

# Immobilizacja katalazy z *Aspergillus niger* w żelu alginianu wapnia

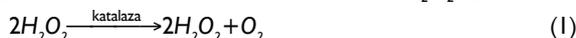
Justyna MIŁEK, Sylwia KWIATKOWSKA-MARKS, Marek WÓJCIK - Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, 65, 4, 305-308

## Wstęp

Obserwuje się szybko wzrastające zużycie  $H_2O_2$  w różnych gałęziach przemysłu [1, 2]. Największe jego ilości stosuje się w przemyśle celulozowo-papierniczym, do delignifikacji i bielenia mas celulozowych. W przemyśle włókienniczym  $H_2O_2$  służy do bielenia włókien naturalnych i sztucznych. Stosowany jest także jako środek bakteriobójczy w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

W większości przypadków niezbędne jest usunięcie pozostałości  $H_2O_2$ . Tradycyjnie stosowane metody chemiczne często powodują powstawanie niepożądanych produktów ubocznych; dlatego alternatywą może być użycie katalazy (E.C. 1.11.1.6) – enzymu należącego do grupy oksydoreduktaz i katalizuje rozkład  $H_2O_2$  zgodnie z reakcją:



Przemysłowe zastosowanie katalazy ogranicza się do formy natywnej [3, 4]. Podejmowano jednak liczne próby immobilizacji tego enzymu [2÷7], by umożliwić jego wielokrotne użycie w procesach rozkładu  $H_2O_2$ , ale zastosowane metody immobilizacji były zbyt skomplikowane i drogie.

Przedmiotem niniejszego opracowania jest immobilizacja katalazy z *Aspergillus niger* przez pułapkowanie w żelu alginianu wapnia. Metoda ta jest wyjątkowo prosta i tania, a alginian można odzyskiwać ze zdezaktywowanego biokatalizatora i ponownie używać do immobilizacji [8].

## Materiały i metodyka badań

Do badań wykorzystano katalazę *Aspergillus niger* C3515 oraz alginian sodu o niskiej lepkości A2158 z Sigma-Aldrich.

## Immobilizacja katalazy

Przygotowano po 25 ml roztworów alginianu sodu o zawartości 2% mas. i 4% mas. Do każdego z roztworów dodano 30  $\mu$ l katalazy. Całość mieszano przez 5 min. Tak przygotowane mieszaniny wkraplano kolejno do zlewki z  $CaCl_2$  o stężeniu 0,1 mol/dm<sup>3</sup>, której zawartość mieszano mieszadłem magnetycznym. Przy wkraplaniu lepkich roztworów alginianu sodu wykorzystywano umieszczoną w pompie infuzyjnej strzykawkę z igłą o średnicy 1,2 mm. W wyniku wymiany jonów sodowych na wapniowe zachodziło natychmiastowe żelowanie kropeł alginianowych. Otrzymane granulki biokatalizatora oddzielono od roztworu  $CaCl_2$  na sicie i przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C.

## Oznaczenie aktywności biokatalizatora

Aktywność biokatalizatora oznaczano podczas rozkładu  $H_2O_2$  o stężeniu początkowym 0,015 mol/dm<sup>3</sup>. Do 10 ml roztworu  $H_2O_2$ , który intensywnie mieszano wprowadzono 0,2 g granulek biokatalizatora i po 30 min. oznaczono stężenie  $H_2O_2$  metodą manganometryczną. Aktywność wyrażano w  $\mu$ mol rozłożonego  $H_2O_2$  na 1 g biokatalizatora w okresie 1 minuty.

## Wpływ pH, temperatury i czasu przechowywania na aktywność biokatalizatora

Pomiary aktywności biokatalizatora, przy zmiennym pH (od 5 do 8), prowadzono w temperaturze 30°C. Niezależnie wykonano oznaczenie

aktywności w temperaturach 20°C, 30°C i 40°C przy pH=7. Spadek aktywności biokatalizatora podczas przechowywania w temperaturze 4°C wykonano po 1, 7 i 14 dobach.

## Zmiana aktywności biokatalizatora podczas wielokrotnego użycia

Pomiary wykonano podobnie jak przy oznaczaniu aktywności. Proces rozkładu  $H_2O_2$  prowadzono w temperaturze 20°C przez okres 10 min i przy pH 7. Dla każdej porcji biokatalizatora (2% i 4% żelu alginianu wapnia) wykonano dziesięć pomiarów, przekładając kolejno granulki do nowej porcji  $H_2O_2$  o stężeniu 0,015 mol/dm<sup>3</sup>.

