



# Unieruchamianie rekombinowanej $\beta$ -galaktozydazy w reakcjach katalizowanych transglutaminazą

Sylvia Wołosowska, Józef Synowiecki

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności,  
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

## Immobilization of recombinant $\beta$ -galactosidase in reactions catalysed by transglutaminase

### Summary

Thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* transformant containing the enzyme gene from *Pyrococcus woesei* was immobilized at pH 5.5 on silica gel by crosslinking with transglutaminase. The obtained preparations had a specific activity of 11.573 U/g of support at 70°C using oNPG as a substrate. The optimum pH and temperature for immobilized  $\beta$ -galactosidase activity were 5.5 and 95°C. The immobilized enzyme is stable at the temperatures close to the optimal value and the residual activity for oNPG hydrolysis of the preparations incubated 1 h in 0.1 M phosphate citrate buffer (pH 5.5) at 100°C was about 70% of the initial value.

### Key words:

$\beta$ -galactosidase, lactose, enzyme immobilization, thermostable enzymes.

### Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,  
Katedra Chemii,  
Technologii  
i Biotechnologii Żywności,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Gdańska,  
ul. Gabriela Narutowicza  
11/12,  
80-952 Gdańsk.

## 1. Wstęp

Katalizowana przez  $\beta$ -galaktozydazę lub niektóre  $\beta$ -glukozydazy hydroliza zapobiega skutkom nietolerancji laktozy oraz trudnościom technologicznym, wywołanym występowaniem tego cukru w mleku i serwatce. Stosuje się ją w celu wytwarzania dietetycznego mleka i jego przetworów, syropów glukozywo-galaktozowych oraz bezlaktozowej serwatki przydatnej do produkcji lodów, fermentowanych napojów oraz karmy dla

zwierząt. Hydroliza laktozy w wymienionych produktach eliminuje niepożądaną krystalizację disacharydu w niskiej temperaturze, zwiększa słodkość wyrobów i umożliwia fermentację rozmaitych produktów ubocznych przemysłu mleczarskiego przez drobnoustroje źle przyswajające laktozę (1). Występujące w przypadku najczęściej stosowanych  $\beta$ -galaktozydaz ograniczenie wydajności procesu wskutek hamowania reakcji galaktozą, gromadzącą się podczas hydrolizy laktozy można ograniczyć stosując reaktory z unieruchomionym enzymem. Niewielkie zmiany struktury  $\beta$ -galaktozydazy, spowodowane wiązaniem z nośnikiem, zmniejszają zdolność galaktozy do współzawodniczenia z substratem o centrum aktywne enzymu, powodując zwiększenie wydajności reakcji (2). Dodatkową zaletą stosowania unieruchomionego (immobilizowanego) enzymu jest utrwalenie struktury i zwiększenie stabilności jego cząsteczek, możliwość wielokrotnego użycia tej samej porcji preparatu, a w konsekwencji istotnego obniżenia kosztów produkcji, jak też łatwego oddzielania enzymu od produktów reakcji. Oprócz wymienionych korzyści, unieruchamianie powoduje także niepożądane efekty, takie jak obniżenie powinowactwa do substratu, charakteryzujące się zwiększeniem stałej Michaelisa ( $K_m$ ) oraz zmniejszeniem szybkości katalizowanej reakcji (3,4). Jedną z przyczyn tego zjawiska są opory dyfuzji substratu przez warstwę graniczną, oddzielającą unieruchomiony enzym od środowiska reakcji, którym można przeciwdziałać zwiększając temperaturę procesu. Warunkiem tego jest zastosowanie termostabilnych enzymów, umożliwiających ponadto ograniczenie rozwoju niepożądanego mikroflory podczas długotrwałej pracy reaktora. Ze wzrostem temperatury maleje lepkość roztworu substratu, a tym samym opory przepływu, co pozwala na zwiększenie natężenia przepływu substratu przez reaktor, a w konsekwencji wzrost wydajności procesu. Główną korzyścią wynikającą z zastąpienia stosowanych obecnie preparatów  $\beta$ -galaktozydazy ich unieruchomionymi termostabilnymi odpowiednikami jest jednak zwiększenie wydajności procesu oraz ograniczenie ryzyka mikrobiologicznego zanieczyszczenia reaktora. Intensyfikacji częściowej cieplnej destrukcji witamin, lipidów, reszt niektórych aminokwasów w białkach oraz przebiegu reakcji Maillarda i innych przemian składników mleka można zapobiec, łącząc hydrolizę laktozy z często stosowaną pasteryzacją produktów mlecznych. Funkcję pasteryzatora spełni w tym przypadku reaktor przepływowy z unieruchomioną termostabilną  $\beta$ -galaktozydazą (5,6).

