

Optimiranje pogojev za imobilizacijo tripsina na površino membrane iz celuloznega acetata

Optimization of Terms for the Immobilization of Trypsin on the Surface of Cellulosic Acetate Membrane

Bezjak A.¹, Č. Stropnik, Tehniška fakulteta, Oddelek za kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

V prispevku opisana metoda imobilizacije tripsina temelji na nastanku kovalentne vezi med tripsinom in celulozno acetatno membrano, ki je površinsko aktivirana. Podrobno je raziskana aktivacija membrane s triklorotriazinom, ki je odločilna za uspešnost imobilizacije.

Ključne besede: aktivacija, imobilizacija, tripsin, aktivnost

In the paper described method of trypsin immobilization is based on the formation of the covalent bond between the trypsin and the cellulosic acetate membrane which is activated on the surface. The activation of the membrane with trichlorotriazine which is decisive for efficiency of the immobilization has been investigated in details.

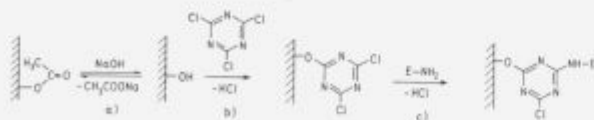
Key words: activation, immobilization, trypsin, activity

1. Uvod

Kovalentna imobilizacija encimov na trdne nosilce^{1,2} je eksperimentalno ena izmed zahtevnejših imobilizacijskih metod, saj poteka v več stopnjah. Nosilec moramo za vezavo encima aktivirati, za kar uporabljamo aktivirajoče reagente, ki morajo biti sposobni reagirati s funkcionalnimi skupinami nosilca in encima. Izbira aktivirajočega reagenta in potek aktivacije nosilca za vezavo encima je korak, ki odločilno vpliva na uspešnost imobilizacije. Kovalentna vezava encima na aktivirani nosilec poteka preko funkcionalnih skupin encima popolnoma naključno; med imobilizacijskim postopkom zato pogosto pride do deaktivacije encima, ki je posledica poškodbe aktivnega mesta ali spremembe terciarne (kvarterne) strukture encima. Optimiranje eksperimentalnih pogojev vseh stopenj imobilizacijskega postopka omogoča znižanje deaktivacije encima.

2. Teoretični del

Celoten postopek imobilizacije tripsina na površino membrane celuloznega acetata (CA) poteka v treh stopnjah, kot je prikazano na sliki 1.

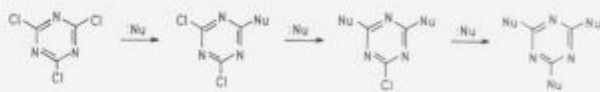


Slika 1: Imobilizacija tripsina na površino membrane iz CA:
 a) hidroliza površine membrane iz CA,
 b) aktivacija površine membrane s triklorotriazinom (TCT),
 c) kovalentna imobilizacija encima na površino membrane.

Figure 1: Immobilization of Trypsin on the surface of CA membrane:
 a) hydrolysis of the surface of CA membrane,
 b) activation of the membrane surface by trichlorotriazine (TCT),
 c) covalent immobilization of enzyme on the membrane surface.

¹Andreja BEZJAK, dipl. inž. kem. tehn. Fakulteta za kemijo in kem. tehn. Smetanova ul. 17, 62000 Maribor

Membrano iz CA je potrebno površinsko hidrolizirati z NaOH (slika 1.a); produkt reakcije so hidroksilne skupine celuloze na površini membrane, ki so sposobne reagirati z aktivirajočim reagentom. Kot aktivirajoči reagent uporabimo triklorotriazin³ (TCT), ki je zaradi ugodnega položaja treh dušikovih atomov v s-triazinskem obroču močno reaktiven. Dušikovi atomi povzročajo zaradi svoje elektronegativnosti pomanjkanje elektronov na ogljikovih atomih triazinskega obroča, dodatno pomanjkanje elektronov pa je posledica prisotnosti klorovih atomov, ki polarizirajo C-Cl vez. Primankljaj elektronov na ogljikovih atomih omogoča nukleofilno aromatsko substitucijo klorovih atomov s skoraj vsemi nukleofili. Večina substitucijskih reakcij poteka stopenjsko, kar omogoča izolacijo mono-, di- ali tri- substituiranih produktov, kot prikazuje slika 2.



