

Anna TRUSEK-HOŁOWNIA, Andrzej NOWORYTA

e-mail: anna.trusek-holownia@pwr.edu.pl

Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Zastosowanie enkapsulowanego enzymu w oczyszczaniu roztworów na przykładzie usuwania H₂O₂

Wstęp

W większości technologii produkcyjnych czy w oczyszczaniu ścieków wykorzystywane są enzymy immobilizowane mające przewagę nad formą natywną przede wszystkim dzięki możliwości ich wielokrotnego wykorzystania, a często również dzięki lepszej stabilności operacyjnej [Kmieciak i Wójcik, 2009]. Z uwagi na łatwość procedury wytworzenia, koszt i przede wszystkim bezproblemową separację ze strumienia mieszaniny reakcyjnej znaczące miejsce w tych aplikacjach znajdują preparaty z enzymem enkapsulowanym [Blandido i in., 2001; Taqieddin i Amiji, 2004; Matto i Husain, 2009]. Jako nośnik stosowane są różnego typu hydrożele, najczęściej na bazie alginianu, kolagenu i chitozanu [Hedstrom i in., 1998; Hori i in., 2009; Yang i in., 2011; Papajova i in., 2012].

W celu pełnego wykorzystania katalizatora, jego stężenie wewnątrz kapsułki a także rozmiar kapsułki powinien być tak dobrany, aby proces przebiegał w reżimie kinetycznym.

W pracy przedstawiono model takiego procesu enzymatycznego. Jego zastosowanie rozpatrzono na podstawie reakcji usuwania nadtlenu wodoru przez katalazę. Dla takiego układu wyznaczono parametry modelu, przeprowadzono weryfikację oraz dokonano analizy modelowej.

Katalaza jest enzymem katalizującym rozkład H₂O₂ do tlenu cząsteczkowego i wody. Pomimo powszechnego przekonania, że nadtlenek wodoru to substancja nietrwała, w roztworach rozcieńczonych rozkłada się on bardzo powoli. W badaniach własnych prowadzonych dla stężenia 2,5 g·dm⁻³ przy pH 5,5 i 7,0, w ciągu godziny rozłożyło się ok. 2% wprowadzonej substancji. Pojawienie się znaczącej ilości H₂O₂ i konieczność jego przyspieszonego rozkładu związana jest przede wszystkim z dwoma przemysłami: mleczarskim i tekstylnym. W przemyśle mleczarskim dodanie H₂O₂ umożliwia transportowanie i przechowywanie krótkoterminowe mleka.

Nadtlenek wodoru użyty w odpowiednim stężeniu zapobiega rozwojowi mikroorganizmów obecnych w świeżym mleku. Hamuje on namnażanie komórek oraz stopniową degradację komórek już obecnych. Jest to metoda znana jako zimna pasteryzacja. Przed dopuszczeniem do spożycia przez ludzi lub do procesów dalszego przetwarzania zastosowany nadtlenek wodoru musi niemal całkowicie zostać usunięty [Tarhan, 1995].

W przemyśle tekstylnym H₂O₂ jest stosowany jako środek wybielający tkaniny. Kataliza enzymatyczna jest alternatywną drogą usuwania tego związku do znanych metod chemicznych generujących ścieki zawierające wysokie stężenia soli [Costa i in., 2002].

Model procesu nieustalanej dyfuzji z reakcją enzymatyczną w geometrii kulistej

Przedstawiony model został opracowany w oparciu o literaturę dotyczącą układów z równoczesną dyfuzją i reakcją chemiczną [Van't Riet i Tramper, 1991; Burghardt i Bartelmus, 2001; Baldyga i in., 2012].

Do modelowania rozpatrywanego układu przyjęto następujące założenia:

1. Układ składa się z żelowych kapsulek w postaci monodispersyjnych kul o promieniu R i ciekłego ośrodka zewnętrznego. Objętość kul nie zmienia się w czasie trwania procesu.