## Omówienie wyników

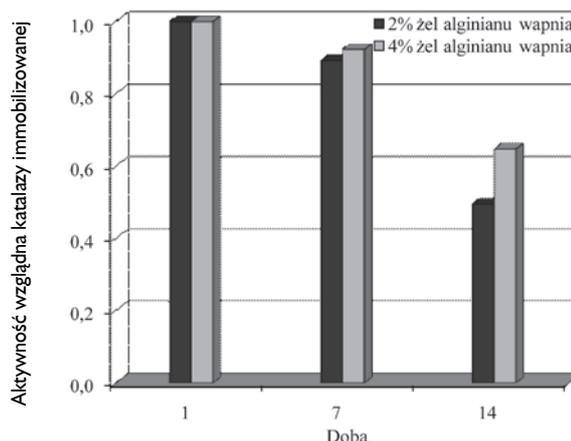
Przeprowadzone pomiary wykazały, że maksymalną aktywność katalazy z *Aspergillus niger* w postaci immobilizowanej w 2% i 4% żelu alginianu wapnia uzyskuje się przy pH 7. Obydwa rodzaje immobilizowanego biokatalizatora nie wykazywały większych spadków aktywności niż o 6% przy zmianie pH o 1 względem odczynu obojętnego. Jest to zgodne z wynikami innych autorów [5, 9].

W tabelicy I przedstawiono wyniki badań wpływu temperatury na aktywność immobilizowanej katalazy. Przedstawiono je w postaci znormalizowanej, jako iloraz ilości rozłożonego  $H_2O_2$  w danej temperaturze do maksymalnej ilości rozłożonego  $H_2O_2$ .

Tabela I

Wpływ temperatury na aktywność immobilizowanej katalazy

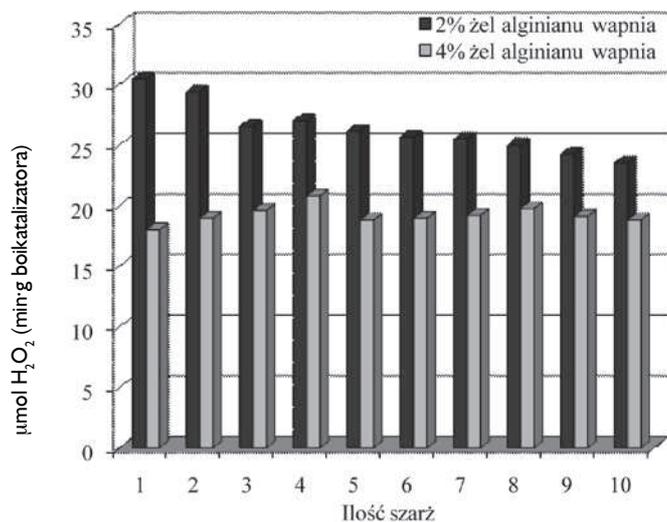
Temperatura, °C	Aktywność biokatalizatora [-]	
	Alginian wapnia 2%	Alginian wapnia 4%
20	0,77	0,77
30	1,00	0,93
40	0,87	1,00



Rys. 1. Zmiana aktywności względnej katalazy immobilizowanej przechowywanej w temperaturze 4°C

Z danych zamieszczonych w tablicy I wynika, że katalaza immobilizowana w żelu 4% uzyskuje maksymalną aktywność w temperaturze wyższej niż w żelu 2%. Wzrost temperatury maksymalnej świadczy o zwiększeniu się stabilności enzymu. Potwierdzają to także pomiary zmian aktywności podczas przechowywania biokatalizatora (rys. 1).

Również i w tym przypadku bardziej stabilny był biokatalizator o zawartości 4% alginianu wapnia. Jednak ze względu na stopniowy spadek aktywności, biokatalizator z upływem czasu nie powinien być przechowywany dłużej niż 7 dób.



Rys. 2. Zmiana aktywności katalazy immobilizowanej podczas wielokrotnego użycia

Na rysunku 2 przedstawiono zmiany aktywności immobilizowanej katalazy podczas kolejnych dziesięciu operacji rozkładu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Maksymalna szybkość rozkładu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez biokatalizator z 2% zawartością alginianu wapnia wynosiła 30,5 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g·min; natomiast 20,8 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g·min dla biokatalizatora z 4% żelu. Można zaobserwować, że początkowa aktywność katalazy w 2% żelu alginianu wapnia jest wyższa niż w 4% żelu. Świadczy to o mniejszych oporach dyfuzyjnych dla substratu, które występują w żelu o mniejszej zawartości alginianu. Luźniejszą strukturę żelu o zawartości 2% alginianu wapnia potwierdza także stopniowy spadek aktywności biokatalizatora w kolejnych operacjach, związany z uwalnianiem się katalazy z porów żelu. Biokatalizator o zawartości 4% alginianu wapnia wykazywał praktycznie stałą aktywność. Zatem katalaza z *Aspergillus niger*, mająca masę cząsteczkową 385 kDa [10], która jest znacznie większa niż w większości stosowanych enzymów, może być skutecznie pułapkowana w żelach o odpowiedniej zawartości alginianu.

