

Изследване на оптималните условия за имобилизация на ацетилхолинестераза върху модифицирани мембрани от акрилонитрилов съполимер

Катя Габровска, Цонка Годжевъргова, Настя Василева, Данка Иванова

Study of optimum conditions for immobilization of Achetylcholinesterase onto modified acrylonitrile copolymer membranes: Two ultrafiltration membranes from AN copolymer were preliminarily modified by 15% NaOH + 10% ethylenediamine and 15% NaOH + chitosan. They were used as matrix for covalent immobilization of Achetylcholinesterase (AChE) by using glutaraldehyde. The optimum conditions for immobilization of AChE were studied. The optimum concentration of AChE solution for immobilization was 0,05%. The optimum incubation time for immobilization of enzyme was 20 hours. The optimum temperature for immobilization of AChE was 4^oC..

Key words: Membranes, Modification, Immobilization, Achetylcholinesterasel.

ВЪВЕДЕНИЕ

За провеждане на имобилизацията на ензими се използват различни видове носители, като всеки вид носител се характеризира с определени предимства и недостатъци (Кръстева, 1998). Полимерните порести мембрани са много подходящи за имобилизация на ензими и намират широко приложение за тази цел.

Имобилизираните ензими върху порести мембрани намират широко приложение за изготвяне на биосензори за анализ на редица компоненти, за мембранни биореактори, с помощта на които се осъществяват ценни технологични процеси и др. [4,9,15,19].

Прилагането на допълнителна повърхностна модификация на полимерните мембрани води до увеличаване на количеството реакционни групи на повърхността на мембраните. Изходните мембрани от АН съполимер не съдържат активни групи и за да бъдат използвани като носители за имобилизация на ензими, те трябва да се модифицират с различни модифициращи агенти [1,2,6,13].

Друг често използван носител за имобилизацията на ензими е хитозанът, в чиято структура има хидроксилни и аминокиселинни групи, подходящи за ковалентна имобилизация [3,8,11,12].

В последните години се работи много за създаване на различни ензимни биосензори за определяне на инхибитори (различни органофосфорни, карбаматни и други пестициди). Те намират приложение и в различни програми по проследяване на замърсяването на околната среда.

Ацетилхолинестеразата (АХЕ) е ензим, който катализира хидролитичното разграждане на ацетилхолин йодида до холин и оцетна киселина. Съществуват редица публикации за имобилизация на ацетилхолинестераза върху различни носители [10,16 -18,20]. Последните са използвани за конструиране на биосензори за определяне на инхибиращото действие на пестициди.

В настоящата работа е проведена ковалентна имобилизация на ензима АХЕ, с помощта на глутаров алдехид (ГА) върху два вида модифицирани мембрани: с NaOH + ЕДА и с хитозан. Целта е да се изследват оптималните условия за имобилизация: концентрация на разтвора на АХЕ; време за инкубация на ензима; оптимална температура за имобилизация.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали и реагенти

Като носител за провеждане на имобилизацията на ацетилхолинестераза са използвани мембрани от акрилонитрилов съполимер (акрилонитрил – 91,3%, метилметакрилат – 7,3%, натриев винилсулфонат – 1,4%).

Повърхностната модификация на мембраните от акрилонитрилов съполимер се провежда със следните реактиви: NaOH, етилендиамин, хитозан, (Fluka, Швейцария).

Имобилизацията на ацетилхолинестераза (ЕК 3.1.1.7, 403 U/mg, изолирана от *Leectrophorus electricus* (electric eel)), (Sigma, Германия) се извършва с глутаров алдехид (Fluka, Швейцария) върху мембраните от акрилонитрилов съполимер.

2. Химични модификации на ултрафилтрационни мембрани от АН съполимер

2.1. Модификация с NaOH + ЕДА

Модификацията на мембраните от АН съполимер е извършена по методика, описана в наша по-предишна работа [7].

2.2. Модификация с хитозан

Мембрана, предварително модифицирана с NaOH по точка 2.1 се поставя в УФ клетка (Amicon, повърхност 10 cm^2 , 600 min^{-1}). Приготвя се 0,25% разтвор на хитозан във воден разтвор на оцетна киселина (2%), който се пропуска през ПАН мембрана при $P=2 \times 10^5\text{ Pa}$ за 10 s. Следва сушене на мембраната при 60°C за 15 min. Така получения хитозан-ацетатен слой се превръща в хитозан чрез филтруване на разтвор на NaOH (1M разтвор в спиртно-водна смес 1:1) през мембраната за 3 min при същото налягане и разбъркване. За да се отстрани NaOH мембраната се филтрува с разтвор на спирт-вода 1:1 за 2 min при същите условия. Накрая модифицираната мембрана се промива обилно с дестилирана вода.

