

Charakterystyka aktywności katalitycznej acylazy penicylinowej w formie wolnej i stabilizowanej

Jolanta Bryjak

Andrzej Noworyta

Instytut Inżynierii Chemicznej

Politechnika Wrocławska

Wstęp

Głównymi celami immobilizacji jest umożliwienie wielokrotnego użycia enzymu, zwiększenie jego trwałości oraz ułatwienie rozdzielania mieszaniny poreakcyjnej od biokatalizatora. Duże zapotrzebowanie na immobilizowane enzymy spowodowało, że obecnie znanych jest ponad 100 różnych technik immobilizacji. O wyborze danej metody decyduje stabilność enzymatyczna białka oraz wymogi procesowe (temperatura, pH, ciśnienie, siła jonowa).

W przedstawianej pracy do badań użyto acylazę penicylinową (AP) (E.C. 3.5.1.11), enzym preferencyjnie hydrolizujący benzylpenicylinę (penicylinę G) do kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA) i kwasu fenyllooctowego (PhAA). Z kolei 6-APA jest wyjściowym substratem do otrzymywania szeregu półsyntetycznych antybiotyków β -laktamowych. Optimum temperatury dla tego enzymu wynosi 45 – 55°C, ale ze względu na niestabilność enzymu i substratu w tych warunkach zaleca się stosowanie temperatury 37°C (1,2). Acylaza penicylinowa w środowisku zasadowym (pH 7,5 – 8,5) katalizuje reakcję hydrolizy penicylin, natomiast w środowisku kwaśnym (pH 4,0 – 5,0) reakcję syntezy (3,4). W odpowiednim optimum pH reakcje te są nierównowagowe. Reakcja hydrolizy PG jest hamowana przez substrat oraz oba produkty reakcji, przy czym 6-APA jest inhibitorem niekompetycyjnym, a kwas fenyllooctowy kompetycyjnym AP (5,6).

Materiały i metody

Materiały

Acylazę penicylinową, penicylinę G i kwas 6-aminopenicylanowy otrzymano z Tarchomińskich Zakładów Farmaceutycznych Polfa w Warszawie. Pozostałe odczynniki, czyste do analiz, zakupiono w firmie Sigma lub POCh.

Metody

Oznaczanie aktywności enzymatycznej

Oznaczanie aktywności acylazy penicylinowej polegało na przeprowadzeniu enzymatycznego rozkładu penicyliny G (20 mM) w czasie 20 min, w temperaturze 37°C oraz w pH 7,8; a następnie na oznaczeniu kolorymetrycznym ilości powstałego 6-APA w kompleksie z aldehydem p-dimetyloaminobenzoesowym (7). Za 1 jednostkę aktywności (IU) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje powstanie 1 μ moła 6-APA w czasie 1 min w warunkach reakcji.

Immobilizacja i stabilizacja enzymu

Enzym wiązano z nośnikiem poprzez aldehyd glutarowy według metodyki już opisanej (8,9). Jako nośnik użyto kopolimer akrylanu butylu (60%) i dimetakrylanu glikolu etylenowego (40%) modyfikowany etylenodiaminą.

Do stabilizacji enzymu poprzez dodanie polimeru rozpuszczalnego w wodzie użyto poli(etylenoiminy) według metodyki już opisanej (10).

Do badań użyto preparaty enzymatyczne oraz enzym wolny o aktywnościach od 0,063 do 0,8 IU w 1cm³ roztworu.

Charakterystyka preparatów enzymatycznych

Trwałość enzymu wolnego i stabilizowanego badano pobierając próbki preparatów przechowywanych w 4°C w czasie od 0 do 100 dni.

Wpływ temperatury na trwałość i aktywność preparatów badano w zakresie temperatur od 4 do 70°C.

Wpływ wartości pH na aktywność i trwałość preparatów badano w zakresie pH od 1 do 12.

Wyznaczanie obszaru reakcji

Do określenia obszaru przebiegu reakcji wykorzystano kryterium temperaturowe. Do enzymu natywnego lub stabilizowanego dodawano roztwór substratu w buforze i reakcję prowadzono w pH-statowanym reaktorze okresowym w różnych temperaturach (od 4 do 50°C).

