

AGNIESZKA RADUCKA  
JOANNA KARCZ

Instituto Inżynierii Chemicznej i Procesów Ochrony Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Szczecin

# Analiza struktury porowatego nośnika stosowanego do immobilizacji inwertazy

## Wprowadzenie

Inwertaza ( $\beta$ -D-fruktofuranozydaza, EC 3.2.1.26) jest enzymem katalizującym reakcje hydrolizy sacharozy. W celu udoskonalenia procesu wykorzystuje się unieruchomione enzymy, których głównymi zaletami są: łatwość usunięcia ze środowiska reakcji oraz wyższa stabilność operacyjna. Inwertazę często unieruchamia się za pomocą kowalencyjnego wiązania na porowatym nośniku. Uzyskanie wydajnego biokatalizatora będzie zależało zarówno od ilości wolnych grup funkcyjnych enzymu i nośnika, czyli właściwości chemicznych, ale także od natury fizycznej. Poznanie struktury nośnika umożliwi zaprojektowanie pożądanego preparatu z wysoką zawartością enzymu oraz z wysokim stopniem aktywności. Nośnik stanowiąc rusztowanie powinien charakteryzować się odpowiednim kształtem i rozmiarem cząstek, ponadto rozmiarem i krętością porów, a także sposobem oraz gęstością rozmieszczenia porów. Właściwości takie mają znaczenie zarówno na etapie wiązania enzymu z powierzchnią, wpływając na ilość wiązanego enzymu, jak i podczas przenoszenia masy substratu do miejsca aktywnego enzymu w trakcie reakcji [1].

Celem tej pracy było oszacowanie na podstawie danych literaturowych parametrów opisujących strukturę nośnika (modyfikowanego chemicznie silikażelu i tlenku glinu).

## Przenoszenie masy w porowatym nośniku

Unieruchomienie enzymu oznacza ułożenie go w pewnej ograniczonej przestrzeni, przy czym jednocześnie jest zachowana jego aktywność katalityczna. Ograniczenia szybkości reakcji w przypadku unieruchomionego enzymu mogą być powodowane dyfuzją zewnętrzną substratu przy powierzchni materiału nośnika, do którego przymocowany jest enzym. Tworzy się wówczas warstwa, w której ruch masy ma charakter dyfuzyjny, a nie konwekcyjny. Ponadto mogą wystąpić zjawiska prowadzące do rozkładu stężeń substratów i produktów. Jest to związane z występowaniem oddziaływań międzycząsteczkowych i sił jonowych w sąsiedztwie powierzchni porów i kanałów nierozpuszczalnego nośnika. Trzecim zjawiskiem mającym wpływ na transport masy jest dyfuzja wewnętrzna (dyfuzja w porach), powodowana zakłóconym transportem w pobliżu kanałów i porów nośnika spowalniająca transport bądź nawet uniemożliwiająca dostęp dla substratu [2, 3].

## Analiza struktury nośnika

W celu ilościowego opisu procesu dyfuzji w ciele porowatym, uwzględniającego geometrię tego ciała, wprowadza się pojęcie efektywnego współczynnika dyfuzji [2]

$$D_{eff} = D_0 \frac{\varepsilon_p}{\tau} \left( 1 - \frac{r_{substratu}}{r_{poru}} \right)^4 \quad (1)$$

gdzie:

$D_0$  – współczynnik dyfuzji substratu w czystym roztworze,

$\varepsilon_p$  – porowatość cząstki,

$\tau$  – współczynnik krętości,

$r_{substratu}$  – promień substratu,

$r_{poru}$  – promień poru.

Efektywny współczynnik dyfuzji  $D_{eff}$  zależy od stosunku porowatości do współczynnika krętości ( $\varepsilon_p/\tau$ ). Stosunek promieni substratu  $r_{substratu}$  i poru  $r_{poru}$  w równaniu (1) wyraża ograniczenia geometryczne występujące w wąskich porach. W tym ujęciu ciało porowate traktowane jest jako układ krętych kanałów w ciele stałym. Wolną przestrzeń dla dyfuzji stanowią pory, a każdy z kanałów jest średnio  $\tau$ -krotnie dłuższy w stosunku do długości ciała porowatego w kierunku dyfuzji. Wprowadzenie współczynnika krętości ma na celu uwzględnienie tego, że dyfuzja wewnątrz ziarna porowatego odbywa się wzdłuż porów, których osie nie muszą pokrywać się z ogólnym kierunkiem gradientu stężenia. Wartość współczynnika krętości zależy od rodzaju materiału, uwzględnia nieregularność kształtu, zakrzywienia oraz zmiany przekroju porów występujących w cząstce i waha się w granicach  $1 < \tau < 10$  [4].

