



West Pomeranian  
University of Technology  
Szczecin



# BIOIMMOBILIZACJA

*Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa*

**Centrum Bioimmobilizacji  
i Innowacyjnych Materiałów  
Opakowaniowych**



ul. Klemensa Janickiego 35  
71-270 Szczecin



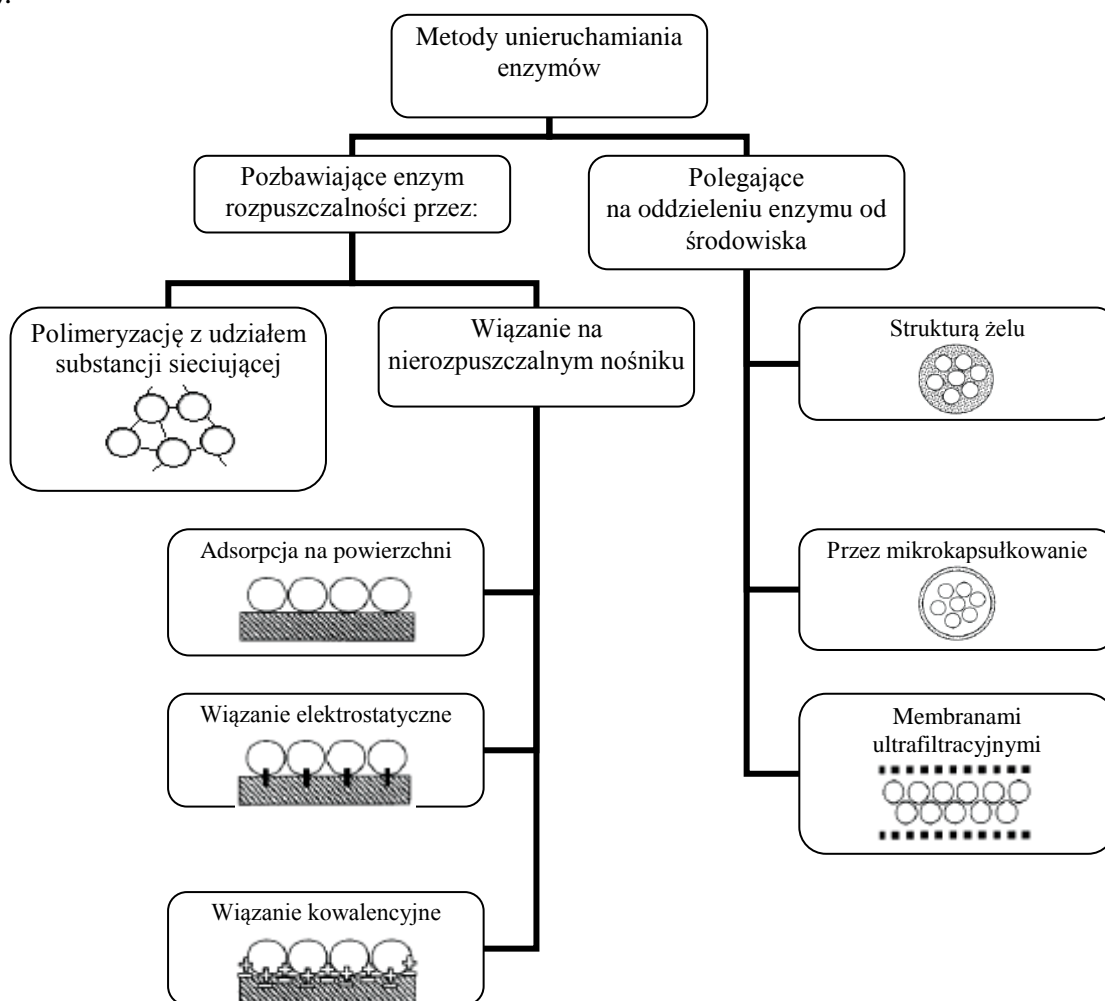
## Ćwiczenie 1

# Laktaza

## Mikrokapsułkowanie enzymu

W zakresie techniki stosowania enzymów, rozwijanym obecnie kierunkiem badawczym i wdrożeniowym jest wytwarzanie preparatów enzymów unieruchomionych (immobilizowanych) na nośnikach stałych, a mimo to działających w sposób zbliżony do katalizy homogenicznej.

