

Joanna Bodakowska-Boczniewicz, Zbigniew Garncarek

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

e-mails: joanna.bodakowska@ue.wroc.pl; zbigniew.garncarek@ue.wroc.pl

IMMOBILIZACJA NARINGINAZY Z *PENICILLIUM DECUMBENS* NA MAGNETYCZNYCH NOŚNIKACH POLISACHARYDOWYCH

IMMOBILIZATION OF NARINGINASE FROM *PENICILLIUM DECUMBENS* ON POLYSACCHARIDE-COATED MAGNETIC PARTICLES

DOI: 10.15611/pn.2018.542.01

JEL Classification: L66

Streszczenie: Naringinaza z *Penicillium decumbens* została unieruchomiona na aktywowanych nośnikach polisacharydowych o właściwościach magnetycznych. W badaniach wykorzystano gumę guar, karobową, tragakantową, ksantanową oraz karagenianin. Nośniki otrzymano poprzez pokrycie mikrocząsteczek magnetytu (Fe_3O_4) polisacharydem, a następnie aktywując je aldehydem glutarowym lub polietylenoiminą. Celem niniejszej pracy była immobilizacja naringinazy z *P. decumbens* na magnetycznych nośnikach polisacharydowych oraz charakterystyka otrzymanego biokatalizatora. Najwyższą aktywność enzymu uzyskano poprzez immobilizację naringinazy na nośniku otrzymanym na bazie gumy karobowej aktywowanej polietylenoiminą. Immobilizacja naringinazy na tak otrzymanym nośniku wpływała na zmniejszenie optymalnej wartości pH oraz optymalnej temperatury aktywności badanego enzymu. Immobilizacja powodowała zwiększenie wartości stałej Michaelisa oraz zmniejszenie maksymalnej szybkości reakcji w porównaniu z enzymem wolnym.

Słowa kluczowe: naringinaza, immobilizacja enzymów, polisacharydy.

Summary: Naringinase from *Penicillium decumbens* was immobilized on activated polysaccharide supported with magnetic properties. Magnetic microparticles were prepared by coating a magnetite (Fe_3O_4) with a polysaccharide followed by activating with glutaraldehyde or polyethyleneimine. Guar gums, locust bean, tragacanth, xanthan and carrageenan were used in the research. The main goals of this work were the immobilization of naringinase on magnetic polysaccharide carriers and the characterization of such immobilized enzyme. The naringinase immobilized on a carrier obtained on the basis of carob gum activated with polyethyleneimine had the highest activity. The immobilization of the naringinase on the carrier thus obtained influenced the reduction of the optimal pH value and the optimal temperature. Immobilization increased the Michaelis constant value and decreased the maximum reaction rate, as compared to the free enzyme.

Keywords: naringinase, enzyme immobilization, polysaccharides.

1. Wstęp

Naringinaza, enzym zawierający dwie podjednostki, α -L-ramnozydazę (EC 3.2.1.40) i β Dglukozydazę (EC 3.2.1.21), odgrywa znaczącą rolę w technologii żywności i farmacji [Puri 2012]. W szczególności hydrolizuje ona naringinę – flawonoid występujący w sokach owoców cytrusowych, nadający im gorzki smak. Hydrolizując naringinę do naringeniny, można znacznie zmniejszyć natężenie gorzkiego smaku w sokach cytrusowych, przy jednoczesnym zachowaniu ich własności prozdrowotnych [Zhu i in. 2017; Cavia-Saiz i in. 2011]. Ponadto naringinaza pozwala na zwiększenie aromatu soków owocowych, wina, moszczu i innych napojów [Olsen, Alfred 1974; Puri i in. 1996; Busto i in. 2007; González-Pombo i in. 2014; Alvarenga i in. 2013]. Naringinaza znajduje również zastosowanie w wytwarzaniu antybiotyku glikopeptydowego, chloropolisporu C, poprzez usunięcie reszty ramnozy z chloropolisporiny B [Sankyo 1988], i steroidów [Elujoba, Hardman 1987] oraz deglikozytacji flawonoidów [Vila-Real i in. 2010].

Zastosowanie wolnych enzymów, w tym naringinazy, stwarza szereg praktycznych trudności związanych m.in. z niemożliwością oddzielenia enzymu od układu i wielokrotnego użycia i przede wszystkim wrażliwością enzymów na warunki procesu inne niż optymalne [Krajewska 2004]. Korzystniejsze jest zastosowanie immobilizowanego biokatalizatora, który można łatwo odzyskać i ponownie wykorzystać, co przyczynia się do redukcji kosztów procesu [Rajdeo i in. 2016]. Istnieje kilka metod unieruchamiania enzymów. Jedną z nich jest ich immobilizacja na powierzchni nośnika, za pomocą oddziaływań fizycznych lub chemicznych, wśród których wymienia się m.in. adsorpcję [Bakuła i in. 2013]. W celu efektywnego związania biokatalizatora nośnik może być poddany aktywacji i modyfikacji [Bolibok i in. 2016]. Nośnik zawierający aldehydowe grupy funkcyjne poddaje się działaniu polimerów jonowych z grupami NH_2 , takimi jak polietylenoimina (PEI). Alternatywnie, szkielet polimerowy zawierający grupy aminowe aktywuje się za pomocą odczynnika zawierającego grupy aldehydowe, np. aldehydem glutarowym (AG) [Rajdeo i in. 2016].

W ostatnim czasie szczególne zainteresowanie badaczy skierowane jest na zastosowanie nośników magnetycznych. Największą zaletą ich stosowania jest szybkie i łatwe oddzielenie enzymu od medium reakcyjnego dzięki wykorzystaniu pola magnetycznego. Wiąże się to ze zmniejszeniem kosztów wytwarzania i wykorzystania enzymów [Jiang i in. 2005]. Zastosowanie magnetycznych nośników jest szczególnie istotne w przypadku oddzielenia immobilizowanego enzymu od świeżo wyciśniętego soku cytrusowego, który jest mieszaniną niejednorodną [Soria i in. 2012]. W przypadku świeżego soku zastosowanie technik takich jak filtracja czy sedymentacja wiązałoby się z utratą miąższu soku. Najbardziej rozpowszechnionym materiałem do otrzymywania magnetycznych nośników stosowanych w żywności jest tlenek żelaza Fe_3O_4 . Nośniki otrzymane na jego bazie są nietoksyczne, biokompatybilne oraz nie wykazują właściwości magnetycznych po usunięciu zewnętrznego pola magnetycznego [Cao i in. 2012].

Liczną grupą nośników używanych do immobilizacji enzymów są nośniki pochodzenia naturalnego. Ich niewątpliwą zaletą jest niski koszt [Synowiecki, Wołosowska 2007], biokompatybilność oraz dopuszczenie tych związków do stosowania jako dodatków do żywności [Dembczyński, Jankowski 2004]. Wykorzystuje się w tym celu m.in. białka, szkło porowate, żel krzemionkowy oraz polisacharydy [Synowiecki, Wołosowska 2007].