Niedogodnością wielu stosowanych obecnie metod unieruchamiania enzymów jest częściowa inaktywacja preparatów spowodowana m.in. warunkami reakcji oraz zmianami struktury cząsteczek białka pod wpływem substancji wiążących enzym. Rozmaite sposoby trwałego unieruchamiania enzymów polegają najczęściej na sprzęganiu białka z nośnikiem za pośrednictwem substancji posiadających co najmniej dwie grupy funkcyjne, z których jedna łączy się kowalencyjnie z enzymem, a druga z nośnikiem. W przypadku szkła porowatego, żelu krzemionkowego i innych nośników nie zawierających ugrupowań atomów zdolnych do reagowania z enzymem lub substancjami wiążącymi enzym, stosuje się m.in. silanizację 3-aminopropylotriektoksylanem, wprowadzającą na powierzchnię nośnika grupy aminowe wiążące

białko za pośrednictwem aldehydu glutarowego (7). Obecnie prowadzone są w wielu ośrodkach badania możliwości wykorzystania w procesach ciągłych preparatów uzyskanych przez sieciowanie kryształów enzymu (*Cross-Linked Enzyme Crystals*) (8,9). W celu zmniejszenia oporów dyfuzyjnych konieczne jest jednak ograniczenie rozmiarów, a szczególnie grubości kryształów, co dość znacznie utrudnia przepływ substratu (8). Można tego uniknąć „siecując” rozpuszczalne białko enzymatyczne po adsorpcji na żelu krzemionkowym lub innej niereaktywnej i niedrogiej substancji o dobrej wytrzymałości mechanicznej.

Celem pracy było otrzymanie preparatów termostabilnej  $\beta$ -galaktozydazy przydatnych w produkcji bezlaktozowego mleka i serwatki. Zamiast stosowanego zazwyczaj aldehydu glutarowego do „usieczowania” zaadsorbowanego enzymu wykorzystano transglutaminazę (EC 2.3.2.13), katalizującą tworzenie wiązań amidowych w reakcjach przeniesienia acylu pomiędzy grupami  $\gamma$ -karboksamidowymi reszt glutaminy a pierwszorzędowymi grupami aminowymi białek lub aktywowanych nośników. Skutkiem tworzenia tych wiązań powinno być ograniczenie desorpcji unieruchomionego enzymu poprzez „usieczowanie” jego cząsteczek między sobą lub ewentualnie ich trwałe związanie za pośrednictwem grup aminowych aktywowanego nośnika.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Stosowane preparaty

Do badań wykorzystano rekombinowaną  $\beta$ -galaktozydazę wyizolowaną z komórek *Escherichia coli*, transformowanych plazmidem pET-30LIC (Novagen Inc., Madison, USA) z wklonowanym genem enzymu z hipertermofilnego archeona *Pyrococcus woesei*. Ekstrakt bezkomórkowy pozbawiano termolabilnych białek *Escherichia coli* poprzez ich precypitację w 85°C, a następnie strącano pozostającą w ekstrakcie  $\beta$ -galaktozydazę za pomocą acetonu (10,11). Jako nośniki enzymu stosowano niemodyfikowany lub modyfikowany 3-aminopropylo-trietoksysilanem żel krzemionkowy (Fluka) o rozmiarach ziaren 0,17-0,25 mm charakteryzujący się małą wrażliwością na zmiany pH, temperatury lub ciśnienia oraz odpornością na chemiczną i mikrobiologiczną degradację.

Acylowanie modyfikowanego przez producenta żelu krzemionkowego przeprowadzano świeżo przedestyłowanym bezwodnikiem octowym. Próbkę zawierającą 10 ml bezwodnika, 0,1 g żelu krzemionkowego i 0,1 g octanu sodu odpowietrzano 5 min w łaźni ultradźwiękowej i wstrząsano przez 1 godz. w 20°C. Otrzymany produkt sączono, przemywano 200 ml wody destylowanej i suszono w 30°C.