**Sposoby immobilizacji.** Immobilizowanymi enzymami są preparaty utworzone przez połączenie biokatalizatora z nośnikiem nierozpuszczalnym w środowisku reakcji, a także nierozpuszczalne agregaty cząsteczek lub kryształów białka oraz enzymy zamknięte w strukturze żelu lub oddzielone od środowiska reakcji półprzepuszczalnymi membranami (rys. 1).



Rys. 1. Główne sposoby immobilizacji enzymów (mod. Synowiecki i Wołosowska, 2007; Bonin 2008)

Najwcześniej stosowane sposoby immobilizacji polegały na przyłączeniu enzymu do powierzchni nośnika. Odbywa się to przez fizyczną adsorpcję biokatalizatora, wiązanie z udziałem oddziaływań jonowych lub przez wytworzenie wiązań kowalencyjnych. Jeżeli bezpośrednia reakcja pomiędzy białkiem a nośnikiem nie jest możliwa stosuje się substancje posiadające co najmniej dwie grupy chemiczne zdolne do reakcji zarówno z nośnikiem, jak i enzymem. Zwiększają one odległość pomiędzy cząsteczkami unieruchomionego enzymu a powierzchnią nośnika, co ułatwia dostęp substratu do centrum katalitycznego.

W przypadku, gdy nie ma potrzeby zbyt trwałego wiązania enzymu jako nośniki można wykorzystać rozmaite sorbenty, których zaletą jest nieskomplikowana procedura immobilizacji oraz możliwość łatwej regeneracji poprzez wymycie nieaktywnego już białka. Nie następują też zazwyczaj zmiany struktury cząsteczek enzymu, które mogą spowodować zmniejszenie jego aktywności. Niewielka energia uczestniczących w wiązaniu białka

oddziaływań jest jednak przyczyną dość szybkiej desorpcji enzymu podczas działania reaktora.

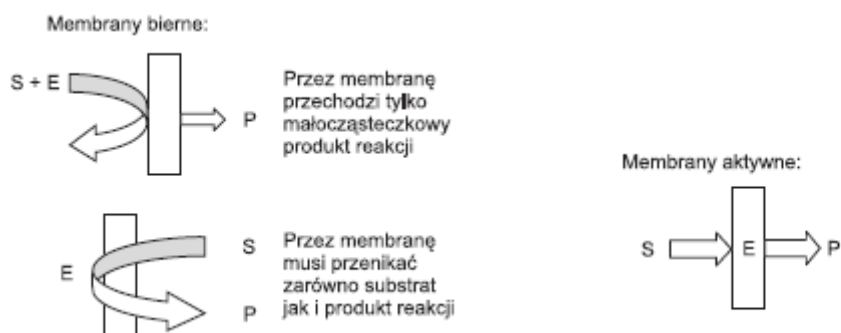
Silniejsze wiązanie zapewniają oddziaływania jonowe powstające w zakresie pH, przy którym zarówno enzym, jak i nośnik uzyskują ładunek elektryczny. Jeżeli grupy funkcyjne enzymu i nośnika mają ładunek jednakowego znaku do zaistnienia wiązania niezbędne są dwuwartościowe kationy, sprzęgające białko za pośrednictwem mostków.