Wybór metody immobilizacji enzymu zależy od jego zastosowania, rodzaju i kosztu biokatalizatora [Rajdeo i in. 2016]. Naringinaza została skutecznie unieruchomiona na wielu różnych nośnikach, takich jak szkło porowate [Romero, Jimeno 1985], chityna [Tsen, Tsai 1998], celit [Şekeroğlu i in. 2006], wióry drzewne [Puri i in. 2005], kapsułki alginianu [Puri i in. 1996; Pedro i in. 2007], żel alkoholu poliwinylowego [Busto i in. 2007].

Celem niniejszej pracy była immobilizacja naringinazy z *P. decumbens* na magnetycznych nośnikach polisacharydowych oraz charakterystyka otrzymanego biokatalizatora. Unieruchomiona naringinaza z *P. decumbens* została zastosowana do usuwania gorzkiego smaku ze świeżego oraz symulowanego soku grejpfrutowego. Dokonano także desorpcji enzymu z powierzchni nośnika za pomocą roztworu chlorku sodu, a nośnika ponownie użyto do unieruchomienia świeżej partii enzymu.

2. Metodyka

2.1. Materiały

W badaniach stosowano naringinazę z *Penicillium decumbens* (EC 232-962-4) o aktywności 408 jednostek/g substancji stałej firmy Sigma-Aldrich; aldehyd glutarowy 25% v/v roztwór wodny (Merck); polietylenoiminę, roztwór wodny 50% (Aldrich Chemistry); naringinę (naringenine-7-rhamnosidoglucoside) o czystości 95% (Fluka Analytical). Pozostałe substancje chemiczne były o czystości analitycznej.

2.2. Przygotowanie nośnika

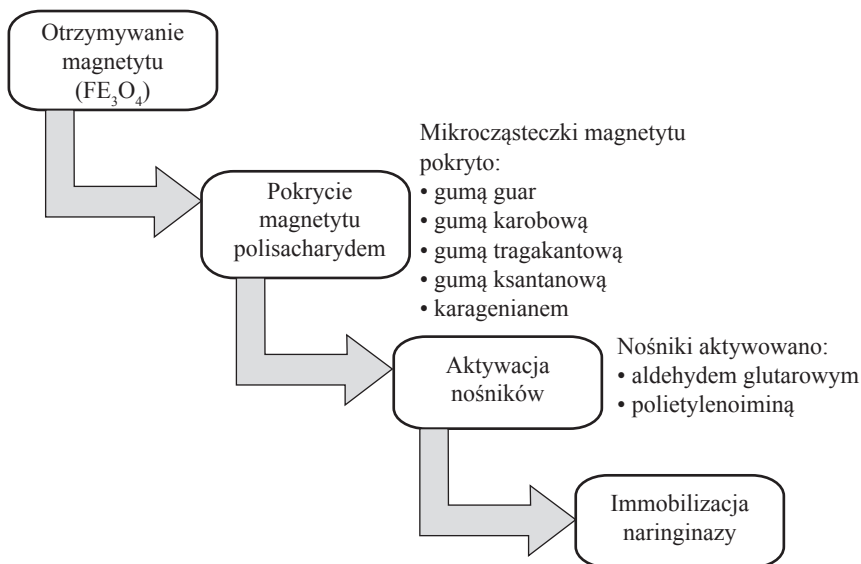
Mikrocząsteczki magnetytu otrzymano w reakcji jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} w stosunku molowym 2:1. Chlorek żelaza (II) tetrahydrat połączono z chlorkiem żelaza (III) i rozpuszczono w wodzie, w kolbie okrągłodennej. Całość mieszano za pomocą mieszadła mechanicznego przy $1100 \text{ obr/min}^{-1}$, w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 0,5 g polisacharydu (guma guar, karobowa, tragakantowa, ksantanowa lub karagenian) rozpuszczonego w 20 ml H_2O , całość ogrzano do 65°C , ciągle mieszając. Za pomocą 4 M roztworu NaOH ustalono wartość pH 12 i kontynuowano mieszanie przez kolejne dwie godziny w temperaturze 65°C . Po tym czasie mieszaninę ostudzono do 20°C , a następnie za pomocą 4 M kwasu octowego obniżono jej kwasowość do pH 7,0. Na koniec produkt odsączono i przemyto wodą destylowaną, a otrzymane mikrocząsteczki zamrożono w temperaturze -30°C i poddano sublimacji przy ciśnieniu poniżej 10 Pa.

2.3. Aktywacja nośników

Otrzymane mikrocząsteczki magnetytu pokryte polisacharydem zostały aktywowane aldehydem glutarowym lub polietylenoiminą. W tym celu 1 g nośnika wymieszano z 20 ml 5% aldehydu glutarowego lub 5% roztworu polietylenoiminy w buforze fosforanowym (0,01 M, pH 7,0) i wstrząsano (150 obr/min^{-1}) w temperaturze 30°C , przez 3,5 godziny.

2.4. Immobilizacja naringinazy na polisacharydowym magnetycznym nośniku

Do 150 mg otrzymanych mikrocząsteczek nośnika dodano 7,5 ml roztworu naringinazy (3 mg ml^{-1}) w buforze fosforanowym (0,01 M, pH 7). Całość wytrząsano w 27°C przez 4 godziny. Następnie otrzymany biokatalizator kilkakrotnie przemyto buforem fosforanowym (0,01 M, pH 7) i wodą destylowaną. Ilość enzymu związanego z nośnikiem oznaczono za pomocą metody Lowry'ego [Lowry i in. 1951]. Schemat otrzymywania nośnika i immobilizacji naringinazy został przedstawiony na rys. 1.



Rys. 1. Schemat otrzymywania nośnika i immobilizacji naringinazy

Źródło: opracowanie własne.

2.5. Oznaczenie aktywności enzymu

Oznaczenie aktywności wolnego enzymu – w probówce wymieszano 1 ml 0,1% roztworu naringiny rozpuszczonej w temperaturze około 85°C , oraz 0,3 ml buforu octanowego (0,1 M, pH 4,0) i 0,2 ml roztworu naringinazy (3 mg ml^{-1}). W przypadku enzymu unieruchomionego, do 150 mg nośnika z immobilizowaną naringinazą dodano 1,5 ml buforu octanowego (0,1 M, pH 4) oraz 3,5 ml 0,1% roztworu naringiny.