Od wartości efektywnego współczynnika dyfuzji  $D_{eff}$  zależy wielkość modułu *Thielego*  $\phi$ , zdefiniowanego w następujący sposób [2]

$$\phi = R \sqrt{\frac{V_{max}}{D_{eff} K_m}} \quad (2)$$

gdzie:

$R$  – promień cząstki nośnika,

$V_{max}$  – maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej dla immobilizowanego enzymu,

$K_m$  – stała *Michaelisa–Menten* dla unieruchomionego enzymu.

W przypadku reakcji z immobilizowanymi enzymami operuje się pojęciem współczynnika efektywności  $\eta$  ziarna nośnika, który definiuje się jako stosunek szybkości reakcji enzymatycznej uzyskanych odpowiednio dla formy immobilizowanej i formy natywnej katalizującego enzymu [2]. Współczynnik efektywności pełni rolę pewnego mnożnika funkcyjnego i jest miarą sprawności kontaktu (obniżenia szybkości reakcji wskutek wystąpienia dyfuzji wewnętrznej) [4]. Współczynnik efektywności  $\eta$  dla kulistych cząstek nośnika opisuje następująca zależność [4]

$$\eta = \frac{3}{\phi} \left( \frac{1}{\tanh\phi} - \frac{1}{\phi} \right) \quad (3)$$

Analizę struktury nośnika, na którym była unieruchamiana inwertaza, przeprowadzono dla dwóch przypadków, wybranych na podstawie danych literaturowych. Jednym z nośników był modyfikowany chemicznie silikażel [5], a drugim – tlenek glinu [6]. W 1 gramie zmodyfikowanego chemicznie silikażelu wiąże się 723 mg enzymu, a aktywność właściwa wynosi 246 U/mg matrycy [5]. Drugim analizowanym nośnikiem był modyfikowany chemicznie tlenek glinu [6], którego porowatość ziarna wynosiła 0,658. Średnica cząstek ziarna nośnika zmieniała się w granicach od 200 do 508  $\mu\text{m}$ , a w 1 gramie tlenku glinu unieruchomiło się 25 mg enzymu. Rozmiar poru oszacowano na podstawie danych literaturowych [1, 7]. Alberto i wsp. [7] podają, że  $\beta$ -fruktofuranazydaza ma kształt elipsoidy o wymiarach 9,42 $\times$ 11,32 $\times$ 12,93 nm. Z kolei Cao [1] podaje, że średnica poru, w którym inwertaza była ulokowana wynosiła 90 nm.

W obliczeniach własnych, mających na celu ilościową analizę struktury nośnika, przyjęto, iż cząstki obu nośników mają kulisty kształt, a promień poru jest równy 45 nm. Obliczenia przeprowadzono dla podanych w literaturze przedmiotu [5, 6] wartości parametrów zebranych w tabelicy 1. Na podstawie tych danych obliczano z równania (3) wartość modułu Thielego dla znanej wartości współczynnika efektywności  $\eta$ . Następnie z równania (2) obliczano efektywny współczynnik dyfuzji  $D_{eff}$ . Dysponując tą wielkością, określano z równania (1) średnią dla danego nośnika wartość współczynnika krętości  $\tau$ . Wyniki obliczeń dla obu nośników zostały zebrane w tabl. 2.

Tabela 1

Wartości parametrów użyte do obliczeń dla obu nośników

Nośnik	$\eta$	$V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/\text{s} \cdot \text{ml}$ ]	$K_m$ [ $\mu\text{mol}/\text{l}$ ]	$D_0$ [ $\text{m}^2/\text{s}$ ] $\cdot 10^{-10}$	$R$ [ $\mu\text{m}$ ]	$r_{substratu}$ [nm]	$r_{poru}$ [nm]	$\varepsilon_p$
Silikażel [5]	0,73	10	54	8,16 [8]	100	0,55 [8]	45	0,63
Tlenek glinu [6]	0,32	1,783	31,75	4,452	254	0,55 [8]	45	0,658

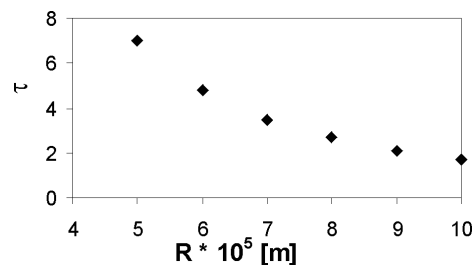
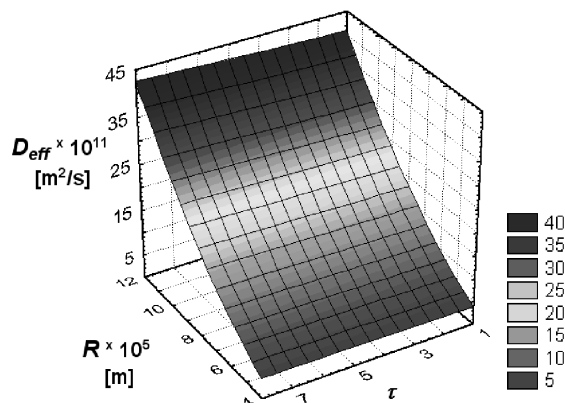
Tabela 2