3. Имобилизация на ацетилхолинестераза

В епруветка се поставя активирана мембрана (1 cm^2) в 25% разтвор на ГА (pH 7) за 1 h при температура 4°C . Мембраната се промива с 4 l дестилирана вода до пълното отстраняване на нереагиралия ГА и към нея се прибавя 1 ml 0,05% разтвор на ацетилхолинестераза (в натриевофосфатен буфер с pH 7). Мембраната престоява в ензимния разтвор 20 h при температура 4°C . Имобилизираният ензим и мембраната се отмиват с 2 l бидестилирана вода и 100 ml 0,1 M разтвор на фосфатен буфер.

4. Анализи

Количеството на свързан белтък върху ултрафилтрационните мембрани от АН съполимер се определя по метода на Lowry et al. [14].

Активността на свободната и имобилизирана АХЕ се определя по метода на Ellman [5].

Относителната активност на имобилизирана АХЕ се определя като отношение между специфичната активност на имобилизирания и сводния ензим, умножено по сто.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Като носител за провеждане на имобилизацията на ацетилхолинестеразата са използвани мембрани от акрилонитрилов съполимер. Тъй като в тези мембрани липсват реакционноспособни групи, към които ковалентно да бъде присъединен ензим, то възниква необходимостта от допълнителна обработка. Много подходяща модификация с цел въвеждане на активни групи в ПАН мембраната е допълнителната обработка с втори полимер. По такъв начин модифицирания полимер се нанася във вид на тънък филм и се получава наноструктурирана, композитна мембрана. За тази цел много подходящ полимер е хитозана, тъй като той е водоразтворим полимер и съдържа висока концентрация на аминогрупи. Изходната мембрана се обработва с разтвор на NaOH, при което се получават карбоксилни и амидни групи. Следва обработка с 0,25% хитозан, при което се създават йонни връзки между карбоксилните групи на мембраната и аминокрупите на хитозана (Мембрана №1).

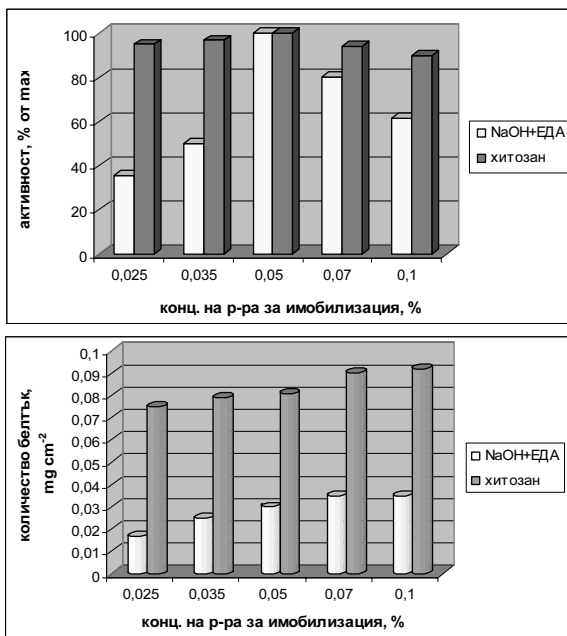
Паралелно е направена и химична модификация на ПАН мембрана с NaOH+ЕДА (Мембрана №2). При тази модификация, на първия етап на обработка (с

NaOH), се получават amidни и карбоксилни групи, а на втория етап (с ЕДА) получените карбоксилни групи се превръщат в аминок групи.

Основната цел на това изследване е да се избере кой от двата вида модифицирани носители е по-подходящ за имобилизация на ензима ацетилхолинестераза.

Проведена е ковалентна имобилизация на ензима АХЕ върху двата вида модифицирани мембрани с помощта на glutаров алдехид.

Изследвани са оптималните условия за имобилизация. За целта първо е варирана концентрацията на разтвора на АХЕ, използван за провеждане на имобилизацията, в интервала от 0,025 до 0,1%. Резултатите са представени на фиг.1.

