

# Imobilizacija penicilin-acilaze modifikovane derivatom alginata na Sepabeads EC-HA nosač

Milena G. Žuža<sup>1</sup>, Nenad B. Milosavić<sup>2</sup>, Zorica D. Knežević-Jugović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

## Izvod

U ovom radu započeto je sistematsko ispitivanje imobilizacije enzima modifikovanih derivatima alginata. Penicilin-acilaza (PAC) modifikovana je polialdehidnim derivatom alginata i zatim imobilisana na Sepabeads EC-HA nosač. Ispitani su optimalni uslovi za kovalentnu imobilizaciju modifikovane PAC i imobilisani enzim je okarakterisan u pogledu efekata imobilizacije na njegovu termalnu stabilnost, pH i temperaturni profil. Dodatno, imobilisani enzim je po pitanju ovih parametara upoređen kako sa nativnom tako i sa modifikovanom (alginat-PAC) formom enzima. Konstante brzine dezaktivacije za PAC, alginat-PAC i modifikovan enzim imobilisan na Sepabeads EC-HA (alginat-PAC-Sepabeads EC-HA) iznosile su redom 2,03, 36,48 i 1,23 h<sup>-1</sup> na 40 °C, odnosno 2,32, 50,65 i 1,68 h<sup>-1</sup> na 50 °C. Pokazano je da alginat-PAC i alginat-PAC-Sepabeads EC-HA imaju isti pH i temperaturni optimum kao i nativna PAC.

**Ključne reči:** penicilin-acilaza; modifikacija; alginat; imobilizacija; Sepabead EC-HA nosač.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org/HI/>

Penicilin-acilaza (PAC) je važan industrijski enzim za proizvodnju β-laktamskih antibiotika [1]. PAC katalizuje hidrolizu penicilina G (Pen G) do fenilsirćetne kiseline (PAA) i 6-aminopenicilanske kiseline (6-APA), koja je osnovni prekursor sinteze polusintetskih penicilina, pa zauzima centralno mesto u njihovoj industrijskoj proizvodnji [2]. Zbog velikog broja nedostataka pri radu sa nativnom PAC, predmet savremenih istraživanja je razvoj imobilisanog sistema sa ovim enzimom čime bi se omogućila njegova olakšana separacija od supstrata i proizvodna reakcije i ponovna upotreba [3,4]. U literaturi je opisan veliki broj metoda imobilizacije PAC, kao što su adsorpcija, umrežavanje, kovalentno vezivanje i obuhvatanje nosačem [5]. Kovalentna imobilizacija PAC je naročito zastupljena metoda jer se njenom primenom uglavnom dobijaju stabilni derivati koji se mogu reciklirati više puta bez rizika od spiranja enzima sa nosača u reakcionom medijumu i kontaminacije proizvoda proteinima [6].

Hemijska modifikacija enzima ugljenim hidratima se pokazala kao korisna strategija za poboljšanje stabilnosti biokatalizatora usled formiranja dodatnih inter- i intramolekulskih interakcija u glikozilovanom molekulu enzima [7]. U ovom radu započeto je sistematsko ispitivanje imobilizacije PAC prethodno modifikovane derivatima alginata i ispitivanje uticaja imobilizacije na aktivnost i svojstva biokatalizatora. Osnovni princip je da se hemijskom modifikacijom u molekul PAC uvede 2,3-dialdehidni derivat alginata koji se, zatim, može vezati

Preписка: Z. Knežević-Jugović, Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: zknez@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 18. mart, 2011

Rad prihvaćen: 17. jun, 2011

NAUČNI RAD

UDK 577.151.4:661.12

Hem. Ind. 65 (4) 431–437 (2011)

doi: 10.2298/HEMIND110318041Z

kovalentnom vezom za amino grupe odabranog čvrstog nosača. Ovim je omogućeno vezivanje enzima na nosač preko ugljeno-hidratnog dela, koji je modifikacijom uveden u molekul enzima, bez učešća funkcionalnih grupa od esencijalne važnosti za aktivnost enzima. Modifikacija PAC je do sada vršena derivatima različitih polisaharida kao što su karboksimetil-celuloza, dekstran, manan, kalijum-pektat, natrijum-alginat i drugim [7–9]. Međutim, iako je ispitana imobilizacija tripsina i inver-taze modifikovanih derivatima hitozana kao i, u jednom slučaju, PAC modifikovane derivatom skroba na čvrste nosače [10–14], na osnovu našeg uvida u literaturu, nema podataka o imobilizaciji PAC modifikovane derivatima alginata na nosač sa amino grupama. Osnovni cilj istraživanja bio je dobijanje aktivnije i stabilnije imobilisane PAC u odnosu na već ispitane imobilisane sisteme, koja bi bila podesna za industrijsku primenu u hidrolizi penicilina G, i karakterisanje dobijenog biokatalizatora.