Zestawienie wyników otrzymanych na podstawie równań (1) – (3)

Nośnik	$\phi$	$D_{eff}$ [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]	$\tau$
Silikażel	2,55	$2,848 \cdot 10^{-10}$	1,72
Tlenek glinu	8,14	$5,468 \cdot 10^{-11}$	5

Z przeprowadzonych obliczeń wynika, iż współczynnik krętości  $\tau$  wynosi 1,72 dla cząstek silikażelu o promieniu 100  $\mu\text{m}$  i porowatości 0,63. Natomiast dla tlenku glinu współczynnik  $\tau$  ma wartość równą 5 przy założeniu, że cząstki nośnika mają promień 254  $\mu\text{m}$  i porowatość 0,658. Geankoplis i wsp. [6] podają, że wyznaczony przez nich współczynnik krętości korundu wynosił 2,75, czyli wykorzystane w obliczeniach równania mogą posłużyć jedynie do oszacowania wartości tego parametru.

Ponadto przeprowadzono obliczenia wpływu promienia  $R$  kulistych cząstek nośnika (silikażelu) na wielkość współczynnika krętości  $\tau$  i efektywnego współczynnika dyfuzji  $D_{eff}$ . Wykonano je, zakładając stałe wartości porowatości  $\varepsilon_p = 0,63$  i współczynnika efektywności  $\eta = 0,73$ . Wyniki zostały zamieszczone na rys. 1 oraz 2. Analizując zależności na tych ry-

Rys. 1. Zależność współczynnika krętości  $\tau$  porów w funkcji promienia cząstek nośnika silikażelu dla stałej porowatości  $\varepsilon_p = 0,63$  i współczynnika efektywności  $\eta = 0,73$ Rys. 2. Zależność efektywnego współczynnika dyfuzji  $D_{eff}$  od promienia  $R$  cząstki nośnika silikażelu oraz współczynnika krętości  $\tau$  porów dla porowatości  $\varepsilon_p = 0,63$  i współczynnika efektywności  $\eta = 0,73$ 

sunkach, można stwierdzić, że uzyskaniu zadanej szybkości procesu sprzyjają mniejsze cząstki nośnika o większej krętości porów. Jednocześnie wartość efektywnego współczynnika dyfuzji wzrasta wraz ze wzrostem promienia cząstki nośnika, wpływ współczynnika krętości jest znacznie mniejszy.

## Podsumowanie

Szybkość procesu z unieruchomionymi enzymami inwertazy na porowatych nośnikach zależy od struktury ciała porowatego. Przeprowadzone rozważania wykazały, że istotną rolę odgrywają takie parametry, jak współczynnik krętości, porowatość cząstki, a także wielkość cząstki nośnika, gdyż ich wpływ ujmują dwa parametry kinetyczne: efektywny współczynnik dyfuzji oraz moduł Thielego. W analizowanych przypadkach mniejsze znaczenie ma promień poru oraz promień cząsteczki sacharozy, gdyż człon ujmujący ich wpływ wynosi ok. 0,952 (wartość wyrażenia  $[1 - (r_{substratu}/r_{poru})^4]$ ).

## LITERATURA

1. L. Cao: Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Application and Design, Weinheim, Wiley-VCH, 2005.
2. W. Tischer, V. Kasche: TIBTECH, 17, 326 (1999).
3. A.S. Bommarius, B.R. Riebel: Biocatalysis, Weinheim, Wiley-VCH, 2004.
4. J. Szarawara, J. Skrzypek, A. Gawdzik: Podstawy inżynierii reaktorów chemicznych, Warszawa, WNT, 1991.
5. A.E. David, N.S. Wang, V.C. Yang, A.J. Yang: J. Biotechnol., 125, 395 (2006).
6. C.J. Geankoplis, E. R. Haering, M. C. Hu: Ind. Eng. Chem. Res. 26, 1810 (1987).
7. F. Alberto, C. Bignon, G. Sulzenbacher, B. Henrissat, M. Czjzek: J. Biol. Chem. 279, 18903 (2004).
8. Z. Bubnik, P. Kadlec, D. Urban, M. Bruhns: Sugar Technologists Manual, Chemical and Physical Data for Sugar Manufacturers and Users, Berlin, Bartens Pub.Co., 1995.