Zmniejszenia aktywności operacyjnej preparatu spowodowanego desorpcją enzymu można uniknąć wykorzystując procedury immobilizacji polegające na wytwarzaniu wiązań kowalencyjnych w warunkach nie powodujących denaturacji białka. Jako nośniki przydatne są m.in. polimery zawierające wolne grupy aminowe. Nośniki pozbawione grup chemicznych tworzących wiązania kowalencyjne z białkiem lub substancją sprzęgającą, jak np. szkło porowate, żel krzemionkowy, tlenki metali lub rozmaite substancje ceramiczne poddaje się aktywacji. Negatywnym skutkiem kowalencyjnego wiązania enzymu jest zmniejszenie aktywności preparatu spowodowane zmianami struktury cząsteczek białka oraz ograniczeniem dostępu substratu do centrum katalitycznego.

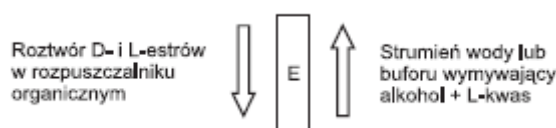
Inne sposoby otrzymywania nierozpuszczalnych preparatów enzymów polegają na międzycząsteczkowym usieciowaniu biokatalizatora za pośrednictwem wiązań wytworzonych z substancjami dwufunkcyjnymi, takimi jak np. aldehyd glutarowy i inne polialdehydy. W zależności od sposobu przygotowania białka i warunków sieciowania uzyskiwane są preparaty różniące się aktywnością, termostabilnością, odpornością na działanie substancji denaturujących białka i wytrzymałością mechaniczną. Immobilizowany w ten sposób enzym charakteryzuje się wprawdzie polepszoną termostabilnością, ale trudno jest wytworzyć preparaty o powtarzalnych właściwościach ze względu na duży wpływ niewielkich nawet zmian stężenia substancji sieciującej oraz pH i temperatury środowiska reakcji. Niekorzystnym skutkiem sieciowania rozpuszczonych białek jest zmniejszenie aktywności enzymu (niekiedy nawet ponad 50%).

Do immobilizacji enzymów można też wykorzystać błony o selektywnej przepuszczalności, spełniające wyłącznie funkcję separacyjną, bądź też zarówno funkcję separacyjną, jak i katalityczną. Biokatalizatory albo zamyka się we wnętrzu kapsułki, której otoczkę stanowi błona o selektywnej przepuszczalności, wówczas mówimy o mikrokapsułkowaniu, albo biokatalizator jest oddzielony od środowiska przegrodą membranową. Do mikrokapsułkowania konieczne jest stosowanie błon przepuszczających zarówno cząsteczki substratów, jak i produktów reakcji, natomiast uniemożliwiające migrację cząsteczek biokatalizatora. Aktywność unieruchomionych w ten sposób enzymów zależy głównie od szybkości dyfuzji substratu i produktu reakcji przez stosowane membrany. Nie zawierające enzymu membrany bierne służą do zamknięcia roztworu biokatalizatora w mikrokapsułce lub w module reaktora. Membrany zatrzymujące tylko cząsteczki substratu są natomiast przydatne do oddzielenia produktów reakcji od zawierającej rozpuszczony enzym mieszaniny reakcyjnej (rys. 2).

Membrany aktywne katalitycznie, które zawierają enzym umiejscowiony w ich strukturze lub osadzony na powierzchni polimeru są często używane do katalizowania reakcji wytwarzających produkty różniące się od substratów rozpuszczalnością w fazie rozpuszczalnika organicznego i wody. Przykładem ich zastosowania jest wyodrębnianie jednego ze składników racematu, polegające na katalizowaniu degradacji zbędnego enancjomeru działającym stereoselektywnie enzymem (rys. 3).