Slika 2: Nukleofilna aromatska substitucija TCT-ja
Figure 2: Nucleophilic aromatic substitution of TCT

Znano je⁴, da poteče reakcija med hidroksilnimi skupinami na celulozi in enim klorovim atomom na triazininskem obroču (slika 1b) v nekaj minutah pri sobni temperaturi. Le močnejši nukleofili, kot npr. $-\text{NH}_2$ skupine proteinov, lahko nato reagirajo z drugim klorovim atomom (slika 1c) v vodni raztopini pri sobni temperaturi; pri nekoliko višjih temperaturah poteče reakcija tudi s tretjim klorovim atomom.

3. Eksperimentalni del

3.1. Določitev aktivnosti tripsina v raztopini

Za določitev proteolitske aktivnosti tripsina smo uporabili naravni substrat kazein. Metoda⁵ temelji na dejstvu, da tripsin razgrajuje kazein na produkte, ki so topni v trikloroacetni kislini in absorbirajo svetlobo valovne dolžine 280 nm.

Priprava raztopine substrata: 1 g kazeina (Merck, Casein acc. to Hammarsten) smo raztopili v 100 ml fosfatnega pufru (0.157 g KH_2PO_4 in 1.575 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x2\text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 100 ml bidestilirane vode, $\text{pH}=7.6$) in segrevali na vreli vodni kopeli približno 15 minut, dokler ni bil kazein popolnoma raztopljen.

K 1 ml substrata smo dodali 1 ml raztopine tripsina (Serva, $M=23800$ g/mol) različnih koncentracij v 0.001M HCl 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 ($t=20$ min, 13000 obratov/min). Bistri raztopini smo izmerili absorbanco pri 280 nm.

3.2. Optimiranje pogojev imobilizacije tripsina na površino membrane iz celuloznega acetata (CA)

Asimetrično porozno membrano iz raztopine CA (14.8 g CA, 63.0 g acetona, 2.3 g $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, 19.9 ml vode) smo pripravili s procesom fazne inverzije (debelina nanosa 0.25 nm, netopilo čista deionizirana voda).

Za določitev optimalnih pogojev imobilizacije smo izvedli štiri različne imobilizacijske postopke.

Postopek 1: površine membran iz CA smo hidrolizirali 5, 15 in 30 minut z 0.1M NaOH. Spirali smo jih eno uro z deionizirano vodo (1000 ml) in z benzenom (500 ml). Za aktivacijo membran smo uporabili 50 ml nasičene raztopine triklorotriazina (TCT) v benzenu. Aktivacija je potekala eno uro pri sobni temperaturi: nato smo membrane ponovno spirali deset ur z benzenom (500 ml) in eno uro z deionizirano vodo (1000 ml) pri 0°C . 0.188 g tripsina smo raztopili v 250 ml 0.001M HCl, reakcijo imobilizacije (slika 1c) pa smo vodili s 50 ml raztopine tripsina eno uro. Po imobilizaciji smo membrane spirali z deionizirano vodo dve uri (1000 ml) in z 0.09% raztopino NaCl (6×1000 ml) šest dni, s čimer smo odstranili na površino membrane adsorbiran tripsin.

Reakcije hidrolize, aktivacije in imobilizacije smo vodili na membranah iz CA, ki so bile napete preko dna odprtega steklenega valja; spiranje membran smo izvajali v kristalizirkih z volumnom 1000 ml.