Do oceny aktywności naringinazy zastosowano metodę Davisa [Davis 1947], która opiera się na spektrofotometrycznym oznaczeniu stężenia naringiny poprzez jej reakcję z glikolem dietylenowym w środowisku zasadowym. Jednostka enzymatyczna została zdefiniowana jako ilość enzymu katalizująca przemianę 1 μ mola naringiny w ciągu 1 minuty. Względną aktywność enzymu obliczono jako stosunek procentowy aktywności w danych warunkach do jego maksymalnej aktywności.

2.6. Wpływ pH na aktywność wolnej i immobilizowanej naringinazy

Optymalną wartość pH określono poprzez analizę aktywności naringinazy przy różnych wartościach pH, stosując 0,1 M bufor: cytrynianowo-fosforanowy (pH 2,5), cytrynianowy (pH 3,0, pH 3,5), octanowy (pH 4,0, 4,5, 5,0) oraz fosforanowy (pH 6,0, 7,0, 8,0) w temperaturze 50°C.

2.7. Wpływ temperatury na aktywność wolnej i immobilizowanej naringinazy

W celu określenia optymalnej temperatury reakcji oznaczono aktywność naringinazy w pH 4,0 w 0,1 M buforze octanowym, w temperaturach 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80°C dla enzymu wolnego oraz 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80°C dla enzymu unieruchomionego.

2.8. Wpływ inkubacji w buforach o różnym pH na aktywność wolnej i unieruchomionej naringinazy

Stabilność wolnej i unieruchomionej naringinazy badano w pH 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0. Enzym inkubowano w danych pH przez 15 godz., a następnie badano jego pozostałą aktywność w 0,1 M buforze octanowym o pH 4,0.

2.9. Stabilność termiczna wolnej i immobilizowanej naringinazy

Stabilność termiczną badano poprzez inkubację obu form enzymu w zadanej temperaturze (25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80°C) przez 60 min. Po tym czasie oznaczono aktywność naringinazy w pH 4,0 w 0,1 M buforze octanowym.

2.10. Określenie parametrów kinetycznych reakcji

W celu oznaczenia parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy naringiny badano aktywność naringinazy w 50°C i pH 4,0 (bufor octanowy 0,1 M) przy zastosowaniu stężeń substratu (naringiny) w mieszaninie reakcyjnej od 0,3 do 10 mM. Na podstawie prac innych autorów [Nunes i in. 2010; Şekeroğlu i in. 2006] oraz ze względu na zmniejszenie się stabilności termicznej wraz ze wzrostem temperatury, parametry kinetyczne oznaczono w temperaturze niższej niż optymalna. Z zależności szybkości reakcji od stężenia substratu obliczono metodą Lineweavera-Burka wartości maksymalnej szybkości reakcji (V_{max}) oraz stałej Michaelisa (K_m).

2.11. Desorpcja enzymu z powierzchni nośnika i jego ponowna immobilizacja

Do 150 mg nośnika z unieruchomionym enzymem dodano 10 ml 10% roztworu NaCl. Całość wstrząsano przez 60 min w temperaturze 30°C. Mieszaninę przemyto

wodą destylowaną i oznaczono aktywność preparatu. Następnie na tak zregenerowanym nośniku ponownie immobilizowano naringinazę i oznaczono jej aktywność.

2.12. Hydroliza naringiny ze świeżego i symulowanego soku grejpfrutowego

Przeprowadzono hydrolizę naringiny w świeżym i modelowym soku grejpfrutowym przez wolną oraz immobilizowaną naringinazę. Przed przystąpieniem do hydrolizy wyciśnięto sok z grejpfrutów (odmiana Star Ruby, kraj pochodzenia RPA) zakupionych w markecie. Sok symulowany zawierał $800 \mu\text{g ml}^{-1}$ naringiny, 0,48% sacharozy oraz 0,025% kwasu cytrynowego [Busto i in. 2007]. W kolbie stożkowej wymieszano 30 ml soku grejpfrutowego oraz odpowiednio 1 ml wolnego enzymu (38 mg ml^{-1}) lub 500 mg nośnika z unieruchomionym enzymem. Całość wytrząsano w temperaturze 27°C . Określono zawartość naringiny w soku przed hydrolizą, a także po 15, 30, 60, 120, 240 i 480 oraz 1640 min jej trwania. Wolny enzym dezaktywowano w pobranych próbach soku, poprzez ich gotowanie przez 10 min, natomiast próby z enzymem immobilizowanym odwirowano. Wszystkie próby przesączono przez filtry membranowe (nylonowe (PA) o średnicy porów $0,2 \mu\text{m}$). Zawartość naringiny w soku oznaczono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosując: kolumnę ChromolithTM Performance RP-18e, fazę ruchomą – acetonitryl: woda (23:77), przepływ $0,5 \text{ ml/min}$, detekcja $\lambda = 280 \text{ nm}$.

2.13. Opracowanie statystyczne wyników

Pomiary poszczególnych wielkości wykonano trzykrotnie, a wyniki przedstawiono w formie średniej arytmetycznej z odchyleniem standardowym. Do obliczeń wykorzystano program Microsoft Excel 2013.

Do określenia wpływu polisacharydów i aktywatorów na aktywność unieruchomionej naringinazy zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji. Jednorodności wariancji sprawdzono testami Levene'a i Browna-Forsythe'a, a istotność różnic między średnimi testem Duncana. Obliczenia prowadzono na poziomie istotności $\alpha=0,05$ z użyciem programu STATISTICA 12.

3. Wyniki i dyskusja

Na nośniku otrzymanym na bazie gumy karobowej aktywowanej polietylenoiminą została związana największa ilość białka enzymatycznego. Pozwoliło to na uzyskanie immobilizowanego preparatu naringinazy o największej aktywności (tab. 1). Nośnik ten został wykorzystany do dalszych badań.

W literaturze brak jest doniesień na temat immobilizacji naringinazy na magnetycznych polisacharydowych nośnikach. Jedynie Soria i wsp. [2012] kowalencyjnie związali podjednostkę naringinazy z *Aspergillus terreus*, α -L-ramnozydazę na ferromagnetycznych nośnikach zawierających tereftalan polietylenu, polisiloksan/alkohol poliwinylowy (POS/PVA) lub chitozan. W badaniach tych β -D-glukozydaza została usunięta z kompleksu enzymatycznego przez jej inaktywację w pH 11, po

oczyszczeniu preparat naringinazy zawierał jedynie 8% początkowej aktywności β -D-glukozydazy [Soria i in. 2012]. Badacze unieruchomili naringinazę z *Penicillium decumbens* na polisacharydowych nośnikach, ale bez magnetycznych właściwości. Naringinaza została unieruchomiona na nośniku chitynowym [Tsen, Tsai 1998] oraz uwięziona w κ -karaginie [Ribeiro, Ribeiro 2008a]. Natomiast chińscy badacze immobilizowali naringinazę z *Aspergillus aculeatus* na magnetycznych nanocząstkach Fe_3O_4 [Xiao i in. 2015].