Karakteristike nosača (hemijski sastav, prečnik čestica, veličina pora, broj grupa dostupnih za vezivanje) jedan su od najvažnijih faktora koji utiču na proces imobilizacije [15]. Tako, da bi se pokazao potencijal ove strategije za imobilizaciju neglikozilovanih enzima, imobilizacija PAC na Sepabeads je korišćena kao model sistem. Sepabeads nosači su veoma stabilni i imaju dobre hemijske, mehaničke i druge karakteristike kao što su velika poroznost i pravilna sferičnost čestica, velika stabilnost i otpornost na dejstvo mikroorganizama, visok kapacitet vezivanja proteina, mala težnja ka bubrenju u rastvorima sa visokom jonskom jačinom i u običnim rastvorima, hidrofilna priroda itd. [16]. Iako su brojna istraživanja pokazala da su Sepabeads dobri nosači za imobilizaciju enzima, njihov potencijal za vezivanje PAC nije u potpunosti ispitan [17]. Pored nosača veoma je

važno da su sve ostale komponente koje se koriste za imobilizaciju prirodne i netoksične. Alginat je prirodni anjonski polisaharid koji se dobija iz braon algi (*Asco-phyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum*). Prečišćen alginat se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kao i za mnoge biomedicinske, biotehnološke i terapeutske svrhe [18].

U ovom radu, optimizovani su uslovi za kovalentnu imobilizaciju prethodno modifikovane PAC (alginat-PAC) iz *E. coli* na Sepabeads EC-HA. Imobilisani enzim (alginat-PAC-Sepabeads EC-HA) okarakterisan je na model reakciji hidrolize penicilina G. Radi toga ispitani su termalna stabilnost, pH i temperaturni profil imobilisanog enzima i upoređeni sa svojstvima nativnog i modifikovanog enzima.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### Materijali

Penicilin-acilaze iz *E. coli* (PAC) je dobijena od DSM (Holandija). Specifična aktivnost enzima je bila 105 U/cm<sup>3</sup>, dok je sadržaj proteina određen metodom po Loriju (Lowry) iznosio 56,13 mg/cm<sup>3</sup> proteina [19]. Sepabeads EC-HA nosač (veličina čestica 150-300 μm, prosečan prečnik pora 30–40 nm, zadržavanje vode 55–65%) dobijen je od Resindion SRL (Mitsubishi Chemical Corporation, Milano, Italija). 6-Aminopenicilinska kiselina (6-APA), penicilin G i *p*-dimetilaminobenzaldehid (PDAB) kupljeni su od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

### Metode

Pre konjugacije, perjodatnom oksidacijom izvršena je aktivacija alginata u 2,3-dialdehidni derivat po prethodno opisanoj metodi [8,20]. Ukratko, 1,07 g natrijum-perjodata (NaIO<sub>4</sub>) dodato je u 100 cm<sup>3</sup> vodenog rastvora koji je sadržao 1 g alginata (50 mM krajnja koncentracija NaIO<sub>4</sub>) i reakciona smeša je inkubirana na 4 °C na tamnom mestu 48 h. Perjodatna oksidacija molekula alginata je prekinuta dodatkom 1 cm<sup>3</sup> etilen glikola nakon čega se smeša intenzivno mešala još 1 h. Dobijeni alginat-dialdehid dijalizovao se u crevu za dijalizu prema vodi preko noći na tamnom i hladnom mestu da bi se uklonio višak niskomolekulskih aldehida, etilen glikola i natrijum-perjodata.

Reakcija konjugacije se izvodila kao što je prethodno opisano za tripsin [20]. U prethodnom istraživanju je pokazano da su šifove baze koje se formiraju između PAC molekula i alginat-dialdehida veoma stabilne, stoga, dodatna redukcija modifikovanog enzima sa NaBH<sub>4</sub> nije bila potrebna. Proizvod je dijaliziran prema vodi 48 h i ultrafiltriran kroz YM 100 membranu (100 kDa, Milipore Corporation, Bedford, MA, USA) da bi se odvojila modifikovana PAC od nedomodifikovane (≈80 kDa).

Količina aktiviranog alginata u rastvoru konjugovanog enzima je određena fenol-sulfatnom metodom,

kao što je opisano u literaturi [21]. Koncentracija proteina je određena metodom po Loriju korišćenjem govedeg serum albumina kao standarda [19].