Postopek 2: membrane z imobiliziranim encimom smo pripravili tako kot v postopku 1, le da smo reakcije izvajali pri tlaku 4 bar v ultrafiltracijski celici ob močnem mešanju.

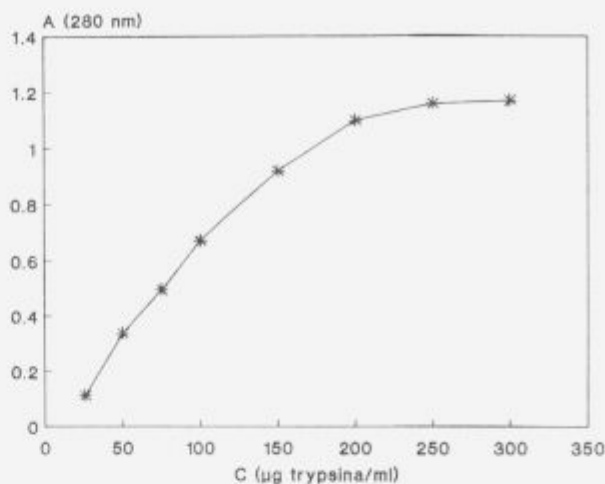
Postopek 3: delali smo enako kot pri postopku 1, le da smo membrane pred aktivacijo s TCT spirali s toplimi padajoče polarosti (prehod iz vodnega na nevodni medij) v vrstnem redu metanol (50 ml, 20 min), butanol (50 ml, 20 ml), benzen (50 ml, 20 min). Po aktivaciji smo spirali površine membran s toplimi naraščajoče polarosti v vrstnem redu butanol, metanol, voda. Izbrana topila se med seboj mešajo.

Postopek 4: je enak postopku 3, le da membran po aktivaciji nismo spirali z alkoholi, temveč takoj z deionizirano vodo dve uri pri 0°C .

Aktivnost imobiliziranega tripsina smo določili z zgoraj opisano metodo. Reakcija med substratom in imobiliziranim tripsinom je potekala na fazni meji tekoče-trdno, zato smo povečali količino substrata (5 ml) in podaljšali čas inkubacije (ena ura, dva dni).

4. Rezultati in diskusija

Slika 3 prikazuje meritve absorbanco v odvisnosti od koncentracije tripsina v raztopini.



Slika 3: Odvisnost absorbanco ($\lambda=280$ nm) od koncentracije tripsina
Figure 3: Absorbance ($\lambda=280$ nm) as a function of Trypsin concentration

Iz slike 3 je razvidno, da med absorbanco in koncentracijo tripsina ni linearne zveze, zato moramo za izračun aktivnosti tripsina vrednosti ekstrapolirati na začetno hitrost reakcije.

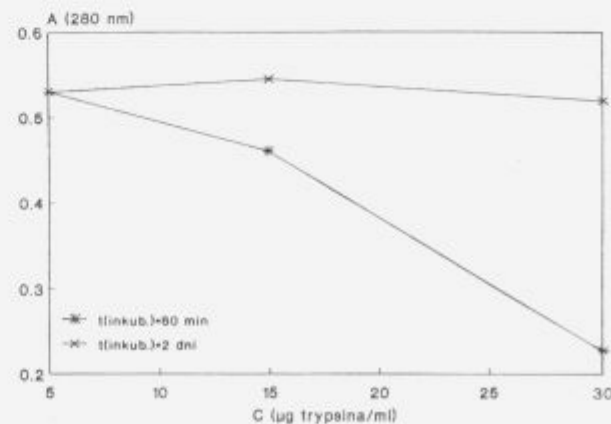
Ena tripsinska enota (TU^{Cas}) je definirana kot količina tripsina, ki pod opisanimi pogoji (čas reakcije je 20 min, $T=35^\circ\text{C}$, $V=2$ ml) razkroji toliko kazeina, da naraste absorbanca pri 280 nm v eni minuti na vrednost 1.000.

Iz slike 3 izračunamo:

$$\begin{aligned} \frac{\text{TU}^{\text{Cas}}}{\mu\text{g (trip.)}} &= \frac{\Delta E_{280\text{nm}} / 20 \text{ min}}{(\mu\text{g (trip.)} / \text{ml}) \cdot 20 \text{ min}} = \\ &= \frac{0,4}{50 \cdot 20} = 0,4 \cdot 10^{-3} \end{aligned}$$

1 mg trgovskega tripsina vsebuje 0.4 TU^{Cas} aktivnostnih enot.

Encim, imobiliziran po postopku 1 in 3, ne kaže aktivnosti, pri encimu, imobiliziranem po postopku 2, zasledimo aktivnost, ki je zelo nizka in je lahko v okviru eksperimentalne napake. Visoko aktivnost tripsina zasledimo le v primeru, če imobilizacijo izvedemo po postopku 4. Slika 4 prikazuje odvisnost absorbanco pri 280 nm od časa hidrolize za postopek 4.



Slika 4: Odvisnost absorbanco ($\lambda=280$ nm) od časa hidrolize membrane
Figure 4: Absorbance ($\lambda=280$ nm) as a function of hydrolysis time

Domnevamo, da daljši čas hidrolize CA povzroči večjo poroznost površine membrane in da se v tem primeru tripsin imobilizira tudi v pore membrane. Z daljšanjem kontaktnega časa med tripsinom in kazeinom lahko pri reakciji sodeluje tudi tripsin, ki je imobiliziran v porah membrane (slika 4).

Iz primerjave rezultatov in postopkov imobilizacije je razvidno, da je za uspešnost imobilizacije ključnega pomena reakcija aktivacije membrane s TCT. Spiranje membran s topli padajoče polarosti do benzena (postopek 4) povzroči omočitev površine membrane z benzenom in s tem lažji dostop TCT do površine membrane. Koncentracija TCT-na ob površini membrane je bila pri postopku 1 zelo nizka zaradi slabe topnosti TCT-ja v vodi. V vodnem filmu lahko poteče tudi hidroliza TCT-ja, kar še dodatno zniža njegovo reaktivnost za reakcijo s hidroksilnimi skupinami na membrani. Uporaba tlaka in močnega mešanja v postopku 2 je povzročila tanjšanje vodnega filma ob površini membrane, zato smo pri tem postopku zasledili aktivnost tripsina, ki pa je bila zelo nizka. Spiranje že aktivirane membrane z alkoholi (postopek 3) je povzročilo alkoholizo TCT-ja in zato reakcija vezave encima ni mogla poteči.

5. Zaključki

Na površino membrane iz CA smo kovalentno imobilizirali tripsin. TCT je kot aktivirajoči reagent zelo reaktiven z nukleofili, zato je imobilizacijo potrebno izvesti takoj po vezavi TCT-ja na membrano. Kondicioniranje membrane z alkoholi pri prehodu nazaj na vodni medij povzroči alkoholizo vezanega TCT-ja. Učinkovito je že spiranje z ledeno mrzlo vodo.

6. Literatura

- ¹ O. Zaborsky: *Immobilized Enzymes*, CTR Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1973
- ² A. Wiseman: *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Halsted Press, John Wiley and Sons, Chichester, England, 1985
- ³ W. F. Beech: *Fibre-Reactive Dyes*, Logos Press Ltd., London, 1970
- ⁴ G. Kay, E. M. Crook: Coupling of enzymes to cellulose using chloro-s-triazines, *Nature*, 216, 1967, 524
- ⁵ H. U. Bergmeyer, K. Gawehn: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie Weinheim, 1975, 1056
- ⁶ D. Podvršnik: *Fazno inverzne membrane iz celuloznega acetata*, Magistrsko delo, Ljubljana, 1991