Tabela 1. Wpływ polisacharydów i aktywatorów na aktywność naringinazy

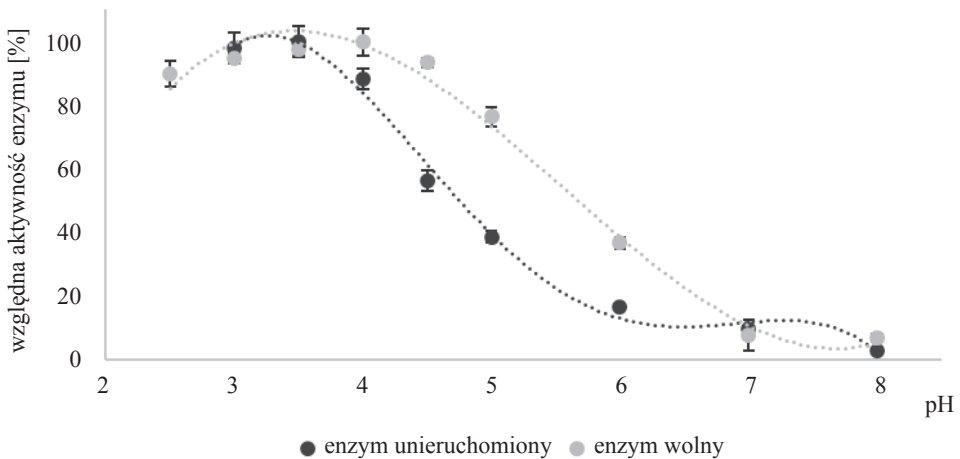
Polisacharyd	Aktywator *	Aktywność naringinazy [U·g ⁻¹ nośnika] **
Guma guar	AG	3,78 ^a ± 0,19
	PEI	1,69 ^b ± 0,05
Guma tragakantowa	AG	5,11 ^c ± 0,15
	PEI	5,04 ^c ± 0,14
Guma karobowa	AG	3,8 ^a ± 0,2
	PEI	5,47 ^d ± 0,14
Guma ksantanowa	AG	2,92 ^c ± 0,2
	PEI	4,63 ^f ± 0,21
Karagenian	AG	4,87 ^{c,f} ± 0,3
	PEI	2,51 ^g ± 0,12

* PEI – polietylenoimina, AG – aldehyd glutarowy; ** Wartości średnie ± odchylenie standardowe. Różne oznaczenia literowe wskazują występowanie różnic istotnych statystycznie na poziomie $p < 0,05$.

Źródło: opracowanie własne.

Wpływ pH na aktywność wolnej i immobilizowanej naringinazy został pokazany na rys. 2. Immobilizacja naringinazy spowodowała przesunięcie optymalnej wartości pH enzymu z pH 4,0 na 3,5. W kwaśnym pH aktywność obu form enzymu jest znacznie wyższa niż w pH alkalicznym. Takie rozszerzenie optymalnego pH może okazać się przydatne w zastosowaniach przemysłowych w technologii żywności, biorąc pod uwagę kwasowość soków cytrusowych. Obniżenie optymalnej wartości pH w wyniku unieruchomienia enzymu uzyskali także Şekeroğlu i inni [2006], którzy immobilizowali naringinazę z *Penicillium decumbens* na celicie. Również Puri i wsp. [2005] odnotowali zmniejszenie optymalnej wartości pH naringinazy z *Penicillium decumbens* w wyniku jej kowalencyjnego wiązania na włóknach drzewnych.

Optymalna wartość pH wolnego enzymu pokrywa się wynikami przedstawionymi przez Puri i in. [1996] oraz Mishra i Kar [2003] dla naringinazy odpowiednio z *Penicillium species* oraz *Aspergillus niger*. Natomiast Nunes i in. [2010] pokazali, że immobilizacja naringinazy w PVA-alginianie nie wpływa na zmianę optymalnej wartości pH (4,0). Stałą wartość pH (4,5) dla wolnego i unieruchomionego enzymu otrzymał także zespół Del Nobile [2003] oraz Busto i wsp. [2007].

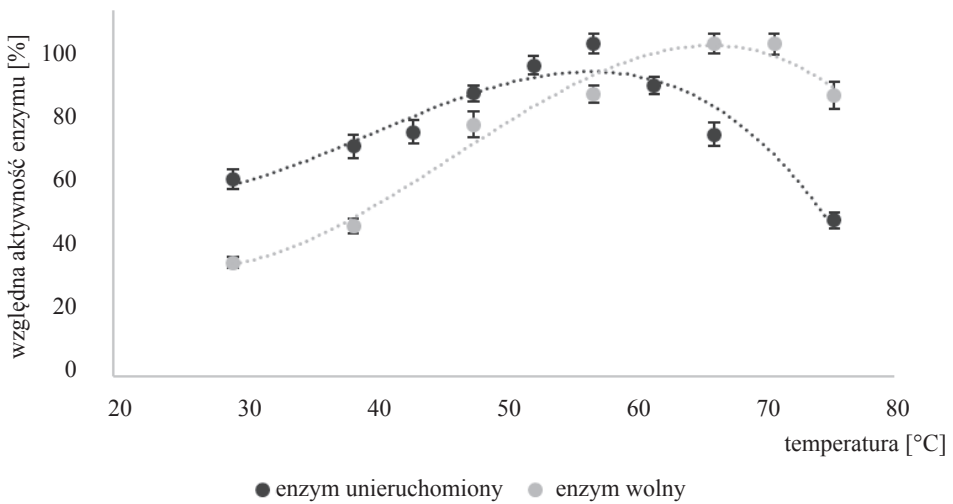


Rys. 2. Wpływ pH na aktywność naringinazy

Źródło: opracowanie własne.