Imobilizacija se sastojala od vezivanja oksidovane alginat-PAC za amino-Sepabeads nosač u natrijum-acetatnom puferu na pH 5,0 i 4 °C u toku 48 h [22]. Nakon toga, imobilizat je filtriran, i ispran sa 1 M NaCl (3×20 cm<sup>3</sup>) i natrijum-acetatnim puferom, pH 5,0 (3×20 cm<sup>3</sup>), i čuvan na 4 °C do upotrebe.

Koncentracija proteina i enzimski aktivnost u uzorcima je određena pre i posle imobilizacije. Količina vezanog enzima je određena indirektno iz razlike između količine enzima unetog u sistem pre vezivanja i količine enzima u filtratu. Aktivnost slobodne PAC, alginat-PAC i alginat-PAC-Sepabeads EC-HA je određena merenjem proizvoda enzimske hidrolize penicilina G, 6-APA, spektrofotometrijski sa PDAB kao što je prethodno opisano [23]. Čestice alginat-PAC-Sepabeads EC-HA su profiltrirane, pa je zatim u supernatantu izmerena 6-APA. Jedna jedinica PAC je definisana kao količina enzima potrebna da se dobije 1 μmol/min 6-APA u uslovima analize (2% (w/v) rastvor penicilina G kao supstrata rastvorenog u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,92 na 37 °C).

Termalna dezaktivacija svih biokatalizatora ispitana je na 40 i 50 °C (100 mM fosfatni pufer, pH 7,92) korišćenjem ekvivalentnog broja jedinica biokatalizatora (slobodna PAC, alginat-PAC i alginat-PAC-Sepabeads EC-HA). Za opisivanje termalne dezaktivacije enzima u toku vremena korišćen je matematički model koji se zasniva na kinetici inaktivacije I reda. Prelaz potpuno aktivnog slobodnog enzima (*E*) u potpuno neaktivan krajnji enzimski oblik (*D*) može se šematski predstaviti kao:



Ovaj mehanizam može se opisati eksponencijalnim modelom, gde se preostala enzimski aktivnost u vremenu *t* može odrediti iz sledeće jednačine:

$$A = 100e^{-k_d t} \quad (2)$$

U predloženom kinetičkom modelu, promenljivi parametar je konstanta brzine dezaktivacije, *k<sub>d</sub>*, koja je određena nelinearnom Levenberg-Marquardt regresionom metodom korišćenjem Matlab softvera.

## REZULTATI I DISKUSIJA

U radu je ispitan postupak imobilizacije PAC na nosač od industrijskog značaja, Sepabeads EC-HA, koji se zasniva na prethodnoj modifikaciji enzima derivatom alginata i naknadnom hemijskom vezivanju tako modifikovane PAC na komercijalni čvrsti nosač. Ovim bi se omogućilo vezivanje enzima na nosač preko ugljeno-hidratnog dela, koji je prethodno modifikacijom uveden u molekul, što potencijalno može da doprinese povećanju aktivnosti i stabilnosti imobilisanog enzima. Ut-

vrđeno je da pripremljeni novi glikoenzim, alginat–PAC, sadrži 53% ugljenohidratnog dela. Isto tako, utvrđeno je da je alginat–PAC kompleks zadržao oko 93% prvobitne aktivnosti odgovarajuće količine slobodnog enzima. Slične rezultate su dobili Mislovičova i sar., koji su utvrdili da je sadržaj ugljenohidratnog dela 55% u istom derivatu, ali oni nisu dalje ispitivali imobilizaciju dobijene alginat–PAC [7].

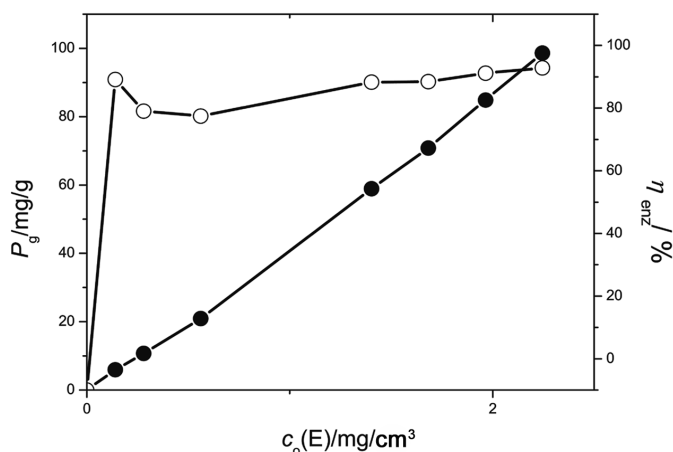
U daljim ispitivanjima ispitan je uticaj početne koncentracije alginat–PAC u rastvoru za imobilizaciju na masu vezanog enzima za nosač i maseni prinos imobilizacije. Početna koncentracija modifikovanog enzima je varirana u opsegu od 0,14 do 2,24 mg/cm<sup>3</sup>. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 1.