Rys. 2. Funkcje membran w reaktorach enzymatycznych (E – enzym, S – substrat, P – produkt) (Synowiecki i Wołosowska, 2007)



Rys. 3. Rozdzielanie mieszaniny D- i L-estrów umieszczoną na granicy faz membraną z immobilizowanym, działającym stereoselektywnie enzymem (Synowiecki i Wołosowska, 2007)

Kolejną metodą unieruchamiania enzymów jest pułapkowanie (inkluzja) w strukturze żelu wytwarzanego po zmieszaniu roztworów enzymu i substancji żelującej. Enzym jest unieruchamiany w matrycy żelu, która najczęściej jest w kształcie kuleczki o średnicy 0,3 – 3 mm, ale może być w formie sferycznej lub dyskowej. Najpowszechniej stosowanymi nośnikami w tej metodzie są: alginian, poza tym kappa-karagenian, chitozan, agar, pektyna, żywice epoksydowe, poliakryloamid. Alginian jest kopolimerem kwasu s-D-mannurowego i  $\alpha$ -L-guluronowego, uzyskanym metodą ekstrakcji z brązowych alg *Phaeophyceae*. W obecności kationów dwuwartościowych (jak  $\text{Ca}^{2+}$ ) kwas alginianowy tworzy żel. Najpowszechniej stosowana technika to zawieszanie enzymu w alginianie sodu i wkraplanie tej mieszaniny do roztworu chlorku wapnia, w ten sposób otrzymuje się porowate kulki z uwieczonym białkiem enzymatycznym.

Mikrokapsułkowanie polega na utworzeniu kapsułek, w których wyróżnia się dwie warstwy; wewnętrzną - rdzeń zawierający enzym oraz zewnętrzną warstwę - osłonkę utworzoną z polimeru (syntetycznego lub naturalnego). Możliwe jest utworzenie kilku warstw osłonki.

**Zalety i wady unieruchomionych enzymów.** Zastosowanie immobilizowanych enzymów stwarza korzyści technologiczne oraz ekonomiczne w porównaniu z tradycyjnymi procesami wykorzystującymi enzymy w stanie wolnym.

Stosując unieruchomione enzymy można osiągnąć obniżenie kosztów i usprawnienie wytwarzania wielu produktów poprzez zapewnienie ciągłości procesu. Istotną zaletą immobilizowanych enzymów jest możliwość łatwego ich usunięcia ze środowiska reakcji po jej zakończeniu. Ich zastosowanie pozwala na wielokrotne wykorzystanie tej samej porcji preparatu w kolejnych szarżach produkcyjnych lub w reaktorach przepływowych oraz eliminuje konieczność inaktywacji enzymu po osiągnięciu pożądanego stopnia konwersji substratu. Stosowanie unieruchomionych enzymów jest także korzystne ze względu na lepszą kontrolę warunków reakcji oraz brak zanieczyszczenia produktu enzymem i innymi substancjami pochodzącymi z nisko oczyszczonego preparatu biokatalizatora.

Unieruchomienie enzymu zachodzi zwykle wskutek wytworzenia specyficznych oddziaływań cząsteczek enzymu z matrycą odpowiednio dobranego nośnika. Ubocznym

efektem tego procesu jest stabilizacja struktury biokatalizatora przeciwdziałająca niekorzystnemu oddziaływaniu środowiska (np. wzrost termostabilności, odporność na substancje denaturujące). Innym pozytywnym efektem immobilizacji enzymów jest obniżenie inhibicji produktami oraz zmiana specyficzności względem inhibitorów, spowodowana prawdopodobnie przekształceniami struktury trzeciorzędowej centrum katalitycznego.

Negatywną konsekwencją procesu sprzęgania enzymu z nośnikiem jest przestrzenne ograniczenie dostępu substratu.

Podczas długotrwałego stosowania preparatu immobilizowanego enzymu następuje stopniowe zmniejszanie jego aktywności katalitycznej spowodowane prawdopodobnie częściową desorpcją biokatalizatora lub jego inaktywacją pod wpływem zbyt wysokiej temperatury reakcji lub nieodpowiedniej kwasowości i siły jonowej środowiska. Innymi przyczynami tego procesu mogą być: blokowanie enzymu cząsteczkami produktu, adsorpcja zanieczyszczeń działających jako inhibitory lub też rozwój drobnoustrojów.