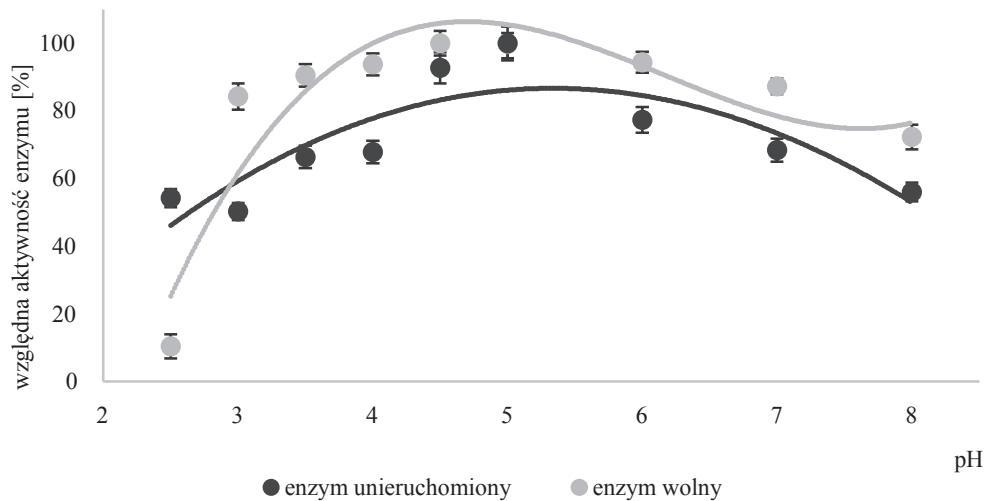
Jak pokazano na rys. 3, immobilizacja naringinazy na magnetycznym polisacharydowym nośniku wpływała na obniżenie optymalnej temperatury aktywności badanego enzymu. Największą aktywność wykazywała wolna naringinaza w temperaturze 70°C, natomiast immobilizowana w 60°C. Immobilizacja naringinazy z *Penicillium decumbens* na celicie także wpłynęła na zmniejszenie optymalnej temperatury z 70 do 60°C [Şekeroğlu i in. 2006]. Przeciwnie wyniki uzyskali Puri i wsp. [1996] którzy pokazali, że optymalna temperatura dla naringinazy pułapkowanej w alginianie wynosi 55°C i jest wyższa niż dla wolnego enzymu (50°C). Immobilizacja naringinazy w żelu alkoholu poliwinylowego także wpływała na zwiększenie optymalnej temperatury z 60 do 70°C w stosunku do jej natywnej formy [Busto i in. 2007].

Inkubacja naringinazy w buforach o różnych pH wykazała, że najmniejsze straty aktywności wolnego enzymu zaobserwowano w pH 4,0–6,0, natomiast immobilizowanego w pH 4,5–5,0 (rys. 4). W literaturze brak jest doniesień na temat wpływu inkubacji w roztworach o różnym pH na aktywność immobilizowanej naringinazy. Shanmugaparakash i wsp. [2015], którzy scharakteryzowali wolną naringinazę z *Aspergillus brasiliensis* MTCC 1344, wykazali, że enzym ten wykazywał wysoką aktywność po inkubacji w pH 5,0–7,0, natomiast w niższych wartościach pH jego aktywność się zmniejszyła. Jak wykazali Gallego i wsp. [2001], podjednostka naringinazy, α -L-ramnozydaza z *Aspergillus terreus*, jest najbardziej aktywna po inkubacji w pH 4,0–6,0.



Rys. 3. Wpływ temperatury na aktywność naringinazy

Źródło: opracowanie własne.

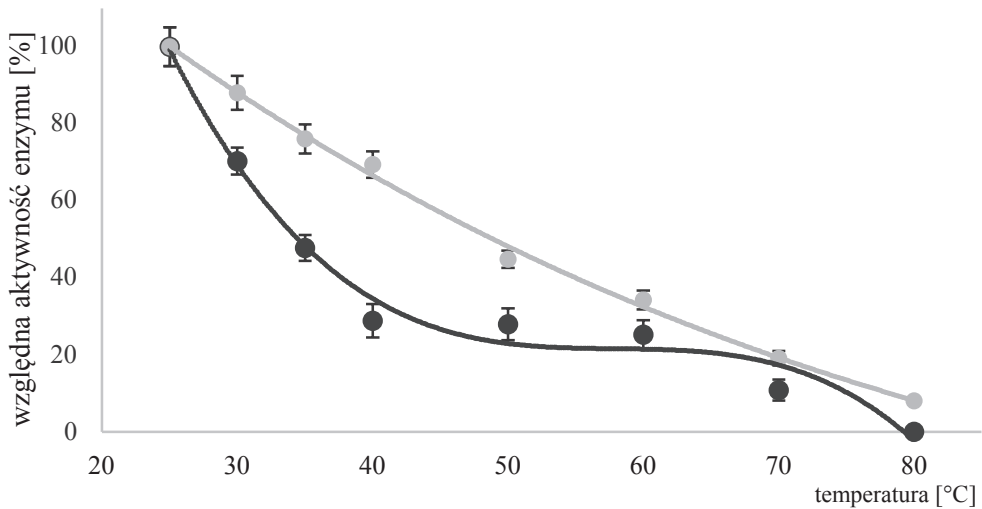


Rys. 4. Wpływ inkubacji w buforach o różnym pH na aktywność naringinazy

Źródło: opracowanie własne.

Badano także termiczną stabilność enzymu, a wyniki przedstawiono na rys. 5. Zaobserwowano zmniejszenie stabilności termicznej zarówno wolnej, jak i immobilizowanej naringinazy wraz ze wzrostem temperatury. Tempo zmniejszania się stabilności temperaturowej było większe w przypadku enzymu unieruchomionego. Immobilizacja enzymu na nośniku często ogranicza jego zmiany konformacyjne,

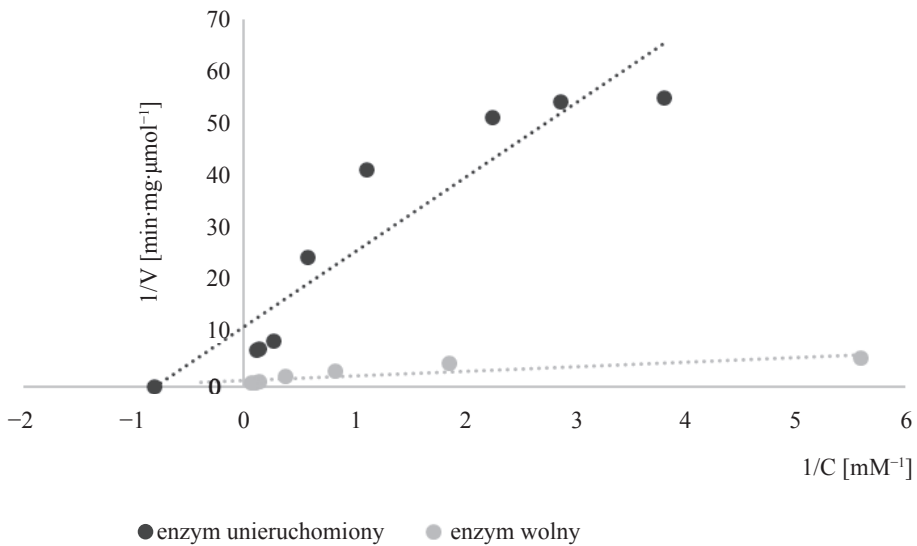
dzięki czemu enzym wykazuje większą odporność na denaturację [Leonowicz i in. 1988, co potwierdzili autorzy kilku opracowań. Lei i wsp. [Lei i in. 2011] unieruchomili naringinazę z *Penicillium decumbens* na mezoporowatej krzemionce MCM-41, którą następnie usieciowali aldehydem glutarowym. Po 180 min inkubacji tak związany enzym był bardziej stabilny niż jego wolna forma. Także zespół naukowców z Egiptu wykazał, że immobilizacja naringinazy z *Aspergillus niger* w biopolimerowym żelu zwiększa jej stabilność termiczną [Awad i in. 2016]. W przypadku immobilizacji naringinazy z *Penicillium decumbens* na magnetycznym nośniku polisacharydowym nie obserwowano jednak wzrostu stabilności termicznej enzymu.