Na osnovu prikazanih rezultata (slika 1) može se zaključiti da masa vezanog enzima za nosač raste gotovo linearno sa povećanjem početne koncentracije enzi-

ma u rastvoru. Maksimalna masa vezanog enzima iznosila je 99 mg/g suvog nosača za početnu koncentraciju enzima u rastvoru 2,24 mg/cm<sup>3</sup>. Maseni prinos imobilizacije iznosio je 94,3%, ukazujući da se gotovo sva početna količina enzima vezala za nosač i da je kapacitet vezivanja proteina za nosač bio prilično veliki. Dobijeni rezultati su približno isti kao u slučaju nemodifikovanog enzima imobilisanog na Sepabeads EC-HA [24], tako da modifikacija enzima nije dovela do smanjenja mase vezanog enzima.

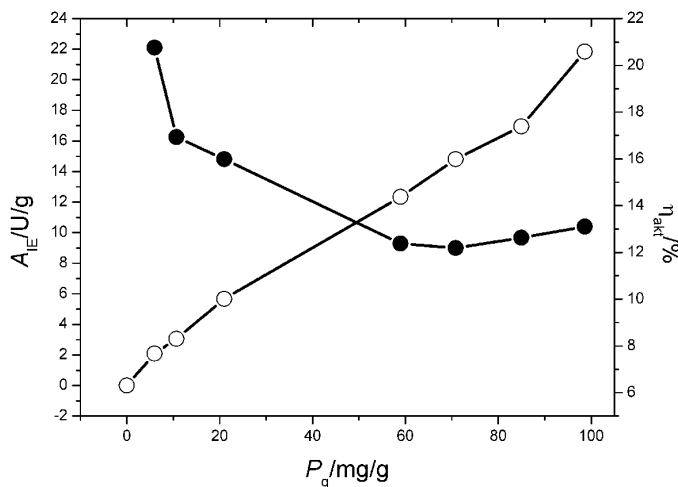
Dalje je ispitana aktivnost imobilisanog enzima i prinos aktivnosti u zavisnosti od mase vezane modifikovane PAC na nosač. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 2.

Na osnovu dobijenih rezultata (slika 2) može se zaključiti da se imobilizacijom enzima postigla aktivnost biokatalizatora od 2,1 do 21,8 IU/g, kao i prinosi aktiv-



Slika 1. Zavisnost mase vezanog enzima,  $P_g$  (●) i masenog prinosa imobilizacije,  $\eta_{enz}$  (○) od početne koncentracije modifikovanog enzima,  $c_0(E)$ .

Figure 1. Effects of initial alginate–PAC concentration in coupling solution,  $c_0(E)$ , on enzyme loading,  $P_g$  (●) and enzyme coupling yield,  $\eta_{enz}$  (○).



Slika 2. Zavisnost aktivnosti alginat–PAC–Sepabeads EC-HA,  $A_{IE}$  (○) i prinosa aktivnosti,  $\eta_{aktv}$  (●) od mase vezanog enzima.

Figure 2. Effects of enzyme loading,  $P_g$ , on activity of alginat–PAC–Sepabeads EC-HA,  $A_{IE}$  (○) and on activity coupling yield of alginat–PAC–Sepabeads EC-HA,  $\eta_{aktv}$  (●).

nosti od 7,6 do 20,7%. Prodanović i saradnici su za invertazu imobilisanu preko ugljenohidratnog dela na makroporozni glicidimetakrilat dobili prinos aktivnost od 46% [10].