## 2.2. Unieruchamianie enzymu

Do 1 g nośnika krzemionkowego umieszczonego w kolbie Erlenmayera o pojemności 200 ml dodawano 25 ml wodnego roztworu rekombinowanej  $\beta$ -galaktozydazy o stężeniu 1mg/ml oraz 25 ml roztworu transglutaminazy ze *Streptoverticillum mobaraense* (Ajinomoto, Japonia) o stężeniu 0,6 mg/ml w 0,2 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5), odpowietrzano 5 min w łaźni ultradźwiękowej, a następnie wstrząsano przez 1,5 godz. w temperaturze 50°C z szybkością 100 cykli/min przy amplitudzie 5 cm. Badania wpływu kwasowości mieszaniny reakcyjnej na ilość unieruchomionego enzymu określano stosując 0,1 M roztwory buforów fosforanowo-cytrynianowych o pH zmienianym w zakresie od 3,0 do 8,5. Preparaty odniesienia przygotowywano zastępując roztwór transglutaminazy 25 ml 0,2 M buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 5,5. Otrzymane preparaty sączono pod zmniejszonym ciśnieniem na nuczy ze spiekim porcelanowym i przemywano kolejno 1-litrowymi porcjami: wody destylowanej, 1 M roztworu NaCl oraz ponownie wody. Przemywanie roztworem chlorku sodu zastosowano w celu usunięcia enzymu zaadsorbowanego na nośniku bez udziału wiązań kowalencyjnych. Uzyskane preparaty suszono przez 12 godz. w temperaturze 20°C.

## 2.3. Oznaczanie aktywności enzymatycznej

Aktywność wolnej i unieruchomionej  $\beta$ -galaktozydazy oznaczano zmodyfikowaną metodą Cravena i wsp. (12), określając ilość o-nitrofenolu uwolnionego podczas hydrolizy 5 mM roztworu o-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozydu (oNPG) w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5. W przypadku wolnego enzymu 2,5 ml substratu wstępnie ogrzewano do 70°C i dodawano 0,5 ml roztworu enzymu w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5). Po upływie zaplanowanego czasu reakcji hydrolizę przerywano, dodając 1 ml 1 M roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i mierzono absorbancję (A<sub>420</sub>) względem analogicznie ogrzewanej próby odniesienia, zawierającej zamiast roztworu enzymu 0,5 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 5,5.

Aktywność unieruchomionej  $\beta$ -galaktozydazy określano stosując 10 ml 5 mM roztworu oNPG w buforze fosforanowo-cytrynianowym ogrzanego do zaplanowanej temperatury reakcji i dodawano 10 mg preparatu unieruchomionego enzymu. Próbkę mieszano przez określony czas z szybkością 150 cykli/min przy amplitudzie 5 cm w termostatowanej wstrząsarce i po upływie zaplanowanego czasu reakcji przerywano hydrolizę dodając 3,5 ml 1 M roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Preparat enzymu odwirowywano (5 min, 2000 x g) i mierzono absorbancję supernatantu (A<sub>420</sub>) względem analogicznie ogrzewanego roztworu substratu. Jako jednostkę aktywności przyjęto ilość enzymu hydrolizującą w ciągu minuty 1  $\mu$ mol oNPG w temperaturze 70°C w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5.

#### 2.4. Warunki działania i termostabilność unieruchomionej $\beta$ -galaktozydazy

Zależność aktywności enzymu od pH reakcji określano stosując 5 mM roztwory oNPG w 0,1 M buforach fosforanowo-cytrynianowych o pH od 3,0 do 8,5. Wpływ temperatury na aktywność preparatów określano według danych zamieszczonych w rozdziale 2.3. w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5, zmieniając temperaturę reakcji w zakresie 60-98°C. Oznaczenia aktywności preparatu w temperaturach powyżej 98°C prowadzono w szczelnie zamykanych probówkach ogrzewanych w łaźni glicerynowej. Termostabilność unieruchomionej  $\beta$ -galaktozydazy określano mierząc zmniejszenie aktywności podczas 60 min inkubacji preparatów w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5) w temperaturach 60-110°C.

#### 2.5. Zmiany aktywności preparatu podczas hydrolizy laktozy w reaktorze kolumnowym

Kolumnę (0,7 x 10 cm) z płaszczem ogrzewanym wodą o temperaturze 75°C wypełniano 4,5 g preparatu  $\beta$ -galaktozydazy unieruchomionej na żelu krzemionkowym. Reaktor zasilano 5% roztworem laktozy w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5. Natężenie przepływu utrzymywano w zakresie 1,3-1,4 ml/min stosując pompę perystaltyczną (Unipan 315, Polska). Do pobierania próbek produktów hydrolizy laktozy używano kolektora frakcji SF3120 (Merck). Stopień hydrolizy laktozy oznaczano metodą Nickersona i wsp. (13) określając stężenie wytworzonej glukozy i galaktozy za pomocą odczynnika arsenomolibdenowego.