Rys. 5. Stabilność termiczna wolnej i unieruchomionej naringinazy

Źródło: opracowanie własne.

Wykres Lineweavera-Burka dla wolnej i unieruchomionej naringinazy przedstawiony został na rys. 6, natomiast wartości stałych kinetycznych K_M i V_{max} zostały zawarte w tab. 2. Immobilizacja naringinazy spowodowała zmniejszenie wartości maksymalnej szybkości reakcji $V_{max}_{z 1,21}$ do $0,575 \mu\text{mol min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, znacznie zwiększyła się także wartość stałej Michaelisa, z $2,56 \text{ mM}$ do $20,61 \text{ mM}$ w stosunku do enzymu wolnego. Podobne zjawisko wystąpiło w przypadku naringinazy z *Penicillium decumbens* immobilizowanej w żelu alkoholu poliwinylowego [Nunes i in. 2010] oraz poprzez adsorpcję na Celite (Hyflo Supercel) [Şekeroğlu i in. 2006], a także w wyniku unieruchomienia w κ -karagenianie [Ribeiro, Ribeiro 2008a]. Wzrost wartości stałej Michaelisa z $5,9 \text{ mM}$ do 41 mM zaobserwowali także Awad i wsp. [Awad i in. 2016], w wyniku immobilizacji naringinazy z *Aspergillus niger* w żelu alginianowym. Różnice w wartościach stałej K_M wynikały zapewne ze stosowania różnych buforów, temperatur, siły jonowej oraz nośników w poszczególnych eksperymentach.



Rys. 6. Wykres Lineweavera-Burka dla wolnej i unieruchomionej naringinazy

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 2. Parametry kinetyczne wolnej i unieruchomionej naringinazy

Forma enzymu	Vmax [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	KM [mM]
Enzym wolny	1,21	2,56
Enzym unieruchomiony	0,575	20,61

Źródło: opracowanie własne.

Obniżenie wartości maksymalnej szybkości reakcji w wyniku unieruchomienia enzymu uzyskali Şekeroğlu i in. [2006] oraz Puri i in. [1996]. Także w przypadku immobilizacji naringinazy w żelu alkoholu poliwinylowego następowało zmniejszenie maksymalnej szybkości reakcji [Nunes i in. 2010]. Odmienną zależność dla naringinazy z *Aspergillus niger* unieruchomionej w żelu alginianowym stwierdzili Awad i wsp. [Awad i in. 2016]. Wzrost wartości stałej Michaelisa i redukcję wartości maksymalnej szybkości reakcji sugeruje, że resztkowa aktywność unieruchomionego enzymu zmniejszyła się w trakcie immobilizacji [Manjón i in. 1985].

Przeprowadzono także regenerację nośnika poprzez desorpcję preparatu naringinazy z jego powierzchni z użyciem roztworu NaCl. Po desorpcji nośnik wykazywał około 12% początkowej aktywności naringinazy (tab. 3). Na tak otrzymanym nośniku ponownie skutecznie immobilizowano preparat naringinazy. Dzięki zastosowaniu adsorpcji jako techniki immobilizacji enzymów nośniki po desorpcji białka można ponownie wykorzystać, zmniejszając tym samym koszty produkcji oraz wytwarzając mniej odpadów [Wang i in. 2008].

Tabela 3. Desorpcja oraz ponowna immobilizacja naringinazy

	Aktywność naringinazy [U*g ⁻¹ nośnika]*	% początkowej aktywności
Przed desorpcją	1,574 ±0,047	-
Po desorpcji 10% wodnym roztworem NaCl	0,191±0,007	12,15
Po ponownej immobilizacji	1,402±0,042	89,07

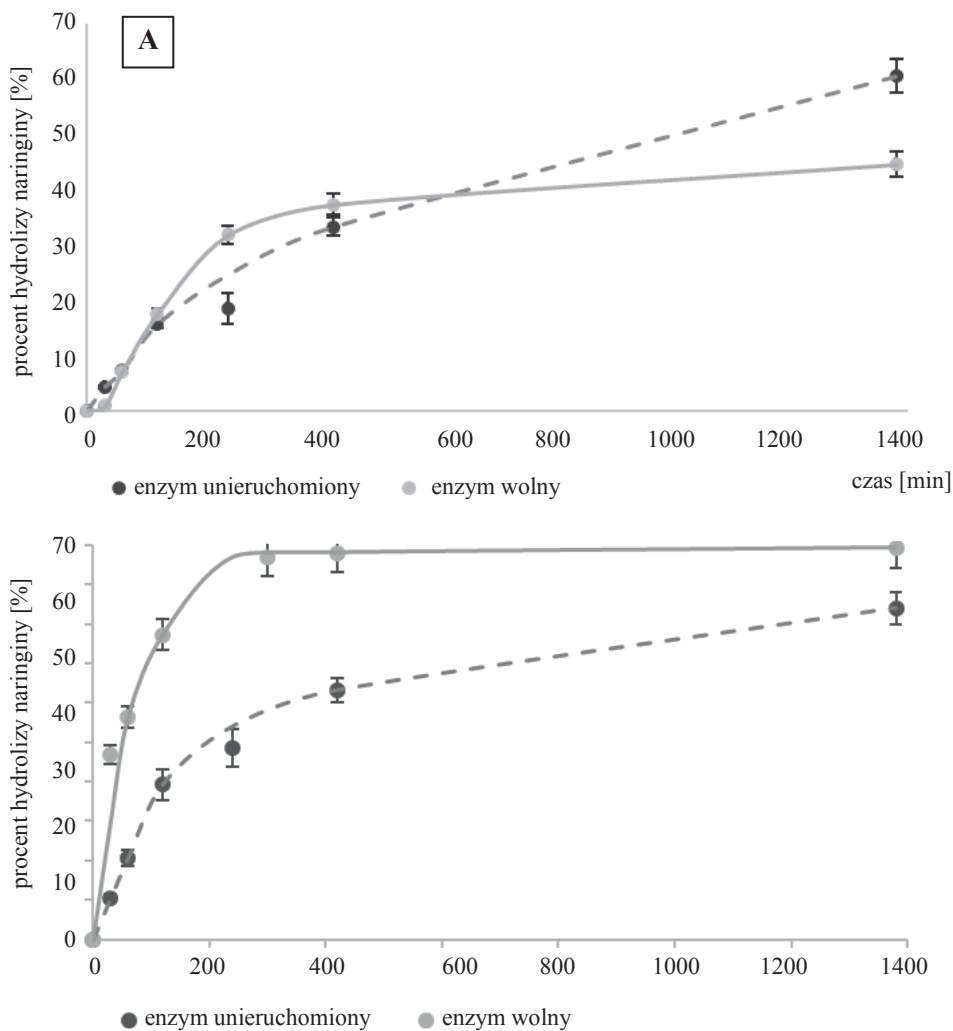
* Wartości średnie ± odchylenie standardowe.