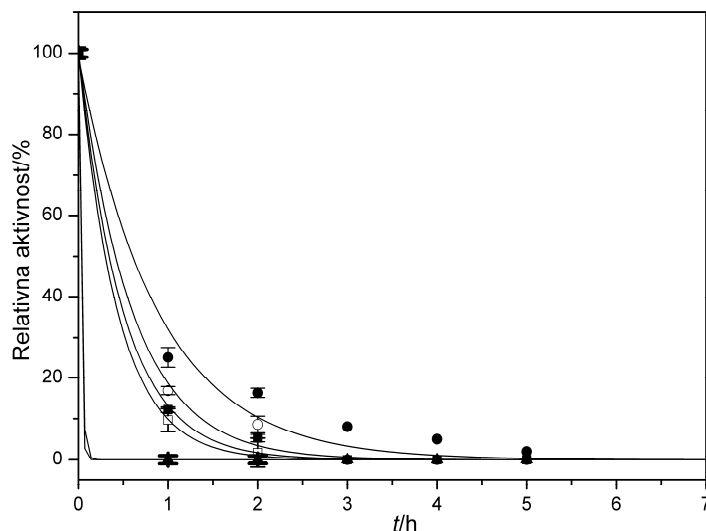
Kako je jedan od osnovnih razloga imobilizacije enzima njegova stabilizacija, ispitana je kinetika dezaktivacije slobodne PAC, modifikovanog enzima (alginat–PAC) i imobilisanog enzima (alginat–PAC–Sepabeads EC-HA) na dve ispitivane temperature, 40 i 50 °C. Eksperimentalni rezultati su modelovani kinetičkim modelom dezaktivacije prvog reda (jednačina (2)). Na slici 3 prikazani su rezultati gde simboli predstavljaju eksperimentalne vrednosti, a pune linije modelovane rezultate. Na osnovu modela dobijene su vrednosti konstanti brzine dezaktivacije za slobodnu PAC, alginat–PAC i alginat–PAC–Sepabeads EC-HA redom 2,03, 36,48 i 1,23 h<sup>-1</sup> na 40 °C i 2,32, 50,65 i 1,68 h<sup>-1</sup> na 50 °C. Izračunata poluvremena dezaktivacije,  $t_{1/2}$ , slobodne PAC, alginat–PAC i alginat–PAC–Sepabeads EC-HA iznosila su redom 0,34, 0,02 i 0,56 h na 40 °C, odnosno 0,30, 0,014 i 0,41 h na 50 °C. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je hemijska modifikacija destabilizovala enzim, ali da je njegovom imobilizacijom došlo do stabilizacije, pa je alginat–PAC imobilisana na Sepabeads EC-HA 1,38 puta stabilnija nego nativna, a čak 29,3 puta nego alginat–PAC na 50 °C.

Ispitan je uticaj temperature na aktivnost slobodne PAC, alginat–PAC i alginat–PAC–Sepabeads EC-HA (slika 4). Temperatura je varirana u intervalu od 9 do 75 °C. Aktivnost je izražena kao relativna aktivnost (%) u odnosu na optimalnu koja se uzima kao 100%. Uočava se da je optimalna temperatura u sva tri slučaja bila 27 °C,

ali je temperaturni profil alginat–PAC i alginat–PAC–Sepabeads EC-HA bio uži nego profil nativne PAC. Shah i saradnici su dobili maksimalnu aktivnost slobodne PAC na 60 °C [25].

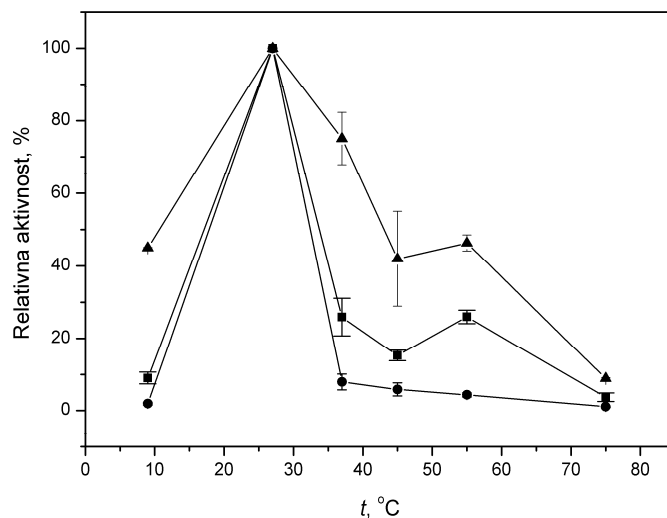
Ispitan je i uticaj pH vrednosti na aktivnost enzima, pri čemu se ispitivana pH vrednost kretala od 4,3 do 9 (slika 5). Nativna PAC je zadržala svoju aktivnost u širokom intervalu pH vrednosti koje su se kretale od 6,0 do 8,4, dok je na vrednostima ispod 6,0 i 8,4 aktivnost naglo opala. Bianchi i saradnici su dobili da nativna PAC ima maksimalnu aktivnost na pH vrednosti od 7,5, dok su Shah i saradnici dobili maksimalnu aktivnost na pH vrednosti od 8,0 [5,25]. Alginat–PAC je imala približno isti pH profil kao i nativna PAC, dok je alginat–PAC–Sepabeads EC-HA imala isti pH optimum kao i nativna PAC, ali je profil bio nešto uži.

Radi poređenja dobijenih rezultata, u ovom radu u tabeli 1 sumirani su rezultati dobijeni u literaturi koji se odnose na karakterizaciju PAC modifikovane različitim polisaharidima. Može se zaključiti da je u skoro svim slučajevima hemijska modifikacija doprinela stabilizaciji enzima, ali da su anjonski polisaharidi mnogo manje efikasni od neutralnih, dok alginat čak destabilizuje enzim. Međutim, u svim slučajevima pH i temperaturni profil modifikovanog enzima nije se promenio u odnosu na nativni. Iako hemijska modifikacija enzima derivatom alginata nije doprinela njegovoj stabilizaciji, doprinos ovog rada je u tome što je po prvi put pokazano da se tako modifikovani enzim može stabilizovati imobilizacijom na nosač od komercijalnog značaja pri čemu su postignuti odgovarajući maseni prinos imobilizacije i prinos aktivnosti.



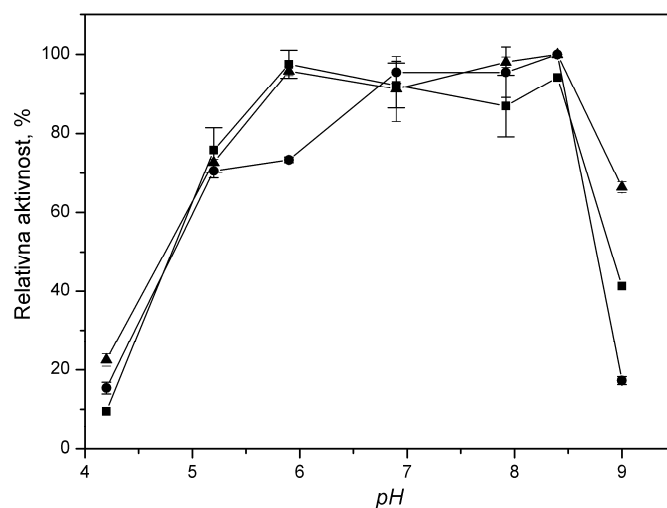
Slika 3. Zavisnost relativne aktivnosti enzima od vremena na temperaturama od 40 i 50 °C; puni simboli se odnose na 40 °C: nativna PAC (■), alginat–PAC (▲) i alginat–PAC imobilisana na Sepabeads EC-HA (●); otvoreni simboli se odnose na 50 °C: nativna PAC (▼), alginat–PAC (◻) i alginat–PAC imobilisana na Sepabeads EC-HA (○).

Figure 3. Thermal inactivation of native PAC (■), alginat–PAC (▲) and immobilized alginat–PAC on Sepabeads EC-HA (●) at 40 °C and native PAC (▼), alginat–PAC (◻) and immobilized alginat–PAC on Sepabeads EC-HA (○) at 50 °C.



Slika 4. Zavisnost relativne aktivnosti enzima od temperature: nativna PAC (▲), alginat–PAC imobilisana na Sepabeads EC-HA (●) i alginat–PAC (■).

Figure 4. Effects of temperature on activities of native PAC (▲), alginate–PAC (■) and immobilized alginate–PAC on Sepabeads EC-HA (●).



Slika 5. Zavisnost relativne aktivnosti enzima od pH vrednosti: nativna PAC (▲), alginat–PAC imobilisana na Sepabeads EC-HA (●) i alginat–PAC (■).

Figure 5. Effects of pH on activities of native PAC (▲), alginate–PAC (■) and immobilized alginate–PAC on Sepabeads EC-HA (●).

Tabela 1. Upporedni prikaz rezultata modifikacije PAC prirodnim polisaharidima prema podacima iz literature

Table 1. Review of the chemical modification of PAC with natural polysaccharides

Derivat	Maseni prinos imobilizacije, $\eta_{enz}$	Prinos aktivnosti, $\eta_{akt}$	$t_{1/2, 50^\circ C}$ min	Stabilizacioni faktor	pH optimum	Temperaturni optimum, $^\circ C$	Referenca
Konjugat CM <sup>3</sup> -celuloza-PAC	65	46%	34,47	2,26	8	55–60	[8]
Dekstran-71000-dialdehid-PAC	77,9	59,1	240	6,15	–	60	[9]
Dekstran-37700-dialdehid-PAC	92,2	63,0	237	6,08	–	60	[9]
Dekstran-11500-dialdehid-PAC	79,9	48,3	204	5,23	–	60	[9]
Manan-PGA	–	7,50 <sup>b</sup> U/mg	60 <sup>c</sup>	–	–	–	[7]
Neutralni dekstran PGA	–	5,78 <sup>b</sup> U/mg	107 <sup>c</sup>	–	–	–	[7]
Pektin-PGA	–	5,44 <sup>b</sup> U/mg	21 <sup>c</sup>	–	–	–	[7]

Tabela 1. Nastavak  
Table 1. Continued

Derivat	Maseni prinos imobilizacije, $\eta_{enz}$	Prinos aktivnosti, $\eta_{akt}$	$t_{1/2, 50\text{ }^\circ\text{C}}$ min	Stabilizacioni faktor	pH optimum	Temperaturni optimum, $^\circ\text{C}$	Referenca
Skrob-PAC imobilisana na Sepabeads EC-EA	81,0	72,9	126	7,0	–	–	[24]
Alginat-PAC-Sepabeads	91,7	20,7	24,6	1,38	6,9–8,4	27	Ovaj rad

<sup>a</sup>Karboksimetil; <sup>b</sup>podaci dati za 55  $^\circ\text{C}$ ; <sup>c</sup>podaci se odnose na specifičnu aktivnost

## ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da sintetski nosač Sepabeads EC-HA ima veliki kapacitet vezivanja za PAC, koja je prethodno modifikovana derivatom alginata, tako da se gotovo sva početna količina enzima vezuje za nosač (99 mg/g suvog nosača). Takođe, utvrđeno je da imobilizacija alginat-PAC na Sepabeads EC-HA dovodi do termalne stabilizacije enzima na 40 i 50  $^\circ\text{C}$ , dok se pH i temperaturni optimum imobilisane PAC ne menjaju značajnije u odnosu na nativan enzim.

## Simboli

A – Aktivnost u vremenu t

$A_{IE}$  – Aktivnost imobilisanog modifikovanog enzima, IU/g

$c_0(E)$  – Početna koncentracija modifikovanog enzima, mg/cm<sup>3</sup>

D – Potpuno neaktivni krajnji enzimski oblik

E – Potpuno aktivni slobodni enzim

$k_d$  – Konstanta brzine deaktivacije prvog reda

$P_g$  – Masa vezanog modifikovanog enzima, mg/g suvog nosača

$t_{1/2}$  – Poluvreme deaktivacije, h

$\eta_{akt}$  – Prinos aktivnosti, %

$\eta_{enz}$  – Maseni prinos imobilizacije, %.

## Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije za finansijsku podršku ovom radu u okviru projekta III 46010 kao i kompanijama DSM (Holandija) za donaciju penicilin-acilaze i Resindion S. R. L. (Italija) za donaciju Sepabeads EC-HA nosača, korišćenih u ovom radu.

## LITERATURA

- [1] C.P. Chou, B.Y. Kuo, W.J. Lin, Optimization of the host/vector system and culture conditions for production of penicillin acylase in *Escherichia coli*, *J. Biosci. Bioeng.* **88** (1999) 160–167.
- [2] J. Zhao, Y. Wang, G. Luo, S. Zhu, Covalent immobilization of penicillin G acylase on aminopropyl-functionalized mesostructured cellular foams, *Bioresource Technol.* **101** (2010) 7211–7217.

- [3] J. He, X. Li, D.G. Evans, X. Duan, C. Li, A new support for the immobilization of penicillin acylase, *J. Mol. Catal. B* **11** (2000) 45–53.
- [4] G. Palmieri, P. Giardina, B. Desiderio, L. Marzullo, M. Giamberini, G. Sanna, A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase, *Enzyme Microb. Technol.* **16** (1994) 151–158.
- [5] D. Bianchi, P. Golini, R. Bortolo, P. Cesti, Immobilization of penicillin G acylase on aminoalkylated polyacrylic supports, *Enzyme Microb. Technol.* **18** (1996) 592–596.
- [6] R. Torres, B. Pessela, M. Fuentes, R. Munilla, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, Stabilization of enzymes by multipoint attachment via reversible immobilization on phenylboronic activated supports, *J. Biotechnol.* **120** (2005) 396–401.
- [7] D. Mislovicova, J. Masarova, M. Bucko, P. Gemeiner, Stability of penicillin G acylase modified with various polysaccharides, *Enzyme Microb. Technol.* **39** (2006) 579–585.
- [8] D.C. Ozturk, D. Kazan, A. Erarslan, Stabilization and functional properties of *Escherichia coli* penicillin G acylase by covalent conjugation of anionic polysaccharide carboxymethylcellulose, *World J. Microb. Biotechnol.* **18** (2002) 881–888.
- [9] D. Kazan, H. Ertan, A. Erarslan, Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48** (1997) 191–197.
- [10] R. Prodanović, S. Jovanović, Z. Vujčić, Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate, *Biotechnol. Lett.* **23** (2001) 1171–1174.
- [11] R. Prodanović, M. Simić, Z.M. Vujčić, Immobilization of periodate oxidized invertase by adsorption on sepiolite, *J. Serb. Chem. Soc.* **68** (2003) 819–824.
- [12] R.M. Prodanović, S.M. Jovanović, Z.M. Vujčić, Immobilization of invertase via its carbohydrate moiety on macroporous glycidyl methacrylate, *APTEFF* **32** (2001) 151–156.
- [13] L. Gomez, H.L. Ramírez, M.L. Villalonga, J. Hernandez, R. Villalonga, Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation, *Enzyme Microb. Technol.* **38** (2006) 22–27.
- [14] M. Žuža, N. Milosavić, Z. Knežević-Jugović, Immobilization of modified penicillin G acylase on Sepabeads carriers, *Chem. Pap.* **63** (2009) 117–124.

- [15] J. Bryjak, J. Anilyte, J. Liesiene, Evaluation of man-tailored cellulose-based carriers in glucoamylase immobilization, *Carbohydr. Res.* **342** (2007) 1105–1109.
- [16] Resindion SRL (2006). Mitsubishi Chemical Corporation: Products Line, <http://www.resindion.com>
- [17] C. Mateo, O. Abian, G. Fernandez-Lorente, J. Pedroche, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, A. Tam, M. Damiani, Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment, *Biotechnol. Prog.* **18** (2002) 629–634.
- [18] Y. Hori, A.M. Winans, D.J. Irvine, Modular injectable matrices based on alginate solution/microsphere mixtures that gel in situ and co-deliver immunomodulatory factors, *Acta Biomater.* **5** (2009) 969–982.
- [19] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265–275.
- [20] R. Villalonga, M. L. Villalonga, L. Gyme, Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **10** (2000) 483–490.
- [21] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **28** (1956) 350–356.
- [22] Z. Knežević, N. Milosavić, D. Bezbradica, Ž. Jakovljević, R. Prodanović, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by covalent attachment, *Biochem. Eng. J.* **30** (2006) 269–278.
- [23] M.G. Žuža, S.S. Šiler-Marinković, Z.D. Knežević, Preparation and characterization of penicillin acylase immobilized on Sepabeads EC-EP carrier, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **13** (2007) 205–210.
- [24] M. Žuža, N. Milosavić, Z. Knežević-Jugović, Immobilization of modified penicillin G acylase on Sepabeads carriers, *Chem. Pap.* **63** (2009) 117–124.
- [25] P. Shah, N. Sridevi, A. Prabhune, V. Ramaswamy, Structural features of Penicillin acylase adsorption on APTES functionalized SBA-15, *Micropor. Mesopor. Mat.* **116** (2008) 157–165.

## SUMMARY

### IMMOBILIZATION OF ALGINATE–PAC ON SEPABEADS EC-HA SUPPORT

Milena G. Žuža<sup>1</sup>, Nenad B. Milosavić<sup>2</sup>, Zorica D. Knežević-Jugović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Penicillin acylase (PAC) is an important industrial enzyme for the production of many  $\beta$ -lactam antibiotics. It is capable of catalyzing the hydrolysis of penicillin G (Pen G) to generate phenylacetic acid (PAA) and 6-aminopenicillanic acid (6-APA). In this paper, in order to prevent enzyme inactivation, an attempt of coupling enzyme modification and immobilization is presented. Chemical modification was promoted to introduce carbohydrate moiety into the PAC molecule, capable of being covalently linked to an amino support. This seems to provide a possibility to couple the enzyme without risking a reaction at the active site which might cause a loss of activity. PAC molecules were modified by cross-linking with polyaldehyde derivatives of alginate in order to add them new and useful functions. Immobilization of alginate-PAC on Sepabeads EC-HA was used as a model system in order to demonstrate the potential of this strategy. Optimal conditions for covalent immobilization of alginate-PAC from *Escherichia coli* on support Sepabeads EC-HA were investigated. The immobilized enzyme was then characterized by evaluating the potential effects of immobilization on its thermal stability, temperature and pH profile in comparison with native non-modified PAC and modified non-immobilized PAC. The maximum amount of the alginate-PAC coupled on the dry support of 99 mg/g was satisfactory. Deactivation rate constants at 50 °C for free PAC, alginate-PAC and alginate-PAC immobilized on Sepabeads EC-HA were 2.32, 50.65 and 1.68 h<sup>-1</sup>, respectively. Alginate-PAC and alginate-PAC immobilized on Sepabeads EC-HA had the same pH and temperature optimum as the native non-modified PAC.

**Keywords:** Penicillin acylase • Modification • Alginate • Immobilization • Sepabead EC-HA support