Wyznaczanie stałych równania kinetycznego

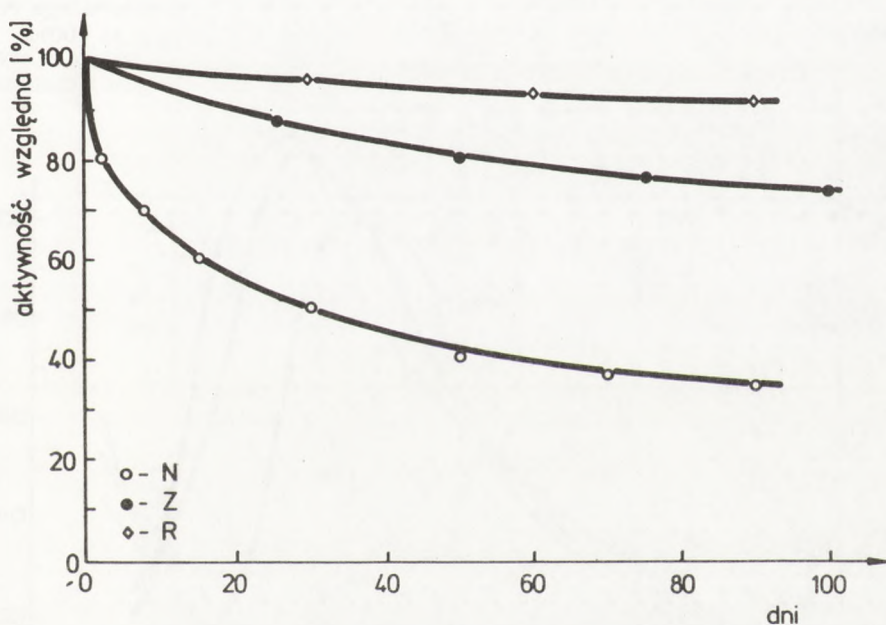
Badania kinetyki reakcji hydrolizy PG prowadzono w termostatowanym reaktorze okresowym, wyposażonym w mieszadło i pH-stat. Reakcję prowadzono do momentu wyczerpania się substratu, stosując różne stężenia preparatów enzymatycznych (od 60 do 1000 g/m³) oraz różne początkowe stężenia substratu (od 1 do 80 mM).

Wyniki i ich omówienie

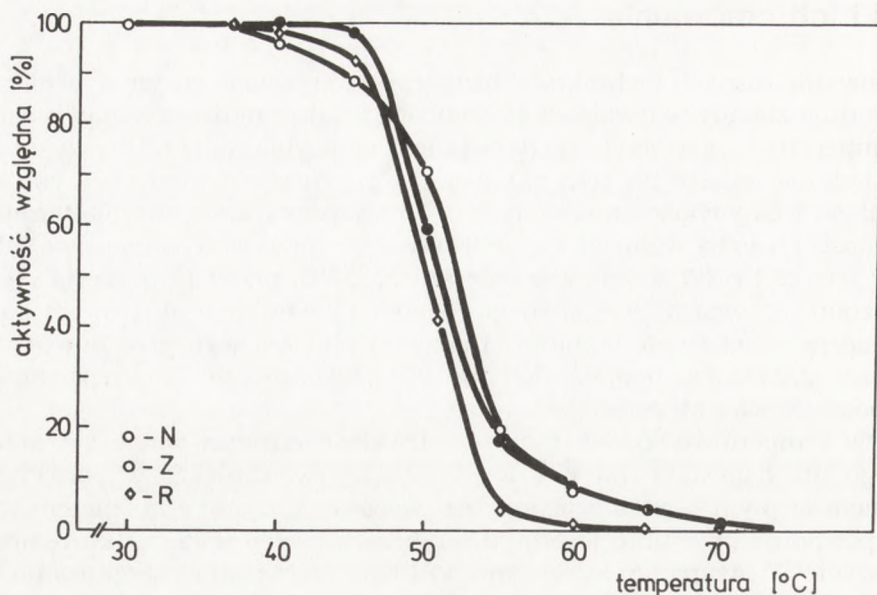
Stosowanie różnych technik stabilizujących aktywność enzymatyczną zwykle powoduje zmiany w trwałości aktywności, a także może zmieniać wartości pH i temperatury, w których aktywność jest maksymalna (11,12). Wykonano zatem badania mające na celu określenie wpływu wymienionych czynników na trwałość i aktywność stosowanych w pracy preparatów enzymatycznych.