Źródło: opracowanie własne.

Za gorzki smak owoców cytrusowych odpowiedzialna jest przede wszystkim naringina. Podaje się, że jej zawartość w soku grejpfrutowym wynosi 470–900 µg ml⁻¹. Już tak niewielka ilość naringiny nadaje wyczuwalny dla konsumenta gorzki smak [Ribeiro, Ribeiro 2008b]. Stąd potrzeba zmniejszenia stężenia naringiny w wyniku jej hydrolizy przez naringinazę.

Na rys. 7 przedstawiono hydrolizę naringiny w modelowym (rys. 7A) oraz świeżym soku grejpfrutowym (rys. 7B) przez wolną, jak i unieruchomioną naringinazę. Należy zaznaczyć, że hydroliza naringiny została przeprowadzona w temperaturze niższej niż optymalna dla tego enzymu. Wynikało to z faktu, że w wysokich temperaturach soki owocowe tracą swoje cenne właściwości biologiczne. W modelowym roztworze naringiny po 7 godz. reakcji hydrolizie uległo jedynie 37% naringiny w przypadku wolnego enzymu i zaledwie 33% przy zastosowaniu unieruchomionego biokatalizatora. Znacznie szybciej przebiegała hydroliza naringiny w świeżym soku grejpfrutowym. Po 7 godz. procesu unieruchomiony preparat naringinazy zhydrolizował 63% naringiny zawartej w świeżym soku grejpfrutowym. Przy użyciu wolnej naringinazy hydrolizie uległo natomiast ponad 98% naringiny zawartej soku. Początkowa zawartość naringiny w hydrolizowanym soku grejpfrutowym wynosiła 594 µg ml⁻¹. Po 7 godz. procesu z zastosowaniem związanej naringinazy stężenie naringiny wynosiło 219 µg ml⁻¹, co oznacza, według Soaresa i Hotchkissa [1998], że gorycz w soku grejpfrutowym nie jest wykrywalna. Taka modyfikacja wpływa na poprawę jakości soku, zachowując jednocześnie jego właściwości prozdrowotne.

Ribeiro i Ribeiro [2008a] także pracowali nad usunięciem gorzkiego smaku z soku grejpfrutowego poprzez zastosowanie naringinazy unieruchomionej w kapsułkach κ-karaginanu. Po 2 godz. reakcji hydrolizie uległo 65% naringiny zawartej w soku. Stosowali jednak dużą ilość immobilizowanego enzymu w odniesieniu do soku poddanego hydrolizie. Proporcja soku do objętości użytego biokatalizatora wynosiła 4:1 (v/v). Mishra i Kar [2003] zhydrolizowali naringinę zawartą w soku grejpfrutowego w 55°C z wykorzystaniem naringinazy z *Aspergillus niger* unieruchomionej w alginianie. Po 3 godz. procesu hydrolizie uległo 84% naringiny. Lei i wsp. [2011] poprzez zastosowanie naringinazy związanej na mezoporowatej krzemionce MCM-41 zhydrolizowali 95,03% naringiny zawartej w soku z białych grejpfrutów. Nieco lepszy wynik (96,09%) uzyskali z zastosowaniem do tego celu



Rys. 7. Hydroliza naringiny w soku modelowym (A) i grejpfrutowym (B) przez wolny i unieruchomiony enzym

Źródło: opracowanie własne.

wolnego enzymu. Jednak, podobnie jak i inni autorzy, stosowali do hydrolizy naringiny zawartej w soku grejpfrutowym podwyższoną temperaturę – 65°C, co może przyczynić się do obniżenia jakości sensorycznej tego soku.

4. Podsumowanie

Naringinaza z *Penicillium decumbens* została skutecznie związana na magnetycznym polisacharydowym nośniku aktywowanym polietylenoiminą. W porównaniu z tradycyjnymi nośnikami niemagnetycznymi nośniki o właściwościach magnetycznych mają znaczącą przewagę, które jest widoczna w procesie technologicznym. Magnetyczne nośniki można bowiem łatwo oddzielić od medium reakcyjnego i ponownie użyć ich w procesie, co wiąże się ze zmniejszeniem kosztów wytwarzania i wykorzystania immobilizowanej naringinazy. Ponadto fakt, że unieruchomiona naringinaza wykazuje lepszą stabilność w kwaśnym pH i niskich temperaturach, jest korzystny z punktu widzenia jej zastosowania w procesach biotechnologicznych w przemyśle spożywczym, takich jak usuwanie gorzkiego smaku soku grejpfrutowego.

Literatura

- Alvarenga A.E., Romero C.M., Castro G.R., 2013, *A novel α -l-rhamnosidase with potential applications in citrus juice industry and in winemaking*, European Food Research and Technology, vol. 237, no. 6, s. 977–985.
- Awad G.E.A., Abd El Aty A.A., Shehata A.N., Hassan M.E., Elnashar M.M., 2016, *Covalent immobilization of microbial naringinase using novel thermally stable biopolymer for hydrolysis of naringin*, 3 Biotech, vol. 6, no. 1, s. 6–14.
- Bakula Z., Stachowiak R., Wiśniewski J., 2013, *Immobilizacja komórek – znaczenie biomedyczne*, Postępy Mikrobiologii, vol. 52, nr 3, s. 233–245.
- Bolibok P., Gembala J., Wujak M., Roszek K., Terzyk A., Wiśniewski M., 2016, *Immobilizacja enzymów na nośnikach sposobem na ukierunkowaną modyfikację właściwości biokatalizatorów*, Przemysł Chemiczny, vol. 95, nr 11, s. 2254–2258.
- Busto M.D., Meza V., Ortega N., Perez-Mateos M., 2007, *Immobilization of naringinase from Aspergillus niger CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices*, Food Chemistry, vol. 104, no. 3, s. 1177–1182.
- Cao M., Li Z., Wang J., Ge W., Yue T., Li R., William W.Y., 2012, *Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: enzyme immobilization, protein purification, and food analysis*, Trends in Food Science & Technology, vol. 27, no. 1, s. 47–56.
- Cavia-Saiz M., Muñiz P., Ortega N., Busto M.D., 2011, *Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin*, Food Chemistry, vol. 125, no. 1, s. 158–163.
- Davis W.B., 1947, *Determination of flavanones in citrus fruits*, Analytical Chemistry, vol. 19, no. 7, s. 476–478.
- Del Nobile M.A., Piergiovanni L., Buonocore G.G., Fava P., Puglisi M.L., Nicolais L., 2003, *Naringinase immobilization in polymeric films intended for food packaging applications*, Journal of Food Science, vol. 68, no. 6, s. 2046–2049.
- Dembczyński R., Jankowski T., 2004, *Unieruchamianie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania – stan obecny i możliwości rozwoju*, Nauka. Technologia. Jakość, vol. 4, nr 41, s. 5–17.
- Elujoba A.A., Hardman R., 1987, *Diosgenin production by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek*, Fitoterapia, no. 58, s. 299–304.