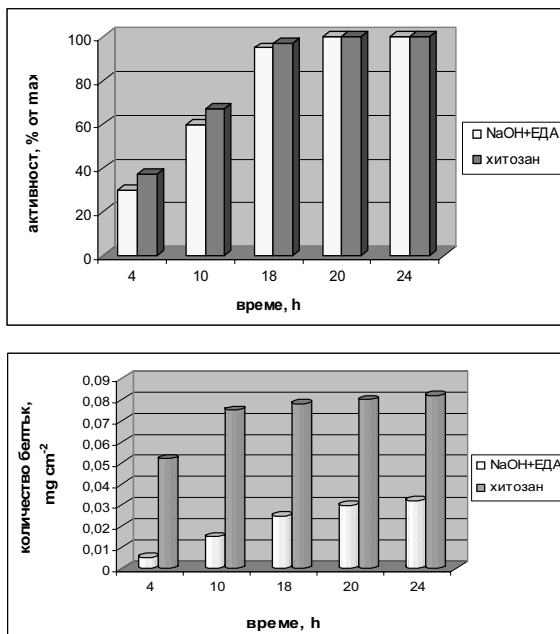


Фиг. 1. Влияние на концентрацията на ензимния разтвор за имобилизация върху активността на АХЕ и количеството свързан белтък върху мембрана модифицирана с NaOH+ЕДА и мембрана модифицирана с хитозан

*Имобилизацията е проведена при температура 4°C и време 20 часа.

Вижда се, че оптималната активност на имобилизираната АХЕ е най-висока при прилагането на 0,05% разтвор на АХЕ. Установено е, че с увеличаване на концентрацията на АХЕ, количеството на свързания белтък се увеличава. Така при имобилизационен разтвор на АХЕ 0,1% то е най-голямо – 0,035 mg cm⁻² и 0,092 mg cm⁻², съответно за мембрана №1 и №2. По-голямото количество свързан белтък върху мембрана №2 се дължи на по-голямото количество въведени аминок групи в резултат на допълнителната обработка с хитозан. Забелязва се, че при по-голямо количество на свързан белтък, относителната активност на имобилизираната АХЕ намалява. Това се дължи на локално натрупване на белтък, в резултат на което се затруднява дифузията на субстрата до активния център на ензима. Следователно, оптималната концентрация на разтвора за имобилизация е 0,05%.

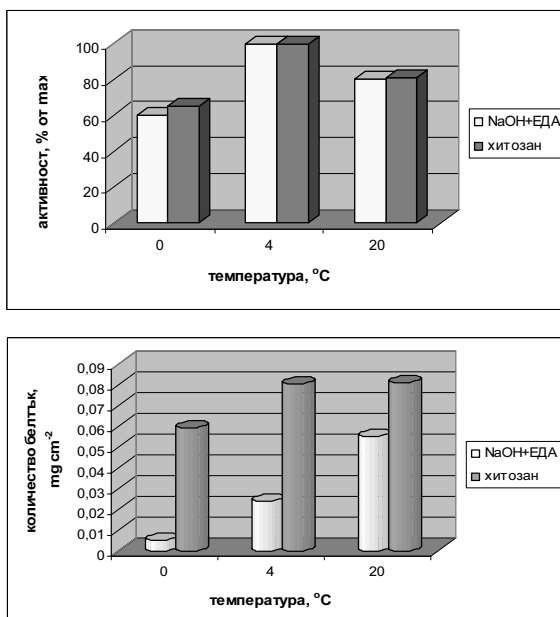
Изследвано е времето за инкубация на ензима върху двата носителя. За целта е варирано времето за имобилизация от 4 до 24 часа. Проследени са отново относителната активност на имобилизираната АХЕ и количеството свързан белтък (фиг.2). Установено е, че с увеличаване на инкубационното време се увеличава относителната активност на имобилизираната АХЕ и количеството свързан ензим върху двата носителя, като след 20^{-тия} час се стига до равновесие. Следователно, оптималното време за имобилизация на АХЕ е 20 часа.



Фиг. 2. Влияние на времето за имобилизация върху активността на АХЕ и количеството свързан белтък върху мембрана модифицирана с NaOH+ЕДА и мембрана модифицирана с хитозан

*Имобилизацията е проведена при температура 4°C и концентрация на ензимния разтвор-0,05%.

За пълно охарактеризиране на условията за имобилизация на АХЕ бе определена и оптималната температура за имобилизация (фиг.3). Тя бе варирана в интервала от 0 до 20 °C. Експерименти над 20°C не са проведени, тъй като активността на ензима намалява по време на процеса имобилизация – 20 часа. Установено е, че относителната активност на имобилизираната АХЕ и върху мембрана №1 и №2 е най-висока при температура 4°C. Резултатите показват, че оптималната температура за имобилизация на АХЕ е 4°C.



Фиг. 3. Влияние на температурата за имобилизация върху активността на АХЕ и количеството свързан белтък върху мембрана модифицирана с NaOH+ЕДА и мембрана модифицирана с хитозан

*Имобилизацията е проведена при концентрация на ензимния разтвор – 0,05% и време – 20 часа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведена е ковалентна имобилизация на ензима АХЕ върху мембрани от АН съполимер, модифицирани с NaOH + ЕДА и с хитозан.