2. Kapsułki zawierają w swym wnętrzu jednorodnie rozmieszczony enzym o znanym stężeniu. Stężenie enzymu nie zmienia się w czasie. Na skutek inaktywacji zmienia się w czasie aktywność enzymu opisana równaniem:

$$\frac{a_E}{a_{E,0}} = e^{-k_{\text{inakt}} t} \quad (1)$$

3. Główny (jedyne) substrat reakcji wnika z ośrodka zewnętrznego do powierzchni kapsułki na zasadzie konwekcji, zgodnie z równaniem:

$$n_{S,w} = \beta_w [C_{S,w} - C_S(R)] \quad (2)$$

Jego stężenie w ośrodku zewnętrznym wynosi $C_{S,w}$ i może być zmienne w czasie: $C_{S,w}(t)$.

4. Na granicy faz panuje stan równowagi, opisany współczynnikiem podziału P_S :

$$C_S(R, t) = P_S C_{S,w}(t) \quad (3)$$

5. We wnętrzu kapsułki ma miejsce dyfuzyjny transport substancji.

6. Substrat ulega reakcji z szybkością:

$$r_{\text{imm}} = \frac{dC_S}{dt} = k_{i,\text{imm}} C_{E,\text{imm}} \frac{a_E}{a_{E,0}} C_S = k' C_S \quad (4)$$

7. Produkty reakcji nie wpływają na dyfuzję substratu ani na przebieg reakcji.

Stężenie substratu wewnątrz kuli jest funkcją miejsca i czasu, $C_S(r, t)$. Stąd:

$$\frac{\partial C_S}{\partial t} = D_S \nabla^2 C_S - r_{\text{imm}} \quad (5)$$

Laplasjan w układzie sferycznym ma postać:

$$\nabla^2 C_S = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_S}{\partial r} \right) = \left(\frac{\partial^2 C_S}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_S}{\partial r} \right) \quad (6)$$

Stąd równanie (5) można wyrazić jako:

$$\frac{\partial C_S}{\partial t} = D_S \left(\frac{\partial^2 C_S}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_S}{\partial r} \right) - k' C_S \quad (7)$$

Dla powyższego równania można znaleźć rozwiązanie dla procesu ustalonego ($C_S(r)$) uzyskując profil stężenia w kapsułce:

$$C_S(r) = P_S C_{S,w} \frac{R}{r} \frac{\sinh\left(r \sqrt{\frac{k'}{D_S}}\right)}{\sinh\left(R \sqrt{\frac{k'}{D_S}}\right)} \quad (8)$$

Wprowadzając zmodyfikowaną postać modułu Thiele'ego:

$$\Phi^2 = R^2 \frac{k'}{D_S} \quad (9)$$

uzyskuje się:

$$C_S(r) = P_S C_{S,w} \frac{R}{r} \frac{\sinh\left(\frac{r}{R} \Phi\right)}{\sinh(\Phi)} \quad (10)$$

Średnie stężenie substratu w kapsułce wyraża się zależnością:

$$C_{S,m} = \int_0^R \frac{C_S(r) A(r) dr}{V_{\text{alg}}} \quad (11)$$

Stąd po scałkowaniu:

$$C_{S,m} = \frac{3P_S C_{S,w} D_S}{k R^2 \sinh(\Phi)} [\phi \cosh(\phi) - \sinh(\phi)] = \frac{3P_S C_{S,w}}{\Phi^2 \sinh(\Phi)} [\phi \cosh(\phi) - \sinh(\phi)] = \frac{3P_S C_{S,w}}{\Phi^2} [\phi \text{ctgh}(\phi) - 1] \quad (12)$$

Wyznaczenie parametrów modelu

Parametrami modelu są:

- stała równania kinetycznego $k_{1,imm}$, która wraz ze stężeniem enzymu tworzy wartość k' ,
- stała inaktywacji k_{inak} , która pomniejsza wartość stałej k' , współczynnik dyfuzji substratu w alginianowym żelu kapsułki D_s , współczynnik podziału substratu P_s
- rozmiar kapsułki R . Parametrami sterowanymi jest k' (poprzez zmianę stężenia enzymu) oraz R .