Trwałość enzymu wolnego i stabilizowanego, przechowywanego w 0,1 M buforze Tris-HCl pH 7,8 oraz w temperaturze 37°C, przedstawiono na rys. 1. Stwierdzono, że związanie aktywnego białka z nośnikiem akrylowym powoduje znaczne zwiększenie stabilności enzymu podczas jego przechowywania. Natomiast stabilizacja poprzez dodanie PEI powoduje, że enzym zachowuje swoją początkową aktywność.

Wpływ temperatury na aktywność i trwałość enzymu wolnego i stabilizowanego przedstawiono na rys. 2 i 3. Zaobserwowano, że w porównaniu z enzymem wolnym — stabilizacja przez związanie enzymu z nośnikiem akrylowym powoduje przesunięcie profilu temperaturowego w kierunku temperatur niższych. W przypadku stosowania PEI jako stabilizatora zanotowano niewielkie przesunięcie profilu w kierunku temperatur wyższych. Zjawiska te należy wiązać z trwałością III-rzędowej struktury białek.

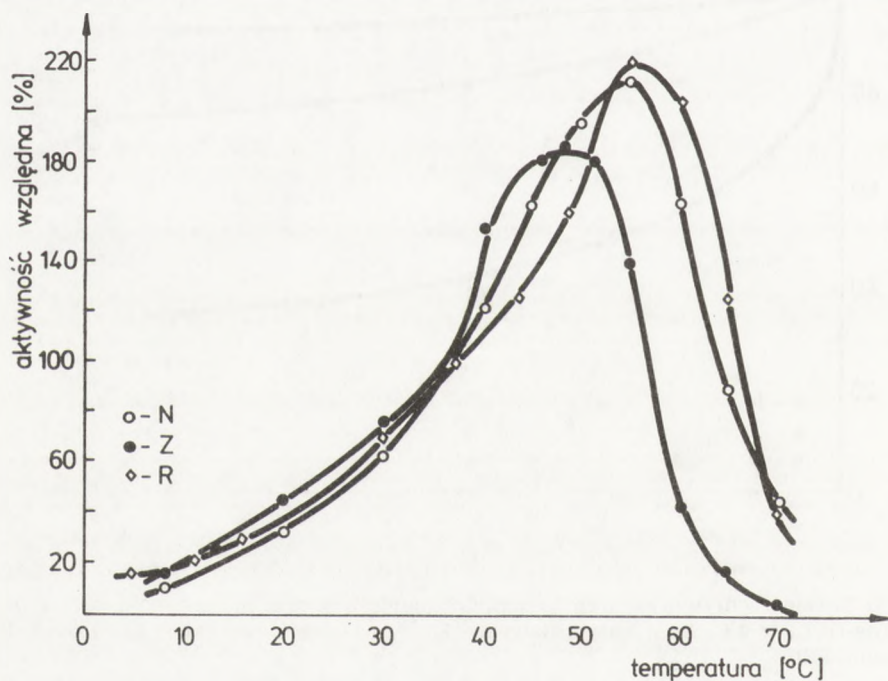


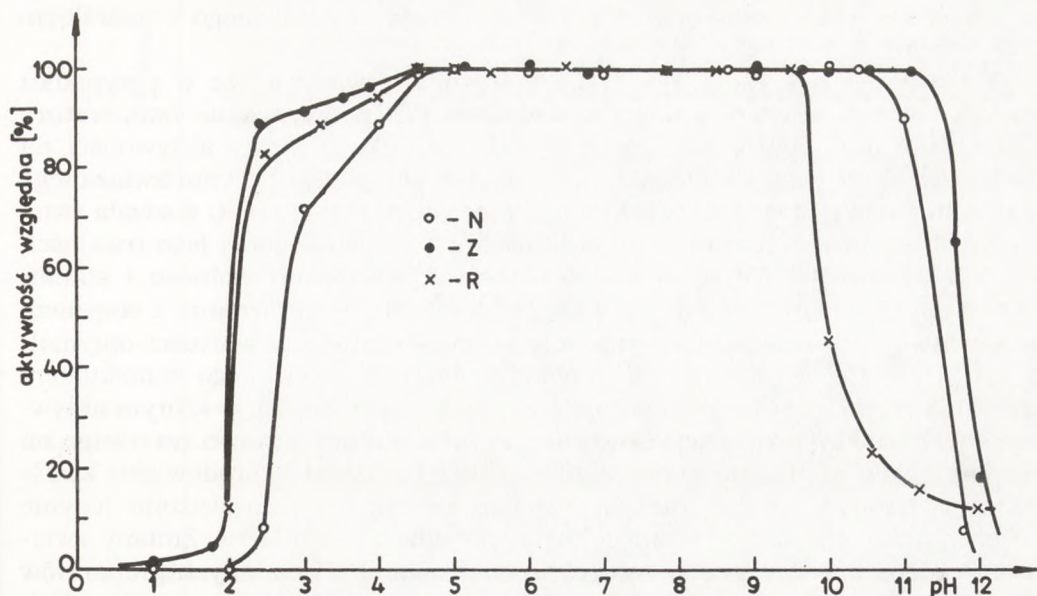