### 3. Omówienie wyników

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że zastosowanie transglutaminazy pozwala na uproszczenie i obniżenie kosztu procedury unieruchamiania enzymów na żelu krzemionkowym. Wynika to z wyeliminowania konieczności modyfikowania wymienionego nośnika 3-aminopropylotrietoksyloksysilanem, stosowanym w celu wprowadzenia grup aminowych niezbędnych w przypadku wiązania białka enzymatycznego za pośrednictwem aldehydu glutarowego. O skuteczności proponowanego sposobu immobilizacji świadczy wyraźne ograniczenie spadku aktywności preparatów  $\beta$ -galaktozydazy, unieruchomionej na żelu krzemionkowym z udziałem transglutaminazy po intensywnym przemywaniu roztworem chlorku sodu, powodującym elucję enzymu zaadsorbowanego za pośrednictwem oddziaływań jonowych, w porównaniu z preparatami kontrolnymi otrzymanymi bez jej stosowania (tab. 1). Zaobserwowane zwiększenie stabilności wiązania enzymu nie jest przypuszczalnie spowodowane tworzeniem wiązań amidowych pomiędzy enzymem a nośnikiem, lecz wynika głównie z zachodzącego pod wpływem transglutaminazy

„sieciovania” cząsteczek białka zaadsorbowanych na powierzchni żelu krzemionkowego. Świadczy o tym brak istotnych różnic aktywności, przemywanych roztworem NaCl preparatów  $\beta$ -galaktozydazy unieruchomionej z udziałem transglutaminazy na silanizowanym lub niesilanizowanym żelu krzemionkowym. Zmniejszenia aktywności preparatów nie uzyskano też po acylowaniu grup aminowych modyfikowanego żelu krzemionkowego, których zablokowanie powinno przeciwdziałać tworzeniu wiązań sprzęgających rekombinowaną  $\beta$ -galaktozydazę z nośnikiem (tab. 1). Niezależnie od zastosowanego sposobu modyfikacji nośnika krzemionkowego uzyskiwano podobną wydajność immobilizacji i otrzymane preparaty wykazywały około 18% ogólnej aktywności  $\beta$ -galaktozydazy wprowadzonej do środowiska reakcji unieruchamiania.

Tabela 1

**Porównanie aktywności rekombinowanej  $\beta$ -galaktozydazy unieruchomionej bez lub z udziałem transglutaminazy na rozmaitych nośnikach**

| Żel krzemionkowy  | Aktywność (U/g nośnika) $\beta$ -galaktozydazy z <i>Pyrococcus woesei</i> unieruchomionej |                             |
|---|---|-----------------------------|
|   | bez transglutaminazy  | z udziałem transglutaminazy |
| modyfikowany przez producenta 3-aminopropylotrietoksylianem | 2393 $\pm$ 297  | 11306 $\pm$ 468             |
| modyfikowany, a następnie acylowany bezwodnikiem octowym    | –   | 11137 $\pm$ 377             |
| niemodyfikowany   | –   | 11573 $\pm$ 520             |

Przedstawione wyniki są średnią z 4 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe

Uzyskana immobilizowana  $\beta$ -galaktozydaza ma po przemyciu roztworem chloru sodu aktywność 11573 U/g nośnika. Największą skuteczność unieruchamiania rekombinowanej  $\beta$ -galaktozydazy uzyskano w temperaturze 50°C, przy której stosowana w doświadczeniach transglutaminaza przejawia największą aktywność (tab. 2). Przy niewielkich stężeniach (do 0,05 mM)  $\beta$ -ditiotretolu (DTT), stosowanego w celu zabezpieczenia grupy tiolowej w centrum katalitycznym transglutaminazy przed utlenieniem zaobserwowano niewielki, około 10% wzrost skuteczności unieruchamiania  $\beta$ -galaktozydazy. Dalsze zwiększanie zawartości tej substancji było jednak przyczyną spadku aktywności preparatów, osiągającego przy 1,5 mM stężeniu DTT około 23% maksymalnej wartości. Potwierdzeniem udziału transglutaminazy w unieruchamianiu enzymu jest jej wpływ na aktywność uzyskanych preparatów (rys. 1). Początkowy prawie liniowy wzrost aktywności immobilizowanej  $\beta$ -galaktozydazy ulega zupełnemu zahamowaniu przy stężeniu transglutaminazy przekraczającym 0,05 mg/ml. Można to m.in. tłumaczyć intensyfikacją adsorpcji transglutaminazy, utrudniającą dostęp unieruchamianej  $\beta$ -galaktozydazy do powierzchni nośnika.