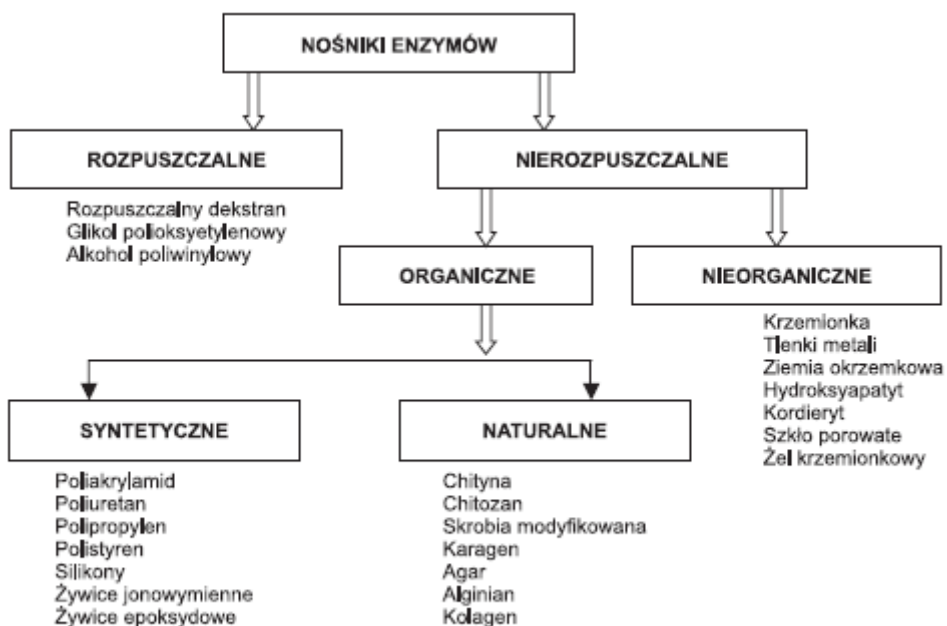
Podstawą dokonania wyboru nośnika i sposobu jego sprzęgania z enzymem powinny być warunki projektowanego procesu i przeznaczenie produktu. Unieruchomione enzymy stosowane do wytwarzania składników żywności nie powinny zanieczyszczać środowiska reakcji nawet śladową ilością substancji o niekorzystnym oddziaływaniu fizjologicznym.

**Rodzaje nośników i ich przydatność.** Aktywność, stabilność operacyjna i koszt preparatu immobilizowanego enzymu zależy w dużym stopniu od właściwości nośnika, które powinny być dostosowane do temperatury, kwasowości, lepkości i polarności środowiska reakcji oraz do konstrukcji używanego reaktora. Oceniając przydatność substancji jako nośnika należy uwzględnić jej powierzchnię właściwą, rozmiary ziaren i ich porowatość, wytrzymałość mechaniczną, ilość, dostępność i rodzaj grup funkcyjnych wiążących enzym oraz zawartość grup hydrofilowych i hydrofobowych.

Substancje używane do immobilizacji enzymów powinny charakteryzować się stabilnością w warunkach katalizowanej reakcji, odpornością na degradację pod wpływem drobnoustrojów oraz gęstością właściwą i wytrzymałością mechaniczną dostosowaną do rodzaju reaktora.