Sposób uzyskania preparatu, metodę wyznaczania stałych kinetycznych i uzyskane wartości stałych w temperaturze 24°C, przy pH 6,4 zostały przedstawione w poprzedniej pracy autorów [Węgrzynowska i Trusek-Hołownia, 2012]. Stała $k_{1,imm}$ wyniosła 2656,4 dm³·g⁻¹·h⁻¹, zaś k_{inak} 0,0139 h⁻¹.

Współczynnik dyfuzji H₂O₂ w temperaturze 24°C wyznaczono w warstwie alginianowej o różnej grubości (3÷6 mm). Badania prowadzono w komórce dyfuzyjnej, gdzie po jednej stronie warstwy cyrkulował roztwór H₂O₂ z zakresu stężeń 0,69÷2,74 g·dm⁻³, po drugiej zaś woda destylowana. Proces prowadzono przez godzinę monitorując spektrofotometrycznie (230 nm) zmianę stężeń H₂O₂ w obu fazach. Przy znajomości powierzchni warstwy żelowej (1,54 cm²), jej grubości i sile napędowej wyznaczono współczynnik dyfuzji. Jego średnia wartość wynosi 2,09·10⁻⁹ m²·s (błąd względny wynosił 14,3%).

Współczynnik podziału zdefiniowano jako relację stężenia równowagowego w sieci hydrożelu do stężenia równowagowego w roztworze.

Stężenie wewnątrz kapsułki uzyskano z bilansu masy, wyrażając jej objętość z parametrów geometrycznych.

Badania prowadzono w szerokim zakresie stężeń H₂O₂ od 0,4 do 1,8 g·dm⁻³, stosując różny stosunek objętości kapsułek w stosunku do objętości układu w zakresie od 1,3 do 5,1. Dla całego obszaru zmienności parametrów współczynnik równowagi przyjmuje stałą wartość 0,881 (błąd względny 3,7%).

Weryfikacja modelu

Weryfikacji przedstawionego powyżej modelu dokonano w przepływowym reaktorze mieszalnikowym z kapsułkami (preparatem enzymatycznym) zatrzymanymi w objętości reaktora. Zgodnie z bilansem tego reaktora:

$$\begin{aligned} QC_{S,we} &= QC_{S,wy} + N \int_0^R A(r) r_{imm}(C_S(r)) dr \cong \\ &= QC_{S,wy} + V_{alg} r_{imm}(C_{S,m}) \end{aligned} \quad (13)$$

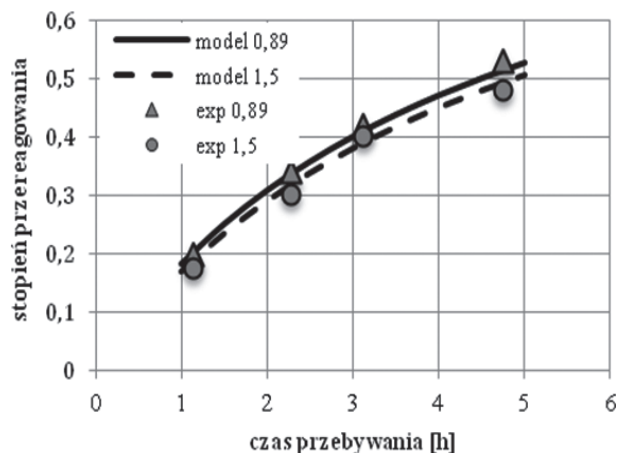
Wprowadzając równanie (14) na czas przebywania:

$$\tau = \frac{V_{rez}}{Q} \quad (14)$$

uzyskuje się wartość modelową stężenia substratu opuszczającego reaktor:

$$C_{S,wy} = \frac{C'_{S,we}}{1 + \frac{V_{alg}}{V_{rez}} \tau k' \frac{3P_s}{\phi^2} [\phi \text{ctgh}(\phi) - 1]} \quad (15)$$

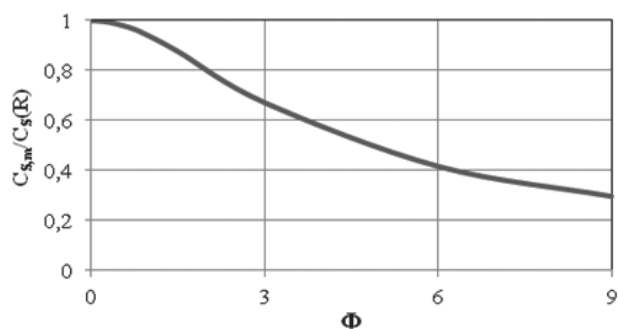
Eksperymenty weryfikacyjne przeprowadzono dla kapsułek o średnicy 3,1; 3,95 i 5,2 mm. Stężenie enzymu wewnątrz kapsułek wynosiło 1 mg·dm⁻³. Stąd moduł *Thiele*'go był w zakresie 0,89 do 1,5. Stosunek objętości kapsułek do całej objętości układu wynosił 1:10. Dozowano substrat o stężeniu 0,7 i 1,2 g·dm⁻³. Czas przebywania w poszczególnych eksperymentach wynosił od 1,14 do 4,75 h. Badania prowadzono do momentu osiągnięcia stanu ustalonego. Przykładowy wykres weryfikacyjny dla $\Phi = 0,89$ i 1,5, przy dozowaniu substratu o stężeniu 0,7 g·dm⁻³ przedstawiono na rys. 1. Zgodność stopnia przereagowania wyliczonego z modelu ze stopniem uzyskanym na bazie 24 eksperymentów jest wysoka (błąd wynosi 7,8%).



Rys. 1. Weryfikacja modelu dla $\Phi = 0,89$ i $\Phi = 1,5$, $C_{S,0} = 0,7$ g·dm⁻³

Dobór parametrów dla preparatu katalazy pracującego w warunkach ciągłych

Jak wynika z analizy modelu duże wartości modułu *Thiele*'go wpływają niekorzystnie na wydajność procesu. Ulega ona zmniejszeniu na skutek zaostrenia profilu stężenia substratu w kapsułce i stąd spadku średniego stężenia substratu. Przy $\Phi = 2$ stosunek stężenia średniego w kapsułce do powierzchniowego wynosi 0,8. Tę wartość modułu *Thiele*'go przyjęto jako graniczną dla prowadzenia wydajnego procesu.



Rys. 2. Relacja stężeń w kapsułce: średnie do powierzchniowego jako funkcja modułu *Thiele*'go

Rozpatrzone aplikację uzyskanego preparatu katalazy. Dysponując stałymi (pH 6,4, 24°C) wyliczono, że dla niskich stężeń enzymu tj. 1 mg·dm⁻³, $\Phi < 2$ uzyskuje się dla kapsułek o średnicy do 7 mm. W przypadku zastosowania wyższego stężenia enzymu 2 mg·dm⁻³, średnica kapsułek nie powinna przekroczyć wartości 4,8 mm. W przypadku katalazy zastosowanie wyższego stężenia enzymu (i tym samym spowodowanie wzrostu szybkości reakcji) powoduje mechaniczne niszczenie kapsułek na skutek nagromadzenia się w nich produktu reakcji – tlenu cząsteczkowego.

Zachodząca w czasie inaktywacja enzymu wpływa na obniżenie modułu *Thiele*'go, co z kolei przekłada się na uzyskanie korzystniejszego rozkładu stężenia substratu w kapsułce. Stąd też zmniejszająca się w czasie aktywność biokatalizatora będzie w mniejszym stopniu, aniżeli w przypadku innego typu preparatów enzymatycznych, wpływać na stopień przereagowania. Jest to bardzo korzystna właściwość enzymów enkapsulowanych.

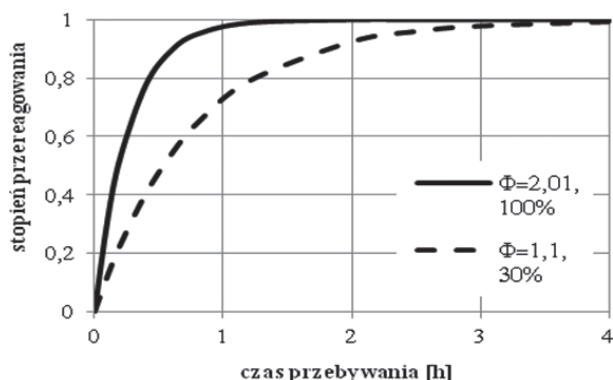
Przyjęto następujące założenia procesowe:

- stężenie substratu w strumieniu zasilającym 2,5 g·dm⁻³
- stężenie substratu w strumieniu wychodzącym < 25 mg·dm⁻³ (przereagowanie > 99%)
- stężenie enzymu w kapsułkach 2 mg·dm⁻³
- średnica kapsułek 4,8 mm
- czas pracy układu 86,5 h (co odpowiada spadkowi aktywności enzymu do 70%)

- moduł *Thiele'go* 2,01 (dla $t = 0$) – 1,1 (dla $t = 86,5$ h)
- czas przebywania do 4 h

Na rys. 3 przedstawiono modelowy stopień przereagowania (wyliczony na podstawie równania (16)) w zależności od czasu przebywania w zakresie zmieniającej się wartości modułu *Thiele'go*.

$$\alpha = 1 - e^{-k\tau \frac{3R}{\phi^2 \sinh(\phi)} [\phi \cosh(\phi) - \sinh(\phi)]} \quad (16)$$



Rys. 3. Stopień przereagowania przy zadanych założeniach procesowych

Obszar pracy bioreaktora o założonych parametrach przebiega pomiędzy liniami przedstawionymi na rys. 3. W pierwszym okresie pracy moduł *Thiele'go* wynosi 2,01 (enzym pracuje przy 100% swojej aktywności). Zbliżając się do granicznego okresu wykorzystywania preparatu (86,5 h) moduł *Thiele'go* na skutek zmniejszającej się aktywności enzymu dąży do wartości 1,1. Na początku pracy układu założony stopień przereagowania ($\alpha > 0,99$) uzyskiwany jest przy czasie przebywania 1,25 h; w okresie końcowym przy tym czasie przebywania uzyskuje się przereagowanie na poziomie 0,8. W celu uzyskania przereagowania na poziomie 0,99, czas przebywania musi zostać wydłużony do 3,6 h. Złóże musi pracować więc przy zmiennym zasilaniu.

Wnioski

W pracy przedstawiono możliwości aplikacyjne preparatu z enkapsulowanym enzymem. Proces rozpatrzono na przykładzie katalazy, enzymu wykorzystywanego w przemyśle chemicznym i spożywczym do usuwania nadtlenu wodoru.

Opracowany model i wnioski wynikające z jego analizy są uniwersalne; dotyczą dowolnego enzymu enkapsulowanego w strukturze o kulistej geometrii.

Kluczowym parametrem jest wartość modułu *Thiele'go*, którą ustala się poprzez dobór stężenia enzymu wewnątrz preparatu oraz rozmiar kapsułki. Obszar kinetyczny gwarantujący najpełniejsze wykorzystanie katalizatora występuje poniżej wartości $\Phi < 0,3$. Tak niskie wartości modułu *Thiele'go* wymuszają jednak aplikację bardzo niskich stężeń enzymu, co skutkuje niskimi szybkościami reakcji. Stąd za granicę efektywnego wykorzystania biokatalizatora przyjęto $\Phi < 2$, gdzie średnie stężenie w kapsułce odpowiada 80% wartości stężenia powierzchniowego.

Oznaczenia

- a_E – aktywność enzymu
- A – powierzchnia struktury alginianowej, [m²]
- $C_{E,imm}$ – stężenie enzymu immobilizowanego, [g·m⁻³]
- C_S – stężenie substratu, [g·m⁻³]
- $C_{S,m}$ – średnie stężenie substratu w kapsułce
- $C_{S,w}$ – stężenie substratu na zewnątrz, [g·m⁻³]
- $C_{S,wy}$ – stężenie substratu w strumieniu wejściowym do reaktora, [g·m⁻³]