Rys. 1. Trwałość enzymu wolnego i enzymów stabilizowanych, przechowywanych w 0,1 M buforze Tris-HCl i w 4°C. N — enzym natywny; Z — związany z nośnikiem akrylowym; R — stabilizowany PEI.



Rys. 2. Wpływ 1-godzinnej inkubacji enzymu natywnego (N), stabilizowanego PEI (R) i związanego z nośnikiem akrylowym (Z) w danej temperaturze na aktywność. Wartości uzyskane w 37°C przyjęto za 100%.

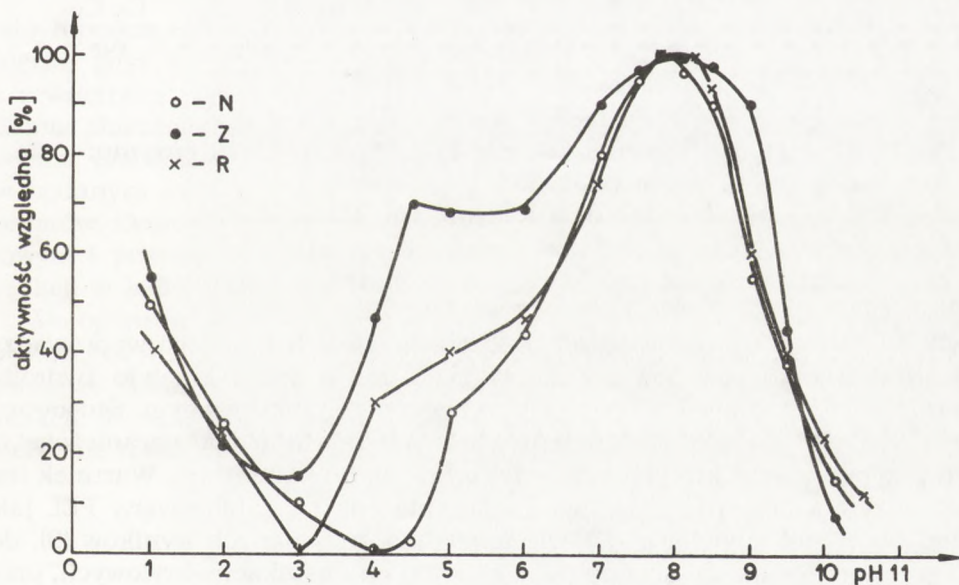
Rys. 3. Wpływ temperatury na aktywność enzymu natywnego (N), stabilizowanego PEI (R) i związanego z nośnikiem akrylowym (Z). Wartości otrzymane w 37°C przyjęto za 100%.





Rys. 4. Wpływ 1-godzinnej inkubacji preparatów enzymatycznych w buforze weronalowym o różnym pH na ich aktywność; enzym natywny (N), stabilizowany PEG (R) i związany z nośnikiem akrylowym (Z).

Rys. 5. Wpływ wartości pH na aktywność enzymu natywnego (N), stabilizowanego PEI (R) i związanego z nośnikiem akrylowym (Z). Wartość otrzymaną w pH 7,8 przyjęto za 100%.