Nośnikami enzymów mogą być polimery syntetyczne lub pochodzenia naturalnego oraz wiele nieorganicznych adsorbentów, takich jak: szkło porowate, żel krzemionkowy, tlenki metali, glinokrzemiany oraz rozmaite substancje ceramiczne poddawane często modyfikacji mającej na celu wprowadzenie grup funkcyjnych wiążących białko (rys. 4). Produkowane aktualnie nośniki są zazwyczaj nierozpuszczalne. Stosuje się jednak także polimery, których rozpuszczalność zależy od warunków środowiska. Wiązanie białka enzymatycznego z takimi substancjami daje możliwość katalizowania reakcji w fazie ciekłej, a następnie strącenia immobilizowanego biokatalizatora po zakończeniu procesu pod wpływem zmian temperatury, pH lub siły jonowej mieszaniny reakcyjnej.

Podjęto także wiele prób stosowania nośników naturalnego pochodzenia, których zaletą jest niski koszt i wyeliminowanie niebezpieczeństwa zanieczyszczenia produktu pozostałościami substancji służących do wytwarzania syntetycznych polimerów. Wykorzystuje się w tym celu rozmaite polisacharydy, białka i związki nieorganiczne, takie jak szkło porowate i żel krzemionkowy.



Rys. 4. Niektóre nośniki stosowane do unieruchamiania enzymów (Synowiecki i Wołosowska, 2007)

### Przykłady zastosowań immobilizowanych enzymów w przemyśle spożywczym

- Immobilizowaną izomerazę ksylozową stosuje się w przepływowych reaktorach służących do wytwarzania fruktozy. Produkowane obecnie preparaty umożliwiają konwersję około 45% glukozy znajdującej się w roztworze substratu.
- Wiele uwagi poświęcono badaniom przydatności immobilizowanej laktazy ( $\beta$ -galaktozydazy) do wytwarzania produktów mlecznych przeznaczonych dla ludzi cierpiących na nietolerancję laktozy lub syropów glukozowo-galaktozowych z permeatu serwatki. Stosowano w tym celu  $\beta$ -galaktozydazy z różnych źródeł unieruchomione na chitynie, chitozanie, rozmaitych sorbentach lub syntetycznych polimerach.

Znaczenie tych badań wynika z konieczności zagospodarowania około 5 mln ton laktozy rocznie, pochodzącej z serowarstwa i produkcji kazeiny. Innym korzystnym skutkiem hydrolizy laktozy jest wyeliminowanie jej oddziaływania na jakość produktów, wynikającego z krystalizacji w obniżonej temperaturze, higroskopijności i zdolności do adsorbowania niepożądanych substancji zapachowych.

- Duże perspektywy ma zastosowanie immobilizowanych lipaz. Ich zaletą jest znaczna aktywność katalityczna w środowisku rozpuszczalników organicznych i na granicy faz różniących się polarnością.
- Unieruchomioną papainę lub pepsynę stosuje się w celu zapobiegania zmętnieniu piwa podczas przechowywania chłodniczego. Wymienione proteazy hydrolizują znajdujące się w piwie białka wytwarzając oligopeptydy i wolne aminokwasy mniej podatne na tworzenie kompleksów z polifenolami strącających się w obniżonej temperaturze.

### Laktaza

Laktaza ( $\beta$ -galaktozydaza) to enzym hydrolityczny rozkładający cząsteczkę laktozy na galaktozę i glukozę. U człowieka laktaza występuje w rąbku szczoteczkowym nabłonka jelita cienkiego a w przypadku jej braku lub niedoboru występuje nietolerancja dwucukru laktozy objawiająca się bolesnymi kolkami, wzdęciami oraz bólami brzucha po spożyciu mleka. Choroba ma podłoże genetyczne; dziedziczona jest w sposób autosomalny recesywny, co

oznacza, że mutacja występuje w chromosomach innych, niż chromosomy płci i ujawnia się jedynie wtedy, kiedy zmutowany gen dziedziczony jest po obydwu rodzicach.