- $C_{S,wy}$ – stężenie substratu w strumieniu wyjściowym z reaktora, [g·m⁻³]
- D_S – współczynnik dyfuzji substratu, [m²·s⁻¹]
- k_{inak} – stała inaktywacji enzymu, [s]
- $k_{l,imm}$ – stała równania kinetycznego, [m³·g⁻¹·s⁻¹]
- k' – stała kinetyczna I-rzędu, [s⁻¹]
- n_S – strumień masy substratu, [g·s⁻¹]
- P_S – współczynnik podziału substratu
- Q – strumień, [m³·s⁻¹]
- r – lokalny promień kapsułki, [m]
- r_{imm} – szybkość reakcji z udziałem enzymu immobilizowanego, [g·m⁻³·s⁻¹]
- R – promień kapsułki, [m]
- t – czas, [s]
- V_{alg} – objętość struktury alginianowej, [m³]
- V_{rez} – objętości fazy rezerwuarowej (substratu), [m³]
- α – stopień przereagowania
- β_w – współczynnik wnikania w fazie wodnej, [m·s⁻¹]
- Φ – moduł *Thiele'go*
- τ – czas przebywania, [s]

LITERATURA

- Bałdyga J., Henczka M., Podgórska W., 2012. *Obliczenia w inżynierii bioreaktorów*. Wyd. Pol. Warszawskiej, Warszawa
- Blandino A., Macias M., Cantero D., 2001. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochem.*, **36**, 601-606. DOI: 10.1016/S0032-9592(00)00240-5
- Burghardt A., Bartelmus G., 2001. *Inżynieria reaktorów chemicznych. Tom 1*, PWN, Warszawa
- Costa S.A., Tzanov T., Paar A., Gudelj M., Gubitza G. M., Cavaco-Paulo A., 2001. Immobilization of catalases from *Bacillus SF* on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, 815-819. DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00335-0
- Hedstrom G., Backlund S., Eriksson F., Karlsson S., 1998. Lipase-catalysed stereoselective esterifications using gelatin-based hydrogels. *Coll. Surfaces B: Biointerf.*, **10**, 379-384. DOI: 10.1016/S0927-7765(98)00015-0
- Hori Y., Winans A. M., Irvine D. J., 2009. Modular injectable matrices based on alginate solution/microsphere mixtures that gel in situ and co-deliver immunomodulatory factors. *Acta Biomater.*, **5**, 969-982. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.11.019
- Kmieciak J., Wójcik M., 2009. Immobilizacja lipazy metodą zol-żel. *Inż. Ap. Chem.*, **48**, nr 3, 61-62
- Matto M., Husain Q., 2009. Calcium alginate-starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon peroxidase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **57**, 164-170. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.08.011
- Papajova E., Bujdos M., Chorvat D., Stach M., Lacik I., 2012. Method for preparation of planar alginate hydrogels by external gelling using an aerosol of gelling solution. *Carbohydr. Polym.*, **90**, 472-482. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.05.067
- Taqieddin E., Amiji M., 2004. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, **25**, 1937-1945. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.034
- Tarhan L., 1995. Use of immobilised catalase to remove H₂O₂ used in the sterilisation of milk. *Process Biochem.*, **30**, 623-628. DOI: 10.1016/0032-9592(94)00066-2
- Van't Riet K., Tramper J., 1991. *Basic Bioreactor Design*. M. Dekker Inc., NY
- Wang H., Huang J., Wang C., Li D., Ding L., Han Y., 2011. Immobilization of glucose oxidase using CoFe₂O₄/SiO₂ nanoparticles as carrier. *App. Surface Sci.*, **257**, 5739-5745. DOI: 10.1016/j.apsusc.2011.01.088
- Węgrzynowska L., Trusek-Hołownia A., 2012. Charakterystyka immobilizowanej katalazy stosowanej w zimnej pasteryzacji mleka. *Inż. Ap. Chem.*, **51**, nr 4, 189-191
- Yang J.-S., Xie Y.-J., He W., 2011. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydr. Polym.*, **84**, 33-39. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.11.048

Praca została wykonana w ramach działalności statutowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej S30119/Z0311.