Bezpośrednie porównanie stabilności otrzymanego biokatalizatora z innymi preparatami jest utrudnione, ponieważ badacze prowadzili zazwyczaj rozkład H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w odmiennych warunkach, różniących się temperaturą i stężeniem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. W większości publikowanych prac, uzyskiwano znacznie gorsze rezultaty, ponieważ obserwowano wyraźny spadek aktywności immobilizowanego biokatalizatora po 100 min. eksploatacji [11, 12].

## Wnioski

Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość skutecznej immobilizacji katalazy z *Aspergillus niger* przez pułapkowanie w 4% żelu alginianu wapnia. Otrzymany biokatalizator wykazywał maksymalną aktywność w temperaturze 40°C i przy pH=7. Stwierdzono przydatność immobilizowanego biokatalizatora do wielokrotnego użycia przy rozkładzie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w reaktorze okresowym.

## Literatura

1. www.solvay-investors.com/.../100930\_InvestorMorning\_Hydrogen-Peroxide.pdf, 14.12.2010.
2. Costa S., Tzanko T., Paar A., Gudelj M., Gübitz G. M., Cavaco-Paula A.: Immobilization of catalases from *Bacillus SF* on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme Microb. Technol.* 2001, **28**, 815-819.
3. Eberhardt A. M., Pedroni V., Volpe M., M. L. Ferreira: Immobilization of catalase *Aspergillus niger* on inorganic and biopolymeric supports for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition, *Appl. Catal. B: Environ.* 2004, **47**, 153-163.
4. Horst F., Rueda E. H., Ferreira M. L.: Activity of magnetite-immobilized catalase in hydrogen peroxide decomposition. *Enzyme Microb. Technol.* 2006, **38**, 1005-1012.
5. Tukul S.S., Alptekin O.: Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Proc. Biochem.* 2004, **39**, 2149-2155.
6. Kumar G. S. V., Kumar K. S.: Immobilization of catalase on a novel polymer support, crosslinked polystyrene ethylene glycol acrylate resin: Role of the macromolecular matrix on enzyme activity. *J. Appl. Polym. Sci.* 2005, **97**, 8-19.
7. Görenek G., Akyilmaz E., Dinçkaya E.: Immobilization of catalase by entrapping in alginate beads and catalase biosensor preparation for the determination of hydrogen peroxide decomposition. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotech.* 2004, **32**, 453-461.
8. Patent nr 158020, Polska.
9. Akertek E., Tarhan L.: Characterization of immobilized catalases and their application in pasteurization of milk with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Appl. Biochem. Biotech.* 1995, **50**, 291-303.
10. Kikuchi-Torii K., Hayashi S., Nakamoto H., Nakamura S.: Properties of *Aspergillus niger* catalase. *J. Biochem.* 1982, **92**, 1449-1456.
11. Çetinus S. A., Şahin E., Saraydin D.: Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization. *Food Chemistry* 2009, **114**, 962-969.
12. Tukul S.S., Alptekin O.: Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Proc. Biochem.* 2004, **39**, 2149-2155.

Mgr inż. Justyna MIŁEK ukończyła studia na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy (1999). Od 2005 r. pracuje jako asystent w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Bioprocessowej Uniwersytetu Technologiczno - Przyrodniczego w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe – modelowanie dezaktywacji enzymów.

Dr inż. Sylwia KWIATKOWSKA-MARKS ukończyła studia na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy (1996). Tytuł doktora nauk technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna uzyskała w 2004 r. na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Szczecińskiej. Pracuje w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Bioprocessowej Uniwersytetu Technologiczno - Przyrodniczego w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe – biosorpcja metali ciężkich.

Dr hab. inż. Marek WÓJCIK ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Szczecińskiej (1968). Stopień doktora uzyskał w 1978 r. na Politechnice Warszawskiej, a w 1990 r. stopień doktora habilitowanego. Kierownik Katedry Inżynierii Chemicznej i Bioprocessowej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe – inżynieria bioprocessowa, modelowanie procesów biotransformacji, otrzymywanie immobilizowanych biokatalizatorów.