2. Изследвани са оптималните условия за имобилизация: концентрация на разтвора на АХЕ; време за инкубация на ензима; оптимална температура за имобилизация.

2.1. Оптималната концентрация на разтвора на АХЕ за имобилизация е 0,05%.

2.2. Оптималното време за имобилизация на АХЕ е 20 часа.

2.3. Оптималната температура за имобилизация на АХЕ е 4°C.

ЛИТЕРАТУРА

[1]. Chaing W., C. Hu - Studies of reactions with polymers. IV. Modification of PAN with primary amines, *J. Appl. Polym. Sci.*, 28, 1990, 1623-1636.

[2]. Chang L., L. Anderson, D. Ley - Surface modified polyacrylonitrile substrates, US Patent 5 194 512, 1993.

[3]. Chellapandian M., M. Krishnan - Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) copolymer for immobilization of urease, *Process Biochemistry*, 33, 1998, 595-600.

[4]. El Habib R., P. Coulet, K. Sanhadji, D. Cauteron, M. Laville, J. Traeger - DNA immobilized onto an acyl-azide derivate of collagen membranes for as immunoabsorbent. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1984, 665-669.

[5]. Ellman G.L., K.D Courtney, Jr.V Andres, B.C. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 1961, 88.

- [6]. Godjevargova T., A. Dimov, N. Vasileva - Immobilization of glucose oxidase onto membranes of modified acrylonitrile copolymer, *J. Appl. Polym. Sci.*, 54, 1994, 355-359.
- [7]. Godjevargova T. I., K. I. Gabrovska, N. V. Ivanova – Copper (II) determination by immobilized urease inhibition in a spectrometric flow-injection system, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 19, 2, 2005, 202-210.
- [8]. Hirano S., O. Miura - Alkaline phosphatase and pepsin immobilized in gels, *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1979, 711-714.
- [9]. Kennedy J., J. Cabral in: *Solid-Phase Biochemistry*, John Wiley&Sons, New York, 66, 1983, 253-391.
- [10]. Kok F.N., F. Bozoglu, V. Hasirci - Immobilization of acetylcholinesterase and cholin oxidase on pHEMA membrane for biosensor construction, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12, 2001, 1161-1176.
- [11]. Krajewska B. - Urease immobilized on chitosan membrane. Inactivation by heavy metal ions, *J. Chem. Biotechnol.*, 52, 1991, 157-162.
- [12]. Krajewska B., M. Leszko, W. Zaborska - Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 48, 1990, 337-350.
- [13]. Lin C.C., M.C. Yang - Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease: storage and operation stability, *Biomaterials*, 24, 2003, 1989-1994.
- [14]. Lowry H., N. Rosenbough, H. Farr, *J. Chem.*, 193, 1951, 265.
- [15]. Maisterrena B, G Bardeletti, P.Coulet - Product distribution in diffusion-cell compartments separated by an immobilized enzyme membrane, *J. Membr. Sci.*, 22, 1985, 175-186.
- [16]. Nunes G.S., G. Jeanty, J.-L. Marty - Enzyme immobilization procedures used for the detection of acetylcholinesterase pesticides, *Analytica Chimica Acta*, 523, 1, 2004, 107-115.
- [17]. Sahin F., G. Demirel, H. Tunturk - A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase, *International journal of biological macromolecules*, 37, 2005, 148-153.
- [18]. Singh A.K., A.W. Flounders, J.V. Volponi, C.S. Ashley, K. Wally, J.S. Schoeniager - Development of sensors for direct detection of organophosphates. I. Immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 8-9, 1999, 703-713.
- [19]. Staude, E., W. Jorisch - Heterogene ultrafiltrationmembranen zur fixierung von enzymen, *Angew. Makromol. Chem.*, 96, 1981, 21-36.
- [20]. Vakurov A., C.E. Simpson, C.L. Daly, T.D. Gibson, P.A. Millner - Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 11, 2005, 2324-2329.

За контакти:

1. гл.ас. д-р Катя Габровска, Бургаски университет “проф. д-р Асен Златаров”, тел. 056/858353, e-mail gabrovska@mail.bg
2. доц. д-р инж. Цонка Годжевъргова, Бургаски университет “проф. д-р Асен Златаров”, тел. 056/858353, e-mail godjevargova@yahoo.com
3. доц. д-р инж. Настя Василева, Филиал – Разград, Русенски университет „Ангел Кънчев”, тел. 084/611012, e-mail: nastiav2001@yahoo.com
4. гл.ас. д-р Данка Иванова, Бургаски университет “проф. д-р Асен Златаров”, тел. 056/858353

Докладът е рецензиран