Nietolerancja laktozy u dorosłych charakteryzuje się postępującym wraz z wiekiem zmniejszeniem aktywności laktazy, która w okresie wczesnego dzieciństwa jest prawidłowa. Szacuje się, że objawy nietolerancji laktozy występują w różnym nasileniu u ok. 70% całej populacji ludzkiej. Proces ten zależy od uwarunkowań genetycznych, jest zróżnicowany pomiędzy populacjami i rasami ludzi (nietolerancja laktozy rzadko występuje wśród mieszkańców Europy, często występuje wśród mieszkańców Afryki, Azji i rdziennej ludności Ameryki). Z myślą o ludziach z nietolerancją laktozy, w wielu krajach zaczęto na etapie produkcyjnym poddawać mleko działaniu laktazy.

### Literatura:

1. Czaczyk K., Olejnik A., Mięzał P., Grajek W., 2005. Poszukiwanie prostych modeli do badania adhezji bakterii probiotycznych. *Żywn. Nauk. Technol. Ja.* 1 (42), 84 – 96.
2. De Ory I., Cabrera G., Ramirez M., Blandino A., 2006. Immobilization of cells on polyurethane foam. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and cells*, second edition, edited by Guisan J.M., Humana Press In., Totowa. NJ, 357-365.
3. Dulieu C., Poncelet D., Neufeld R.J., 1999. Encapsulation and immobilization techniques. *Cell encapsulation technology and therapeutics*, Birkhause, Boston, 3-17.
4. Górecka E., Jastrzębska M. 2011, Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnol. Food Sci.* 75 (1), 65-86.
5. Guisan J.M. 2006, Immobilization of enzymes and cells. In: *Methods in Biotechnology*, 2nd ed. Walker JM Eds.: Humana Press, Totowa, USA, 22.
6. Peinado P.A., Moreno J.J., Villaba J.M., Gonzalez-Reyes J.A., Ortega J.M., Mauricio JC. 2006, A new immobilization method and their applications. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 79-84.
7. Poncelet, D., Lencki R., Beaulieu C., Hallé J.P., Neufeld R.J., Fournier A.1992. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation: I Methodology. *Appl. Microbiol. Biot.* 38, 39-45.
8. Tuszyński T., 2008. Immobilizacja drobnoustrojów. Możliwości ich przemysłowego wykorzystania. *Laboratorium* 10, 34 – 38.
9. Verstrepen K.J., Klis F.M. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in Yeasts. *Mol. Microbiol.* 60 (1), 5–15.
10. Woodward J. 1988. Methods of immobilization of microbial cells. *J. Microbiol. Meth.* 8 (1-2), 91-102.
11. Nag A., Han K., Singh H. 2011. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodiumcaseinate and gellan gum, *Int. Dairy J.* 21, 247-253.
12. Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, *J. Food Eng.* 104, 467–483.
13. Annan N.T., Borza A.D., Hansen L.T. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res. Int.* 41, 184–193.
14. Sohail A., Turner M.S., Coombes A., Bostrom T., Bhandari B. 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 145, 162-168.
15. Sohail A., Turner M.S, Coombes A., Bhandari B. 2012. The Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM Following Double Encapsulation in Alginate and Maltodextrin. *Food Bioprocess Technol.* 6 (10), 2763-2769.
16. Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. 2013. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production, *J. Nutr. Met.* 10, 1-15.
17. Kączkowski J. 2005. Podstawy biochemii. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa.
18. Synowiecki J., Wołosowska S. 2007. Otrzymywanie i niektóre zastosowania unieruchomionych enzymów. *Biotechnologia.* 2: 7-26.