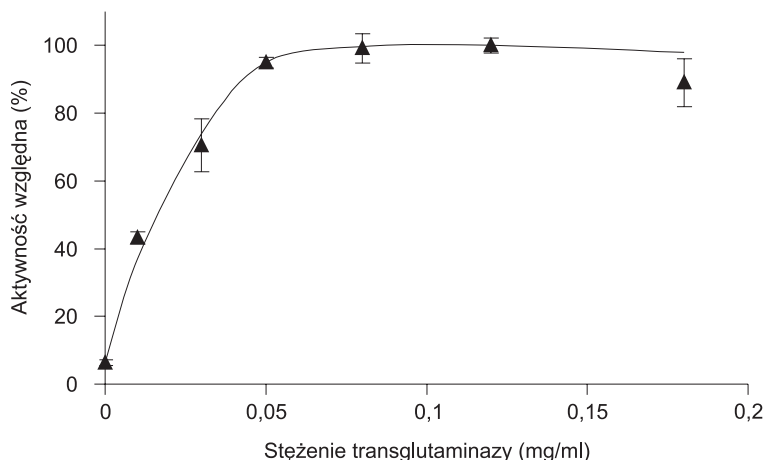
Tabela 2

**Aktywność rekombinowanej  $\beta$ -galaktozydazy unieruchamianej 90 min na żelu krzemionkowym w różnych temperaturach**

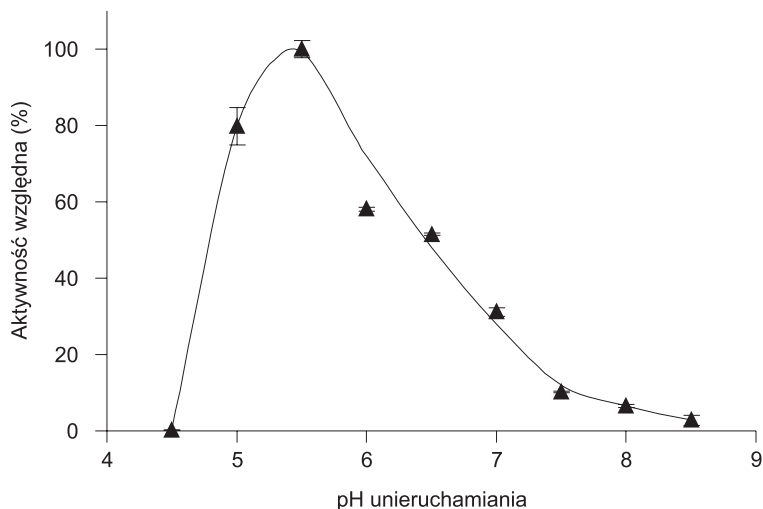
| Temperatura unieruchamiania ( $^{\circ}$ C) | Aktywność preparatu (U/g nośnika) |
|---|-----------------------------------|
| 25  | 6840 $\pm$ 153                    |
| 35  | 7620 $\pm$ 65                     |
| 45  | 8715 $\pm$ 15                     |
| 50  | 10900 $\pm$ 494                   |
| 60  | 11030 $\pm$ 237                   |

Wyniki są średnią z 3 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe

Wiązanie badanego enzymu na żelu krzemionkowym było możliwe w zakresie pH 4,5-8,0 w którym transglutaminaza zachowuje aktywność. Największą wydajność unieruchamiania uzyskiwano jednak przy wartości pH wynoszącej 5,5, a obniżenie lub zwiększenie pH o 0,5 jednostki było przyczyną zmniejszenia aktywności uzyskanych preparatów odpowiednio o 20 i 30% (rys. 2). Optymalne pH unieruchamiania rekombinowanej  $\beta$ -galaktozydazy przeprowadzanego z udziałem transglutaminazy różni się od wartości zapewniającej największą wydajność wiązania wymienionego enzymu za pośrednictwem aldehydu glutarowego na chitynie (pH 4,0) i żelu krzemionkowym modyfikowanym 3-aminopropylotrietoksylanem (pH 4,0) (14). Jedną z przyczyn zaobserwowanej zmiany optymalnej wartości pH jest przypuszczalnie ograniczenie w kwaśnym środowisku skuteczności działania transglutaminazy, przejawiającej największą aktywność przy pH 7,0. Czas unieruchamiania nie powi-



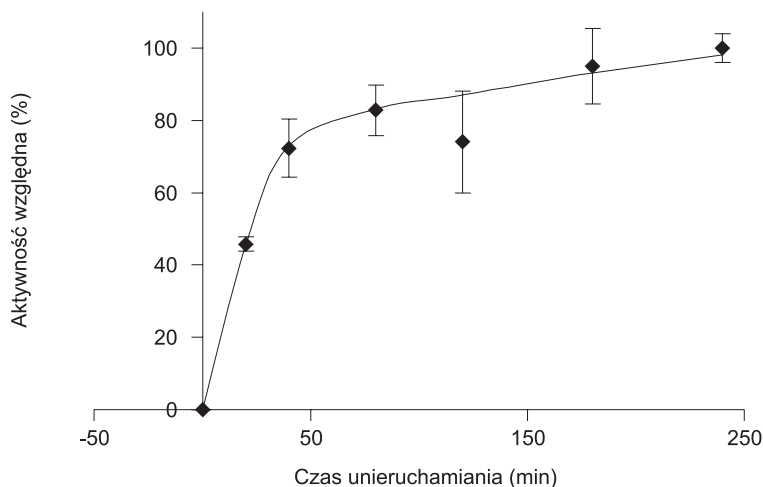
Rys. 1. Wpływ stężenia transglutaminazy na aktywność  $\beta$ -galaktozydazy unieruchamianej przez 2 godz. (pH 5,5) na nośniku krzemionkowym. Wyniki są średnią z trzech oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.



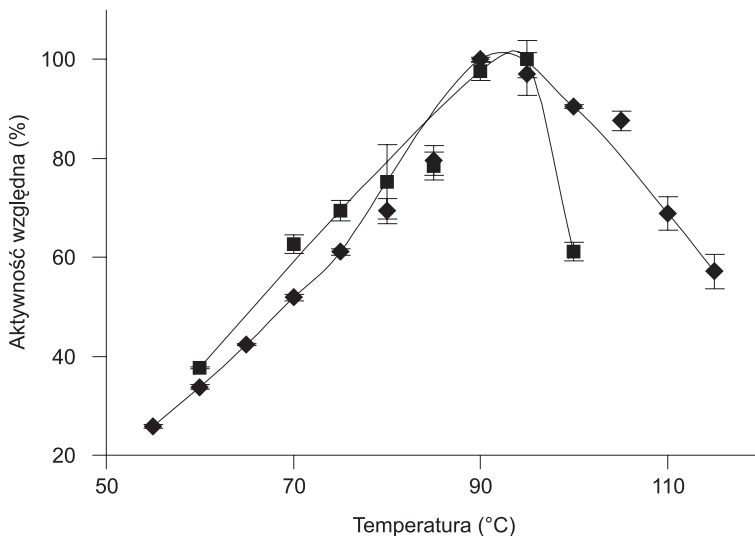
Rys. 2. Optymalne pH unieruchamiania rekombinowanej  $\beta$ -galaktozydazy na żelu krzemionkowym przy stężeniu transglutaminazy 0,08 mg/ml. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

nien przekraczać 100 min. Dalsze przedłużanie reakcji nie powoduje już istotnego zwiększenia aktywności preparatów (rys. 3).

Unieruchomiona rekombinowana  $\beta$ -galaktozydaza osiąga maksymalną aktywność w temperaturze 95°C, tylko o 2°C większej od temperatury optymalnej dla

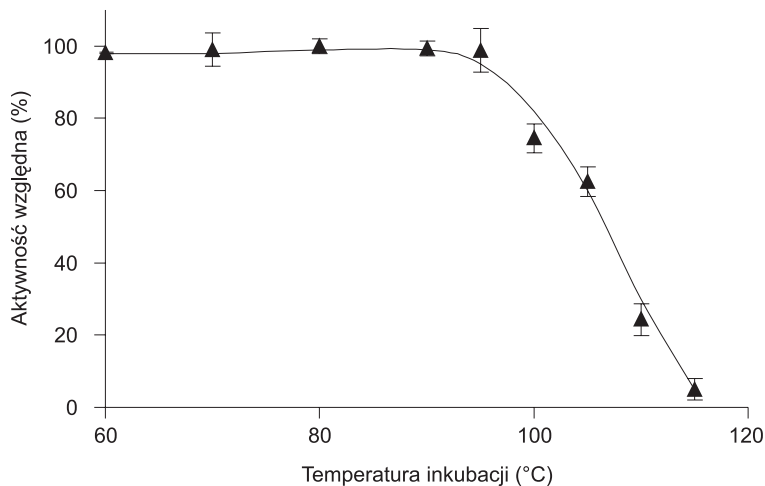


Rys. 3. Wpływ czasu immobilizacji na aktywność rekombinowanej  $\beta$ -galaktozydazy unieruchomionej z udziałem transglutaminazy na żelu krzemionkowym przy pH 5,5. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.



Rys. 4. Wpływ temperatury reakcji enzymatycznej na aktywność wolnej (◆) i unieruchomionej (■)  $\beta$ -galaktozydazy oznaczany w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

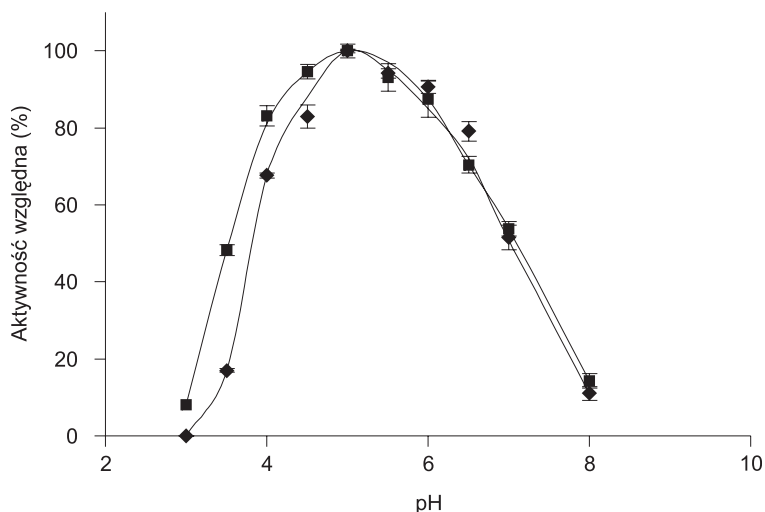
działania wolnego enzymu (rys. 4). Immobilizacja wywoływała natomiast wzrost termostabilności enzymu. Po 1-godzinnej inkubacji w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5 nie zaobserwowano istotnego zmniejszenia aktywności preparatu w temperaturach poniżej 95°C, a połowiczny jej zanik następował dopiero w 113°C (rys. 5). W przypadku wolnej  $\beta$ -galaktozydazy 50% spadek aktywności uzyskiwano już po 40 min ogrzewania w 110°C (10). Podobnie jak w przypadku wolnego enzymu unieruchomiona  $\beta$ -galaktozydaza przejawia największą aktywność przy pH 5,5, a w zakresie pH 6,2-6,6, charakterystycznym dla mleka i słodkiej serwatki zachowuje ponad 70% maksymalnej aktywności (rys. 6). Korzystną cechą stosowanego nośnika jest brak wpływu na optymalną wartość pH reakcji enzymatycznej. Wskutek niewystarczającego stężenia protonowanych grup aminowych, nawet w przypadku stosowania modyfikowanego żelu krzemionkowego, nie zaobserwowano wywołanego unieruchomieniem przesunięcia optymalnej wartości pH działania rekombinowanej  $\beta$ -galaktozydazy. Zmiany te występują w przypadku stosowania nośników o charakterze polijonu zawierających grupy funkcyjne, oddziałujące elektrostatycznie z protonami w otaczającym roztworze, zwiększając lub zmniejszając ich stężenie na granicy faz (3,4). W celu przywrócenia optymalnej dla działania enzymu kwasowości środowiska reakcji w warstwie granicznej, należy odpowiednio zmienić pH pozostałej części roztworu. Umożliwiające prawidłową regulację pH określenie wielkości tej zmiany jest utrudnione ze względu na dużą zależność gradientu protonów od stężenia i stopnia jonizacji grup funkcyjnych na po-



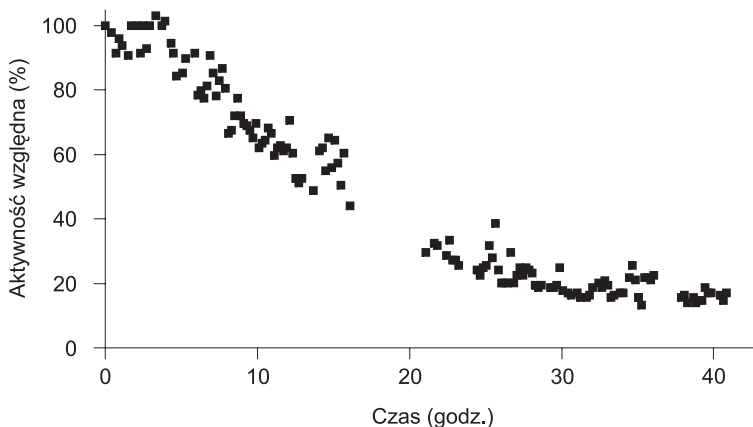
Rys. 5. Zmiany aktywności rekombinowanej  $\beta$ -galaktozydazy unieruchomionej na żelu krzemionkowym po 1 godz. ogrzewania w różnych temperaturach w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5). Wyniki są średnią z 3 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

wierzchni nośnika, siły jonowej środowiska oraz ewentualnego uwalniania kationów wodorowych podczas katalizowanej reakcji.

Przebieg hydrolizy 5% roztworu laktozy, przeprowadzanej w reaktorze kolumnowym, wskazuje na zróżnicowaną trwałość wiązania poszczególnych cząstek zagre-



Rys. 6. Optymalne pH reakcji katalizowanej przez wolną (◆) i unieruchomioną (■) rekombinowaną  $\beta$ -galaktozydazę immobilizowaną na żelu krzemionkowym. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.



Rys. 7. Zmiany aktywności termostabilnej  $\beta$ -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* unieruchomionej na żelu krzemionkowym podczas hydrolizy 5% roztworu laktozy w reaktorze kolumnowym w temperaturze 75°C przy natężeniu przepływu 1,3-1,4 ml/min.

gowanej  $\beta$ -galaktozydazy z żelem krzemionkowym (rys. 7). Podczas pierwszych 18 godzin reakcji następował połowiczny zanik aktywności preparatu, wywołany przypuszczalnie uwalnianiem najslabiej związanego enzymu. Dalsze przedłużanie procesu powodowało jednak coraz mniejsze spadki aktywności, która po około 35-40 godzinach hydrolizy nie ulegała już prawie zmianie, stabilizując się na poziomie około 2300 U/g preparatu. Preparaty  $\beta$ -galaktozydazy unieruchomionej na żelu krzemionkowym wykazywały dość dużą trwałość i po 28 dniach przechowywania w stanie suchym, w temperaturze 4°C traciły tylko 30% pierwotnej aktywności.

#### 4. Podsumowanie

Rekombinowana  $\beta$ -galaktozydaza z *Pyrococcus woesei*, unieruchomiona poprzez katalizowane transglutaminazą „sieciovanie” na żelu krzemionkowym, charakteryzuje się niewielką wrażliwością na zmiany pH w zakresie odpowiadającym kwasowości mleka i serwatki. Duża termostabilność preparatu umożliwia jego zastosowanie do hydrolizy laktozy w reaktorze działającym w podwyższonej temperaturze, hamującej lub znacznie ograniczającej rozwój niepożądanych drobnoustrojów. W celu dalszego zwiększenia stabilności preparatu podczas hydrolizy laktozy w reaktorze kolumnowym prowadzone są prace zmierzające do takiej modyfikacji żelu krzemionkowego, która umożliwi katalizowane transglutaminazą wytworzenie bezpośrednich, trwałych wiązań pomiędzy warstwą zagregowanego enzymu a nośnikiem.

## Literatura

1. Synowiecki J., Maciuńska J., (1999), *Medycyna Wet.*, 55(8), 497-500.
2. Ladero M., Perez M. T., Santos A., Garcia-Ochoa F., (2003), *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 241-252.
3. Tischer W., Kasche V., (1999), *TIBTECH*, 17, 326-335.
4. Tischer W., Wedekind F., (1999), *Topics Curr. Chem.*, 200, 95-126.
5. Pessela B. C., Mateo C., Fuentes M., Vian A., Garcia J. L., Carrascosa A. V., Giusan J. M., Fernandez-Lafuente R., (2003), *Enzyme Microbial Technol.*, 33, 199-205.
6. Petzelbauer I., Nidetzky Y., Haltrich D., Kulbe K. D., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 322-332.
7. Weetall H. H., Detar C., (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 295-297.
8. Turkiewicz M., Makowski K., (2004), *Biotechnologia*, 3(66), 113-128.
9. Cao L., van Lagen L., Sheldon A., (2003), *Curr. Opinion Biotechnol.*, 14, 387-394.
10. Synowiecki J., Maciuńska J., (2002), *J. Food Biochem.*, 26, 49-62.
11. Dąbrowski S., Sobiewska G., Maciuńska J., Synowiecki J., Kur J., (2000), *Protein Expression Purif.*, 19, 107-112.
12. Craven G. R., Steers E., Anfinsen C. B., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 2468-2477.
13. Nickerson T. A., Vujčić I. F., Lin A. Y., (1972), *J. Dairy Sci.*, 3(59), 386-390.
14. Maciuńska J., Scibisz M., Synowiecki J., (2000), *J. Biol. Chem.*, 24, 299-310.