: The calibration curve for determination the activity of on the membrane surface immobilized trypsin.



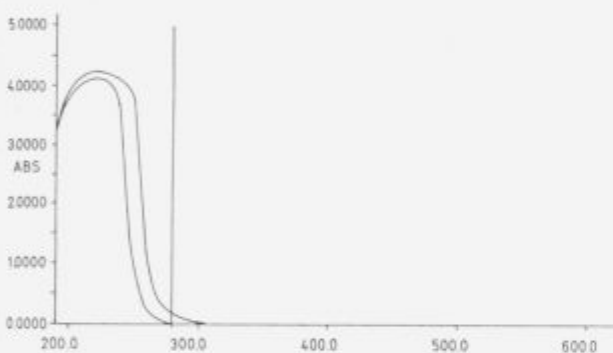
Slika 6: Vpliv podaljšanja časa inkubacije.

Figure 6: Influence of the incubating time extension.

liziranega encima nismo mogli določiti, zato predpostavljamo, da opisana metoda za naš primer ni dovolj občutljiva.

4 Literatura

- O. Zaborzky: Immobilized Enzymes, CRT Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1973)
- R.A. Messing: Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, Academic Press, New York (1975)
- G. Kay, E.M. Crook: Coupling of enzymes to cellulose using chloro-S-triazines, Nature, 216 (1967) 524
- O. Folin, V. Ciocalteu: On Tyrosine and Tryptophane determinations in proteins, J. Biol. Chem., 73 (1927) 627
- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265
- M.L. Anson: The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin, J. Gen. Physiol. 22 (1939) 79,
- Bergmeyer H.U., Gawehn K.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie Weinheim, (1975) 1056.



Slika 5: UV-VIS spekter v trikloroacetni kislini topnih produktov reakcije med kazeinom in tripsinom.

Figure 5: UV-VIS spectra in trichloroacetic acid soluble products of reaction between casein and trypsin.

vendar še vedno niso bile primerne za izračun proteolitske aktivnosti encima. Po spiranju z 0,9% raztopino NaCl so bile izmerjene vrednosti absorbance še nižje.

3 Zaključki

Ugotovili smo, da je proces imobilizacije v stopnji hidrolize povzročil tanjšanje membrane in s tem zmanjšanje njene mehanske odpornosti, kar omejuje uporabnost membrane. Glede na določitev količine vezanega encima kot beljakovine smo ugotovili, da je optimalni čas hidrolize pri uporabi 0,1 M NaOH 30 do 45 min, 0,5 M NaOH 3 min in pri 1,0 M NaOH 1,5 min. Iz UV-VIS spektra (slika 5) je razvidno, da je razlika v absorbanci pri 280 nm (ki je v sredini med vrednostjo nič in maksimalno vrednost pri 250 nm) med slepim vzorcem in vzorcem zelo majhna. Ta razlika popolnoma izgine pri 250 nm. Aktivnosti imobi-