19. Bonin S. Mikroorganizmy immobilizowane. Agro Przemysł. 2: 20-23.
20. Paweł Szablewski Trawienie mleka przez dorosłych jest niezwykle zdolnością Europejczyków. [www.biotechnolog.pl](http://www.biotechnolog.pl)
21. Nietolerancja laktozy u osób dorosłych. <http://www.4slim.pl/porady-dietetyczne/39-porady-dietetyczne/74-nietolerancja-laktozy.html>

## **Część doświadczalna**



## Ćwiczenie 1

### Laktaza - Immobilizacja enzymu

1. Przygotować 1% roztwór alginianu sodu
2. Do zlewki o objętości 100 cm<sup>3</sup> nalać 30 ml 1% roztworu alginianu sodu. Następnie do zlewki dodać enzym laktaza stanowiący rdzeń kapsułki. Do zlewki wrzucić mieszadełko i jej zawartość dokładnie wymieszać na mieszadle magnetycznym (5 min.).
3. Przygotować 200 ml 1% roztworu chlorku wapnia (2 g CaCl<sub>2</sub> rozpuścić w 198 g wody destylowanej).
4. Zlewkę zawierającą roztwór CaCl<sub>2</sub> (i mieszadełko) postawić na mieszadle mechanicznym (włączyć urządzenie).
5. Mieszaninę enzymu i alginianu pobrać do strzykawki i przez igłę delikatnie wkraplać do zlewki z CaCl<sub>2</sub>. Należy uważać, aby końcówka strzykawki nie zetknęła się z roztworem CaCl<sub>2</sub>. Po wkropleniu całości należy dokładnie umyć strzykawkę i igłę z pozostałości alginianu!
6. Pozostawić kulki z immobilizowanym enzymem w roztworze CaCl<sub>2</sub> przez 10 minut w celu ich utwardzenia.
7. Odcedzić powstałe kulki alginianowe z roztworu CaCl<sub>2</sub> za pomocą sitka (przelewając zawartość przez sitko do drugiej zlewki), następnie kapsułki przemyć 100 ml wody destylowanej i pozostawić, aż odciekną.
8. Kulkami z unieruchomioną laktazą należy wypełnić cylinder strzykawki (obj. 10 ml) służący jako kolumna. W tym celu należy wyjąć tłoczek ze strzykawki, umieścić w środku kawałek gazy i ubić go delikatnie tak, aby grubość warstwy nie przekraczała 1 cm. Gaza zapobiegnie blokowaniu wylotu cylindra strzykawki przez kulki z enzymem.
9. Za pomocą łyżeczki do strzykawki wprowadzić kulki z unieruchomionym w alginianie enzymem.
10. Przez tak przygotowaną kolumnę przelać powoli 10 ml 1% roztworu laktozy. Otrzymaną frakcję zebrać ponownie do zlewki i czynność powtarzać wielokrotnie przez 5 minut.
11. W celu wykazania efektu aktywności laktazy należy wykonać próbę Wöhlkego, pozwalającej na odróżnienie jednocukrów.  
Przygotować 3 szklane probówki:
  - a) do pierwszej probówki wprowadzić 2 ml 1% roztworu glukozy,
  - b) do drugiej probówki wprowadzić 2 ml 1% roztworu laktozy,

c) do trzeciej probówki wprowadzić 2 ml 1% roztworu laktozy zebranej po wielokrotnym przesączaniu przez kolumnę wypełnioną kulkami z immobilizowaną laktazą.

12. Do probówek dodać po 2 ml 2,5% roztworu amoniaku i po 2 krople 3% roztworu KOH. Probówki należy wstawić do wrzącej łaźni wodnej i ogrzewać kilka minut pod wyciągiem (o pomoc poprosić prowadzącego). Obserwować powstałe zabarwienie.

Wyjaśnienie:

W czasie ogrzewania roztworu laktozy (albo maltozy) z amoniakiem w obecności KOH powstaje czerwone zabarwienie, natomiast glukoza i fruktoza dają zabarwienie żółtobrązowe.

## KARTA PRACY ĆWICZENIE NR 1

Grupa .....

Imię i nazwisko:

1. ....
2. ....
3. ....
4. ....

<b>Próbka</b>	<b>1%</b>	<b>1% laktoza</b>	<b>1% laktoza (zebrana po przesączaniu)</b>
<b>Zabarwienie roztworu</b>			

Wnioski: