

Irena GANCARZ<sup>1</sup>, Jolanta BRYJAK<sup>2</sup>, Gryzelda POŹNIAK<sup>1</sup>

## IMMOBILIZACJA ENZYMU NA MODYFIKOWANYCH PLAZMĄ MEMBRANACH POLIMEROWYCH

**Streszczenie.** Polisulfonowe membrany żelowe modyfikowano plazmą amoniaku lub amoniaku z argonem. Po modyfikacji zaobserwowano wyraźny wzrost składowej polarnej napięcia powierzchniowego, a FTIR-ATR wykazuje obecność rozmaitych ugrupowań funkcyjnych na powierzchni. Aktywność immobilizowanej izomerazy glukozy na modyfikowanych membranach osiągnęła wartości od 9 do 20 U.

## IMMOBILIZATION OF ENZYME ON THE PLASMA MODIFIED POLYMER MEMBRANES

**Summary.** Polysulfone gel membranes were modified with ammonium or ammonium/argon plasma. Dramatic increase of polar component of surface tension was observed. FTIR-ATR also proves the presence of new functional groups. Glucose isomerase was successfully immobilized on plasma-treated surfaces and its activity was in the range 9-20 U.

### 1. Wprowadzenie

Obróbka różnych materiałów plazmą zmienia w znacznym stopniu ich właściwości powierzchniowe. Technika ta jest efektywniejsza i bardziej użyteczna niż większość metod chemicznych, mechanicznych czy termicznych i jest znacznie bardziej „przyjazna” dla środowiska. Co więcej, z pojedynczego materiału, poprzez zmianę medium plazmy czy jej parametrów, możemy otrzymać całą gamę powierzchni o różnych właściwościach. Tę technikę

---

<sup>1</sup> Politechnika Wroclawska, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wroclaw, Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych

<sup>2</sup> Politechnika Wroclawska, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wroclaw, Instytut Inżynierii Chemicznej i Urządzeń Ciepłych

autorzy stosowali do modyfikacji membran polisulfonowych, uzyskując polepszenie wskaźników filtracji, zmniejszenie podatności na blokowanie i efektywniejszą ich regenerację [1-5]. Na powierzchni polisulfonu wykrywano obecność nowych grup funkcyjnych, np. hydroksylowych, aminowych, karboksylowych, a ich rodzaj zależał od stosowanego medium plazmy.

W literaturze najnowszej pojawiają się doniesienia o skutecznym wykorzystaniu techniki plazmowej do immobilizacji rozmaitych białek, np. insuliny i heparyny [6], kwasu hialuronowego [7] czy kolagenu [8], głównie w celu polepszenia kompatybilności z krwią, adhezji i wzrostu komórek śródnabłonkowych. Izomerazę glukozową immobilizowano na powierzchni polisulfonu modyfikowanego plazmą alkoholu allilowego [9].

W obecnej pracy podjęto próbę wykorzystania plazmy amoniaku do immobilizacji izomerazy glukozowej na żelowej membranie polisulfonowej. Izomerazy glukozowe są wewnątrzkomórkowymi enzymami, które katalizują odwracalną, stereospecyficzną konwersję D-ksylozy do D-ksylulozy. Z praktycznego punktu widzenia największe znaczenie ma izomerizacja D-glukozy do D-fruktozy wykorzystywana w produkcji syropu o dużej zawartości fruktozy [10, 11].

## **2. Część eksperymentalna**

### **2.1. Materiały**

Polisulfon (PSU) Udel P-1700 (Amoco Co.) był dostarczony przez Aldrich Chem.Co.Ltd., amoniak i argon - przez Linde Gas, Poland. Izomeraza glukozowa (Maxazym GI, K8587A) o aktywności właściwej 3.3 U/mg była darem firmy Gist-Brocades. Dijodometan, aldehyd glutarowy, zestaw do oznaczeń białka metodą Lawry'ego, tryptamina pochodziły z firmy Sigma Chemical Co., fruktoza i glukoza z firmy Merck. Chloroform i pozostałe odczynniki zakupiono w POCH, Polska.

### **2.2. Formowanie membran**

Żelowe membrany polisulfonowe były wylewane z 20% chloroformowego roztworu na płytki szklane i suszone 6 h w temp. 120°C. Z folii były wycinane krążki o średnicy 78 mm.

### **2.3. Obróbka plazmą**

Plazma wytwarzana była za pomocą mikrofalowego generatora (Plazmatronika, Polska) o częstotliwości 2.45 GHz, w rurze kwarcowej będącej górną częścią szklanego reaktora. Stosowano plazmę pulsacyjną o częstotliwości 125 Hz przy czasie trwania pulsu 2 ms i okresie 8

sek. Ciśnienie początkowe w reaktorze -  $5 \times 10^{-3}$  hPa, końcowe 1 hPa, czas trwania - 180 sek. Pozostałe parametry plazmy podano poniżej:

Parametr	Medium plazmy	
	NH <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> / Ar
Przepływ argonu, cm <sup>3</sup> /min	-	10
Ciśnienie argonu, hPa	-	0.3
Moc plazmy, W	120	60

Zmiennym parametrem była odległość próbki od krawędzi plazmy – 10,5; 45 lub 65 mm.

## 2.4. Charakterystyka powierzchni

### 2.4.1. Pomiar kątów zwilżania

Kąty zwilżania wody i diiodometanu oznaczono metodą stojącej kropli za pomocą urządzenia TM 50 (Technicome SA, Francja) wyposażonego w kamerę Panasonic GL 350. Wyniki są średnią z 20 pomiarów. Z nich obliczano wielkość napięcia powierzchniowego  $\gamma$  oraz jego składowych - polarnej  $\gamma_p$  i dyspersyjnej  $\gamma_d$ , wg pracy [12]. Składowe polarne i dyspersyjne napięcia powierzchniowego wybranych cieczy przyjęto za pracą Kuznietsova [13].

### 2.4.2. Spektroskopia w podczerwieni

Widma FTIR wykonano na aparacie Perkin Elmer System 2000 stosując przystawkę ATR firmy Spectra-Tech z kryształem germanu (45°). Zbierano 64 skany z rozdzielczością 4 cm<sup>-1</sup>.

## 2.5. Immobilizacja izomerazy glukozy

### 2.5.1. Etap aktywacji

Jako aktywator grup aminowych stosowano aldehyd glutarowy. Dwa modyfikowane i pocięte krążki membrany umieszczano w 0,1 M buforze fosforanowym (pH=7). Dodawano 20 cm<sup>3</sup> roztworu aldehydu glutarowego w buforze (5% obj.). Po 2 godz. aktywacji odmywano nadmiar aktywatora wodą destylowaną i buforem fosforanowym.

### 2.5.2. Etap immobilizacji

Aktywowane membrany umieszczono w 25 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu (3 mg na 1 cm<sup>3</sup> buforu fosforanowego) i mieszano przez 2 godz. Nadmiar białka odmywano kolejno roztworami: 0,1 M buforem fosforanowym (pH=7), 0,5 M NaCl w 0,1 M buforze fosforanowym (pH=7), 0,1 M buforem octanowym (pH=5) i wodą destylowaną. Celem zablokowania nieprzereago-

wanych grup aktywatora, membrany przetrzymywano 24 h w 0,5 M buforze tris-HCl (pH=8) w temp. 4°C.

### 2.5.3. Oznaczanie aktywności enzymu

Prowadzono standardową reakcję katalityczną używając jako substratu glukozy. 0,01 M bufor magnezowy doprowadzano do pH równego 8 przez dodatek 0,01 M kwasu siarkowego. Po określonym czasie inkubacji (5, 10...25 min) w 60°C pobierano 100 µl próbki celem pomiaru ilości wyprodukowanej fruktozy. Stężenie fruktozy oznaczono spektrofotometrycznie wg metody Taylora [14]. Próbkę dodawano do 3 cm<sup>3</sup> stężonego HCl, zawierającego 100 µl 0,01 M roztworu tryptaminy w 0,1 M HCl. Po 15 min termostatowania w 60°C i 40 min w 25°C określano absorbcję przy długości fali 518 nm. Stężenie fruktozy określono z wykonanej wcześniej krzywej standardowej. Jednostka aktywności izomerazy glukozy U jest definiowana jako ilość enzymu, która w warunkach początkowej szybkości reakcji wytwarza 1 mg (1 µmol) fruktozy w czasie 1 min.

### 2.5.4. Aktywność immobilizowanego enzymu

Membrany z immobilizowanym enzymem umieszczano w 25 cm<sup>3</sup> buforu, do którego dodawano 25 cm<sup>3</sup> roztworu substratu i całość termostatowano w 60°C. Po określonym czasie (1,2,...30 min) mieszania pobierano 100 µl próbki i natychmiast oznaczano zawartość fruktozy. Aktywność obliczano z początkowego (<5% konwersji) zakresu krzywej.

## 3. Rezultaty i dyskusja

### 3.1. Wybór medium plazmy

Celem etapu modyfikacji plazmowej w obecnej pracy było wprowadzenie na powierzchnię polisulfonu grup aminowych. Amoniak wydawał się dobrym medium plazmy dla osiągnięcia tego celu. Uprzednio [4] wykazano, że obecność argonu w gazie ułatwia zapalenie się plazmy i zapewnia jej większą stabilność; zmienia jednak nieco jej charakter; zwiększa ilość azotu, ale też i tlenu na powierzchni polisulfonu. Azot występuje w postaci grup amidowych, imidowych, nitrylowych i aminowych, jednakże ich ilościowe rozróżnienie jest trudne nawet metodą spektroskopii fotoelektronowej (XPS) [4]. Z tego powodu więc przebadano działanie plazmy zarówno samego amoniaku, jak i jego mieszaniny z argonem.

### 3.2. Właściwości powierzchniowe modyfikowanych membran

#### 3.2.1. Napięcie powierzchniowe

Rezultaty obliczeń napięcia powierzchniowego modyfikowanych próbek w opartych na oznaczeniach kątów zwilżania wody i dijdometanu podano w tabeli 1.

Tabela 1

Napięcie powierzchniowe membrany polisulfonowej modyfikowanej plazmą amoniaku i amoniaku z argonem w zależności od położenia próbki w reaktorze

Medium plazmy	Odległość próbki od plazmy mm	Napięcie powierzchniowe, mN/m		
		$\gamma_n$	$\gamma_d$	$\gamma$
Amoniak	65	22,2	26,4	48,6
	46	22,9	27,0	49,9
	10,5	23,0	26,4	49,4
Amoniak + argon	65	25,5	29,5	55,1
	46	26,6	29,3	55,9
	10,5	26,9	29,4	56,3

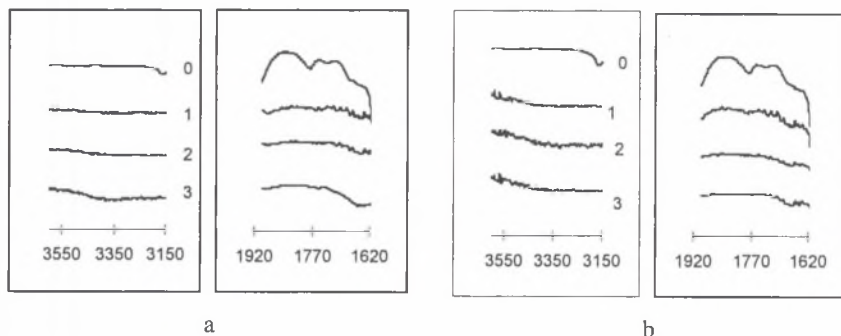
Polisulfon jest polimerem hydrofobowym, jego napięcie powierzchniowe ma wartość 45,9 mN/m, w tym udział składowej polarnej tylko 0,9 mN/m, co stanowi niespełna 2%. Obróbka plazmą amoniaku (tab.1) nie wpływa znacznie na wartość całkowitego napięcia powierzchniowego, natomiast dramatycznie zmienia wzajemny stosunek obu składowych. Udział składowej polarnej stanowi tutaj ok. 46% napięcia całkowitego. Dodatek argonu powoduje nieco większe zmiany (wzrost  $\gamma$  o ok.10 mN/m), przy czym udział składowej polarnej jest podobny (46,2 - 47,8%). Zaskakująco mały jest wpływ odległości próbki od plazmy. Całkowite napięcie powierzchniowe i składowa polarna zdają się nieco zwiększać wraz ze zmniejszeniem odległości, ale zmiany te są minimalne.

#### 3.2.2. Spektroskopia w podczerwieni

IR-ATR jest rutynową techniką badania powierzchni. Głębokość penetracji promienia jest jednak dwa rzędy większa niż grubość modyfikowanej plazmowo warstwy, stąd intensywność pasm pochodzących od nowo powstałych ugrupowań jest mała.

Mniejsza intensywność pasm pochodzących od polisulfonowego podłoża sugerowałyby osadzenie się warstwy nowego materiału na powierzchni membrany. Amoniak nie jest jednak gazem polimeryzującym w plazmie, może więc być to warstwa wytrawionego i ponownie osadzonego materiału powierzchni. W widmie (rys.1) pojawia się szerokie pasmo o małej

intensywności w zakresie  $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$  (rys.1) z maksimum ok.  $3350\text{ cm}^{-1}$ . Wydaje się niemal niezależne od położenia próbki w plazmie, jak i obecności argonu. Niestety, w tym zakresie częstotliwości absorbuje wiele grup funkcyjnych (np. aminy, amidy, sulfonamidy, grupa hydroksylowa), co uniemożliwia jednoznaczne określenie, czy dominują interesujące nas grupy aminowe.



Rys.1. Wybrane pasma widma FTIR-ATR polisulfonu modyfikowanego plazmą amoniaku (a) i amoniaku z argonem (b); odległość próbki od plazmy - 1- 65, 2 - 47, 3 - 10,5 mm, linia 0 – PSU

Fig.1. Chosen bands of FTIR-ATR spectra of polysulfone modified with ammonia (a) and ammonia with argon (b) plasma; line 0 - PSU, distance from plasma - line 1 - 65, 2 - 47, 3 -10.5 mm

Przy  $1668\text{ cm}^{-1}$  (rys 1) pojawia się pasmo, które może pochodzić od drgań grupy C=O amidów i innych grup wprowadzonych w wyniku reakcji generowanych w plazmie rodników z powietrzem.

### 3.2.3. *Immobilizacja enzymu*

Immobilizacja enzymu na modyfikowanych plazmą membranach, obok dalekosiężnego aspektu technologicznego, ma także aspekt analityczny - powinna pozwolić na potwierdzenie obecności grup aminowych na powierzchni polisulfonu traktowanej plazmą amoniaku. Rezultaty oznaczenia aktywności immobilizowanego enzymu podano w tabeli 2.

Widać, że aktywność jest różna od zera, a więc pewna ilość enzymu została kowalencyjnie związana na powierzchni membrany. Więcej enzymu ulega immobilizacji po modyfikowaniu plazmą amoniaku z dodatkiem argonu.

Tabela 2

Aktywność enzymu immobilizowanego na membranach polisulfonowych modyfikowanych plazmowo w zależności od położenia próbki w reaktorze

Odległość próbki od plazmy mm	Medium plazmy	
	amoniak	amoniak + argon
	aktywność enzymu, U	
65	8,9	13,6
46	11,3	15,7
10,5	15,2	20,1

Obserwuje się też wpływ położenia próbki w reaktorze - aktywność enzymu zwiększa się wraz ze zmniejszeniem odległości między próbka a krawędzią plazmy.

#### 4. Wnioski

Immobilizację izomerazy na membranach polisulfonowych umożliwiają wprowadzone przez plazmę amoniaku grupy funkcyjne. Aktywność enzymu większa jest w przypadku modyfikacji powierzchni membran mieszaniną plazmy amoniaku i argonu.

#### Literatura

1. Gancarz I., Poźniak G., Bryjak M.: Modification of polysulfone membranes.1. CO<sub>2</sub> plasma treatment. Eur. Polym. J., 1999, 35, 1419.
2. Gancarz I., Poźniak G., Bryjak M., Frankiewicz A.: Modification of polysulfone membranes.2. Plasma grafting and plasma polymerization of acrylic acid. Acta Polym., 1999, 50, 317.
3. Gancarz I., Poźniak G., Bryjak M.: Modification of polysulfone membranes.3. Effect of nitrogen plasma. Eur. Polym. J., 2000, 36, 1563.
4. Bryjak M., Gancarz I., Poźniak G., Tylus W.: Modification of polysulfone membranes.4. Ammonia plasma treatment. Eur. Polym. J., 2002, 38, 717.
5. Gancarz I., Bryjak M., Poźniak G., Tylus W.: Modification of polysulfone membranes.5. Plasma polymerization of n-butyl and allylamine., w druku.
6. Kim Y.J., Kang I-K., Huh M.W., Yoon S.Ch.: Surface characterization and in vitro blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. Biomat., 2000, 21, 121.

7. Mason M., Vercruyse K.P., Kirker K.R., Frisch R., Marecak M.D., Prestwich G.D., Pitt W.G.: Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene, and polytetrafluoroethylene. *Biomat.*, 2000, 21, 31.
8. Chandy T., Das G.S., Wilson R.F., Rao G.H.R.: Use of plasma glow for surface-engineering biomolecules to enhance bloodcompatibility of dacron and PTFE vascular prosthesis. *Biomat.*, 2000, 21, 699.
9. Gancarz I., Bryjak J., Pożniak G.: Membrany polimerowe modyfikowane plazmą jako nośniki do immobilizacji biokatalizatorów, I Sympozjum Centrum Biomonitoringu, Biotechnologii i Ochrony Ekosystemu Dolnośląskiego, 2001, 65.
10. Guzman-Maldonado H., Paredes-Lopez O.: Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1995, 35, 373.
11. Antrim R.L., Colilla, W. Schnyder, B.J.: Glucose isomerase production of high-fructose syrups. *Appl. Biochem. Bioeng.*, 1979, 2, 97.
12. Wu S.: *Polymer Interface and Adhesion*, M.Dekker, New York 1982.
13. Kuznietsov A. Yu., Bagrgansky V. A., Popov A. K.: *J.Appl.Polym.Sci.*, 1993, 47, 1175.
14. Taylor K.A.C.: A calorimetric fructose assay, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1995, 53, 215.

*Badania finansowane z grantów: KBN 7 TO9C 088 20 i Centrum BBiOEDŚI Nr 331 861.*

## **Abstract**

Polysulfone gel membranes were modified with ammonia or ammonia/argon plasma. Such treatment insignificantly increases total surface tension of the sample changing however dramatically ratio between its polar and dispersive component; the former increases from 0.9 mN/m for PSU to above 20 mN/m, becoming almost equal dispersive one. Very weak influence on sample distance from the plasma is observed. FTIR-ATR results prove the presence of new functional groups on the modified surface, their exact discrimination is however impossible. The chosen enzyme, glucose isomerase, was successfully immobilized on plasma treated surfaces; its activity was in the range of 9-15 U for ammonia and 14-20 U for ammonia/argon plasma and seems to increase with reduction plasma to sample distance.