- Gallego M.V., Pinaga F., Ramon D., Valles S., 2001, *Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from Aspergillus terreus of interest in winemaking*, Journal of Food Science, vol. 66, no. 2, s. 204–209.
- González-Pombo P., Fariña L., Carrau F., Batista-Viera F., Brena B.M., 2014, *Aroma enhancement in wines using co-immobilized Aspergillus niger glycosidases*, Food Chemistry, vol. 143, s. 185–191.
- Jiang D.S., Long S.Y., Huang J., Xiao H.Y., Zhou J.Y., 2005, *Immobilization of Pycnoporus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres*, Biochemical Engineering Journal, vol. 25, no. 1, s. 15–23.
- Krajewska B., 2004, *Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review*, Enzyme and Microbial Technology, vol. 35, no. 2-3, s. 126–139.
- Lei S., Xu Y., Fan G., Xiao M., Pan S., 2011, *Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit*, Applied Surface Science, vol. 257, no. 9, s. 4096–4099.
- Leonowicz A., Sarkar J.M., Bollag J., 1988, *Improvement instability of an immobilized fungal laccase*, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 29, no. 7, s. 129–135.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L., Randall R.J., 1951, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, The Journal of Biological Chemistry, no. 193, s. 265–275.
- Manjón A., Bastida J., Romero C., Jimeno A., Iborra J.L., 1985, *Immobilization of naringinase on glycophasse-coater porous glass*, Biotechnology Letters, vol. 7, no. 7, s. 477–482.
- Mishra P., Kar R., 2003, *Treatment of grapefruit juice for bitterness removal by Amberlite IR 120 and Amberlite IR 400 and alginate entrapped naringinase enzyme*, Journal of Food Science, vol. 68, no. 4, s. 1229–1233.
- Nunes M.P., Vila-Real H., Fernandes P.C.B., Ribeiro M.H.L., 2010, *Immobilization of naringinase in PVA-alginate matrix using an innovative technique*, Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 160, no. 7, s. 2129–2147.
- Olsen R.W., Alfred L., 1974, *Debittering of concentrated grapefruit juice with naringinase*, Florida Agricultural Experiment Stations Journal Series, vol. 77, s. 321–325.
- Pedro H., Alfaia A.J., Marques J., Vila-Real H.J., Calado A., Ribeiro M.H.L., 2007, *Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high-pressure*, Enzyme and Microbial Technology, vol. 40, no. 3, s. 442–446.
- Puri M., 2012, *Updates on naringinase: Structural and biotechnological aspects*, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 93, no. 1, s. 49–60.
- Puri M., Kaur H., Kennedy J.F., 2005, *Covalent immobilization of naringinase for the transformation of a flavonoid*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 80, no. 10, s. 1160–1165.
- Puri M., Marwaha S., Kothari R., 1996, *Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice*, Enzyme and Microbial Technology, vol. 18, no. 4, s. 281–285.
- Rajdeo K., Harini T., Lavanya K., Fadnavis N.W., 2016, *Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice*, Food and Bioproducts Processing, no. 99, s. 12–19.
- Ribeiro I.A.C., Ribeiro M.H.L., 2008a, *Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 51, no. 1-2, s. 10–18.
- Ribeiro I.A.C., Ribeiro M.H.L., 2008b, *Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method*, Food Control, vol. 19, no. 4, s. 432–438.
- Romero C., Jimeno A., 1985, *Immobilization of naringinase on glycophasse-coater porous glass*, Biotechnology Letters, vol. 7, no. 7, s. 477–482.
- Sankyo C., 1988, *Preparation of antibiotic chloropolysporin-C*, Canadian Patent.
- Şekeröglü G., Fadilöglü S., Fahrettin G., 2006, *Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin*, European Food Research and Technology, vol. 224, no. 1, s. 55–60.

- Shanmugaprakash M., Vinothkumar V., Ragupathy J., Reddy D.A., 2015, *Biochemical characterization of three phase partitioned naringinase from Aspergillus brasiliensis MTCC 1344*, International Journal of Biological Macromolecules, no. 80, s. 418–423.
- Soares N.F.F., Hotchkiss J.H., 1998, *Bitterness reduction in grapefruit juice through active packaging*, Packaging Technology and Science, no. 18, s. 9–18.
- Soria F., Ellenrieder G., Oliveira G.B., Cabrera M., Carvalho L.B., 2012, *α -L-Rhamnosidase of Aspergillus terreus immobilized on ferromagnetic supports*, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 93, no. 3, s. 1127–1134.
- Synowiecki J., Wołosowska S., 2007, *Otrzymywanie i niektóre zastosowania unieruchomionych enzymów*, Biotechnologia, vol. 2, nr 77, s. 7–26.
- Tsen H.Y., Tsai S.Y., 1998, *Comparison of the kinetics and factors affecting the stabilities of chitin-immobilized naringinases from two fungal sources*, Journal of Fermentation Technology, vol. 66, no. 2, s. 193–198.
- Vila-Real H., Alfaia A.J., Rosa M.E., Calado A.R., Ribeiro M.H.L., 2010, *An innovative sol-gel naringinase bioencapsulation process for glycosides hydrolysis*, Process Biochemistry, vol. 45, no. 6, s. 841–850.
- Wang F., Guo C., Liu H., Liu C., 2008, *Immobilization of Pycnoporus sanguineus laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles*, Chemical Technology and Biotechnology, vol. 83, no. 1, s. 97–104.
- Xiao A., You H., Wu C., Cai H., 2015, *Immobilization and characterization of naringinase from Aspergillus aculeatus onto magnetic Fe₃O₄ nanoparticles*, Nanoscience and Nanotechnology Letters, vol. 7, no. 9, s. 770–778.
- Zhu Y., Jia H., Xi M., Yang L., Li X., 2017, *Characterization of a naringinase from Aspergillus oryzae 11250 and its application in the debitterization of orange juice*, Process Biochemistry, no. 62, s. 114–121.