Rozpatrując trwałość enzymu w podwyższonej temperaturze zauważono, że najlepsze efekty osiągnięto w przypadku enzymu związanego z nośnikiem akrylowym.

Porównanie wykresów (rys. 2 i 3) pozwoliło stwierdzić, że w przypadku użycia enzymu natywnego i stabilizowanego PEI podwyższenie temperatury reakcji do 40°C powodować może w tych warunkach straty aktywności na skutek ich mniejszej stabilności. Natomiast w przypadku enzymu związanego z nośnikiem akrylowym podwyższenie temperatury reakcji o 3°C pozwala zwiększyć aktywność preparatu o ponad 50%, przy nie zmienionej jego trwałości.

Wpływ wartości pH na aktywność i trwałość enzymu wolnego i stabilizowanego przedstawiono na rys. 4 i 5. Stwierdzono, w porównaniu z enzymem natywnym, że stabilizacja enzymu nie powoduje zmian w wartości optymalnego pH, które wynosi 7,8. W przypadku enzymu związanego z nośnikiem akrylowym zaobserwowano znaczne poszerzenie zakresu pH, w którym aktywność jest bliska optymalnej. Odnośnie do pH-stabilności zwrócono uwagę na wzrost trwałości obu rodzajów stabilizowanego enzymu w środowisku kwaśnym. W środowisku zasadowym zwiększenie trwałości zauważono jedynie w przypadku enzymu związanego kowalencyjnie z nośnikiem. Zmiany związane z różną pH-stabilnością oraz różnymi profilami pH badanych preparatów enzymatycznych wynikają prawdopodobnie z jonowej struktury nośnika i PEI.

Istotnymi wielkościami, charakteryzującymi enzym natywny lub stabilizowany, obok wpływu różnych parametrów fizykochemicznych, są wartości stałych równania kinetycznego reakcji prowadzonej przez biokatalizator. Lilly i współpracownicy zaproponowali następujące równanie kinetyczne hydrolizy penicyliny G z udziałem acylazy penicylinowej (13):

$$r = \frac{k_3 C_E C_S}{C_S + K_A + \frac{C_S^2}{K_{iS}} + \frac{K_A}{K_{iP}} C_P + \frac{K_A}{K_{iQ}} C_Q + \frac{K_A \cdot C_P \cdot C_Q}{K_{iP} K_{iQ}} + \frac{C_S C_P}{K_{iP}}} \quad (1)$$

gdzie:

C_S, C_P, C_Q, C_E — stężenie kolejno: PG, PhAA, 6-APA i enzymu;

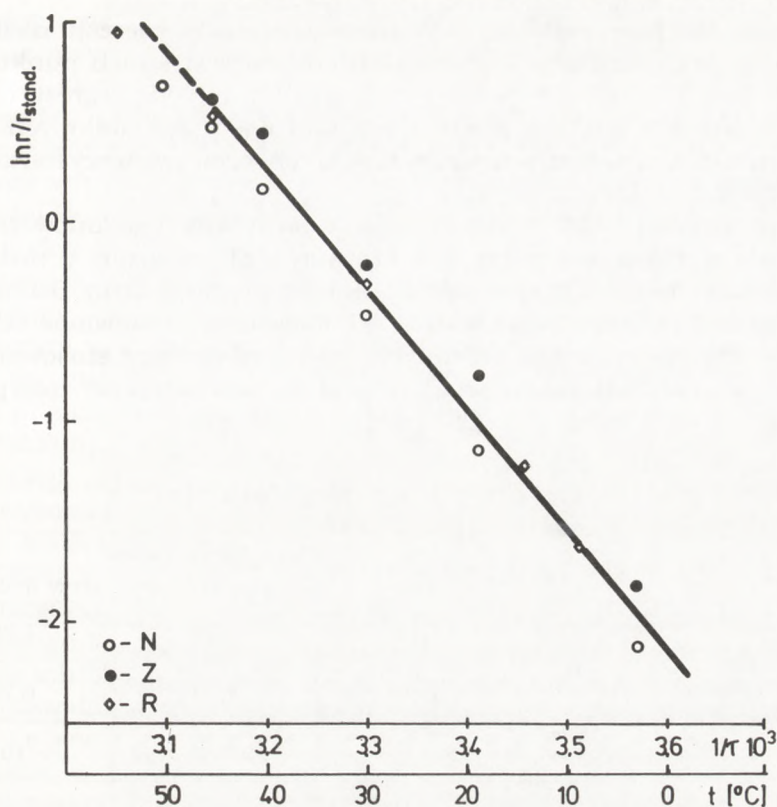
K_A — pozorna stała Michaelisa;

K_{iS}, K_{iP}, K_{iQ} — stałe inhibicji kolejno: PG, PhAA, 6-APA;

r — szybkość reakcji;

k_3 — stała szybkości reakcji rozpadu kompleksu aktywnego.

Mimo szeregu upraszczających założeń, przyjętych przy jego wyprowadzeniu, równanie to jest powszechnie stosowane do opisu kinetyki hydrolizy penicyliny G w układach z enzymem natywnym i stabilizowanym. Stosowanie tego równania dla układów heterogenicznych powinno być ograniczone do tych przypadków, w których opory dyfuzyjne są do pominięcia. Warunek ten, obok enzymu natywnego, spełnia z założenia enzym stabilizowany PEI, jako układ homogeniczny. Na podstawie uprzednio otrzymanych wyników (9), dotyczących immobilizacji acylazy penicylinowej na nośnikach akrylowych, przy-



Rys. 6. Zależność między standardową szybkością reakcji a odwrotnością temperatury bezwzględnej.

jęto hipotezę, że również w tym przypadku opory dyfuzyjne będą do pominięcia, gdyż z budowy nośnika wynika, że enzym powinien być związany z zewnętrzną powierzchnią nośnika. W celu zweryfikowania tego przypuszczenia zbadano wpływ temperatury na szybkość badanej reakcji. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 6. Stwierdzono, że zmiany szybkości reakcji w badanym zakresie temperatur były takie same dla trzech badanych preparatów. Dowodzi to braku oporów dyfuzyjnych w układzie z nośnikiem akrylowym i pozwala na stosowanie tego samego równania do opisu szybkości reakcji w każdym z rozpatrywanych przypadków.

Do opisu szybkości reakcji wykorzystano równanie (1), w którym należało wyznaczyć 5 stałych. W celu wyznaczenia wartości K_A , K_{iS} oraz k_3 wyodrębniono ze zbioru wszystkich wyników podzbiór spełniający warunki początku reakcji. W zakresie tym nie występuje inhibicja produktami, a równanie kinetyczne można uprościć do postaci:

$$r = \frac{k_3 C_E C_S}{C_S + K_A + \frac{C_S^2}{K_{iS}}} \quad (2)$$

Zastosowano metodę całkową, wyznaczając metodą regresji nieliniowej wartości stałych ze wzoru (2). Następnie, dla zbioru wszystkich punktów doświadczalnych, ze scałkowanej postaci równania (1), metodą regresji nieliniowej estymowano stałe inhibicji produktami K_{iP} i K_{iQ} przy ustalonych wartościach uprzednio wyznaczonych stałych. Do obliczeń wykorzystano standardową procedurę minimalizacyjną.

Omówione badania i obliczenia wykonano dla czterech układów enzymatycznych: enzym natywny, enzym stabilizowany PEI, związany z nośnikiem akrylowym oraz zamknięty w sieci żelu (handlowy preparat firmy Boehringer). Otrzymane wyniki przedstawiono w tab. 1. Ponieważ przedstawione stałe wyznaczono metodą regresji wielu zmiennych, będzie właściwsze stosowanie terminu „stałe pozorne” lub „efektywne” (14,15), a przy fizycznej interpretacji otrzymanych wartości niezbędna jest pewna ostrożność.

TABELA 1
WARTOŚCI STAŁYCH RÓWNAŃ KINETYCZNEGO

Stała	Enzym natywny	Enzym stabilizowany		
		PEI	nośnik akrylowy	firmy Boehringer
$k_3 \cdot 10^3$ [mol/g min]	0,781	1,13	1,26	1,25
K_A [mol/m ³]	1,34	1,49	4,29	6,79
K_{iS} [mol/m ³]	$> 10^{15}$	$> 10^{15}$	652,0	$> 10^{15}$
K_{iP} [mol/m ³]	26,8	28,6	20,9	41,5
K_{iQ} [mol/m ³]	32,7	22,4	$> 10^{15}$	$> 10^{15}$

Bardzo zbliżone do siebie są wartości pozornej stałej szybkości reakcji (k_3) enzymu stabilizowanego różnymi metodami. Jest to wynik dość zaskakujący, albowiem techniki stabilizacji w każdym przypadku są wyraźnie różne. Trudny do wyjaśnienia jest także wzrost wartości stałych k_3 enzymów stabilizowanych w porównaniu z enzymem natywnym.

Wartości pozornej stałej K_A , będącej miarą powinowactwa substratu do enzymu, dla enzymu natywnego i stabilizowanego PEI są zbliżone, co było oczekiwane, gdyż oba układy są homogeniczne. Dla układów heterogenicznych wartości stałych są mniejsze, co prawdopodobnie jest skutkiem mniejszej dostępności centrum aktywnego (wiążącego) dla cząsteczek substratu.

Inhibicja substratowa (K_{iS}) nie występuje w przypadku enzymu natywnego (co wykazali również Park i wsp. (5)), stabilizowanego PEI i zamkniętego w sieci żelu. Występuje natomiast, jakkolwiek w bardzo małym stopniu, w przypadku enzymu związanego z nośnikiem akrylowym. Zjawisko to można wiązać ze stosunkowo dużą sorpcją substratu na nośniku (16).

We wszystkich przypadkach zaobserwowano podobną co do wartości inhibicję kompetycyjną kwasem fenylooctowym (pozorna stała K_{iP}), przy czym

dla enzymu związanego z nośnikiem zaznaczył się niewielki wzrost tej inhibicji, a w przypadku preparatu firmy Boehringer jej spadek.

Inaczej kształtuje się inhibicja niekompetycyjna 6-APA. Stwierdzono ją w przypadku enzymu natywnego i stabilizowanego PEI. Wartości pozornych stałych inhibicji są w obu przypadkach zbliżone. Inhibicja ta nie występuje natomiast w układach heterogenicznych.

Ze względu na dużą liczbę stałych w równaniu kinetycznym i ich wzajemny wpływ podczas ich wyznaczania trudno jest scharakteryzować jednoznacznie właściwości kinetyczne poszczególnych preparatów enzymatycznych. Ogólnie stwierdzono:

— Enzym natywny posiada najmniej korzystne właściwości kinetyczne, co wyraża się niską wartością pozornej stałej k_3 oraz występowaniem inhibicji dwoma produktami reakcji;

— Układ immobilizowany w sieci żelu jest najslabiej inhibitowany produktami reakcji, stąd będzie szczególnie korzystny do zastosowań w przypadku użycia wysokich stężeń reagentów. Wysoka wartość pozornej stałej K_A pogarsza jego właściwości w przypadku niskich stężeń;

— Układ z enzymem związanym z nośnikiem akrylowym jest trudny do jednoznacznego scharakteryzowania. Podobnie jak układ firmy Boehringer, nie wykazuje inhibicji 6-APA i praktycznie substratowej. Posiada dwukrotnie silniejszą inhibicję kwasem fenylooctowym, ale mniejszą wartość pozornej stałej K_A . Pozwala to sklasyfikować jego właściwości kinetyczne jako zbliżone do układu enzymatycznego firmy Boehringer;

— Układ z enzymem stabilizowanym PEI wykazuje inhibicję dwoma produktami reakcji, co musi mieć niekorzystne implikacje przy stosowaniu wysokich stężeń reagentów. Z drugiej strony, posiada wyraźnie najniższą, spośród układów z enzymem stabilizowanym, pozorną stałą K_A . Można go uznać za współmierny z preparatem enzymatycznym firmy Boehringer, przy czym jego zalety uwidocznia się w przypadku stosowania niskich i średnich stężeń reagentów.

Podsumowanie

Scharakteryzowanie właściwości trzech preparatów enzymatycznych pozwala na ich ocenę, poszerzoną o wiadomości dotyczące preparatyki enzymów. Porównanie przedstawiono w tab. 2, w skali od 1 do 5, przy czym 5 punktów przydzielano temu preparatowi, dla którego dana cecha była najkorzystniejsza. Analiza przyznanych punktów pozwoliła wyłonić preparat enzymatyczny o najkorzystniejszych właściwościach. Preparatem tym jest enzym związany z PEI, który charakteryzuje się następującymi cechami: procedura jego otrzymywania jest prosta, tania i efektywna; jest trwały w warunkach przechowywania; wpływ temperatury i wartości pH na aktywność i stabilność oraz wartości stałych równania kinetycznego oceniono na porównywalne z enzymem natywnym. Ze względu na występowanie preparatu enzymatycznego w formie

rozpuszczalnej w wodzie, jego zastosowanie w przepływowym reaktorze membranowym należy zaliczyć do szczególnie korzystnych rozwiązań procesowych.

TABELA 2
PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI PREPARATÓW ENZYMATYCZNYCH W SKALI OD 1 DO 5 PUNKTÓW

Cecha preparatu	Enzym natywny	Enzym stabilizowany PEI	Enzym związany kowalencyjnie
wymagana czystość preparatu	5	5	2
koszt immobilizacji	5	4	1
aktywność po immobilizacji	5	4	2
trwałość w warunkach przechowywania	2	5	4
termostabilność	3	4	5
pH-stabilność	2	3	5
profil temperatury	4	4	5
profil pH	4	4	5
stała k_3	2	4	5
stała K_A	5	5	2
stała K_{IS}	5	5	4
stała K_{IP}	5	5	2
stała K_{IQ}	3	2	5

Literatura

- Orieszina M. G., Pienzikowa G. A., Levitov M. M., Bartoszewicz J. E., (1982), Prikl. Biochim. Microbiol., 20, 787 – 792.
- Shewale J. G., Sivaraman H., (1989), Proc. Biochem., August, 146 – 154.
- Shaltiel S., Mizrahi R., Stupp Y., Sela M., (1970), Eur. J. Biochem., 14, 509 – 515.
- Cheetham P. S. J., (1985), Handbook of Enzyme Biotechnology, ed. Wiseman A., Chichester, 271 – 379.
- Park J. M., Choi C. Y., Seong B. L., Han M. H., (1982), Biotech. Bioeng., 24, 1623 – 1637.
- Haagensen P., Karlsen L. G., Petersen J., Villadsen J., (1983), Biotech. Bioeng., 25, 1873 – 1895.
- Balasingham K., Warburton D., Dunnill P., Lilly M. D., (1972), Biochem. Biophys. Acta, 276, 250 – 256.
- Bryjak J., Trochimczuk A., Noworyta A., (1989), Bioprocess Eng., 4, 159 – 162.
- Bryjak J., Trochimczuk A., Noworyta A., (1993), J. Chem. Technol. Biotechnol., 57, 73 – 78.
- Bryjak J., (1990), praca doktorska, Politechnika Wroclawska.
- Klibanov A. M., (1983), Science, 219, 722 – 727.
- Marconi W., Cecere F., Morisi F., Della-Penna G., Rappuoli B., (1973), J. Antibiot., 24, 228 – 232.

13. Warburton D., Dunnill P., Lilly M. D., (1973), *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 13 - 25.
14. Trevan M. D., (1980), *Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology.*, Trevan M. D., 5 - 102, ed. John Wiley and Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto.
15. Vandamme E., (1988), *Bioreactor immobilized enzymes and cells. Fundamentals and Applications.*, 57, 79 - 85. Moo-Young M., 261 - 286, ed. Elsevier Applied Science, London-New York.
16. Bryjak J., Noworyta A., (1993), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, w druku.

Catalytical activity of penicillin acylase in native and stabilized derivatives

Summary

Three different enzyme preparations were investigated: native enzyme, enzyme stabilized by adding poly(ethyleneimine) and enzyme attached to acrylic carrier. The preparations were compared with regard to their storage, temperature and pH-stabilities as well as the effect of temperature and pH-value on enzyme activity. It was found that for all preparations hydrolysis was kinetically limited. Five kinetic equation constants were calculated. The enzyme stabilized by poly(ethyleneimine) was selected as the best preparation to be applied in industry.

Key words:

penicillin acylase, penicillin acylase derivatives.

Adres dla korespondencji:

Jolanta Bryjak, Instytut Inżynierii Chemicznej, Politechnika Wrocławska, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50 - 373 Wrocław 51.