

Marek WÓJCIK, Ireneusz GRUBECKI

e-mail: mwojcik@utp.edu.pl

Katedra Inżynierii Chemicznej i Bioprosesowej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz

Ocena efektywności pułapkowania katalazy *Terminox Ultra* w żelu alginianu wapnia

Wstęp

Żel alginianu wapnia jest jednym z najczęściej stosowanych nośników do immobilizacji materiału biologicznego. Wynika to stąd, że immobilizacja całych komórek i enzymów w granulach utworzonych z żelu alginianowego jest bardzo prostym procesem, który może być przeprowadzony w łagodnych warunkach. Zazwyczaj materiał poddawany immobilizacji jest mieszany z roztworem alginianu sodu i wkraplany do roztworu zawierającego jony wapniowe. W wyniku wymiany jonów sodowych na wapniowe zachodzi natychmiastowe żelowanie, prowadzące do pułapkowania materiału biologicznego w porach matrycy alginianowej, z której utworzone są kuliste granulki. Ze względu na znaczne rozmiary porów żele alginianowe nadają się przede wszystkim do immobilizacji komórek mikroorganizmów. W przypadku immobilizacji enzymów istnieje możliwość stopniowego ich uwalniania się z matrycy alginianowej.

W ostatnich latach, pomimo występujących ograniczeń, podejmowano szereg prób immobilizacji enzymów w żelu alginianu wapnia. Stosowano lipazę z *Candida rugosa* [Knezevic i in., 2002; Betigeri i Neau, 2002; Won i in., 2005; Jeganathan i in., 2006], która ma masę cząsteczkową 57 kDa. W niektórych przypadkach uzyskiwano nawet wysokie sprawności pułapkowania, ale podczas eksploatacji immobilizowanego biokatalizatora obserwowano wyraźny spadek jego aktywności, który tłumaczono uwalnianiem się enzymu z matrycy alginianowej. Badania te potwierdziły wcześniejsze obserwacje, które wskazywały na dyfuzję albuminy wołowej o masie cząsteczkowej 69 kDa w żelach alginianowych [Martinsen i in., 1989; Martinsen i in., 1992; Amsden i Turner, 1999]. We wszystkich przypadkach stwierdzono zmniejszanie się szybkości dyfuzji ze wzrostem stężenia alginianu. Obserwowano także wpływ rodzaju stosowanego alginianu na wartości efektywnego współczynnika dyfuzji albuminy wołowej. Publikowane badania na temat immobilizacji różnego rodzaju enzymów [Yi i in., 2005; Catana i in., 2005; Mittal i in., 2005; Arya i Srivastava 2006] w żelu alginianu wapnia dawały zazwyczaj niezadowalające rezultaty. We wszystkich przytoczonych przypadkach masa cząsteczkowa enzymów nie przekraczała jednak 200 kDa.

Niniejsza praca dotyczy immobilizacji katalazy z *Aspergillus niger*, której masa cząsteczkowa jest znacznie większa niż wcześniej immobilizowanych enzymów. Dokonano w niej analizy wpływu stężenia alginianu sodu i chlorku wapnia oraz ilości katalazy na efektywność jej pułapkowania.

Część doświadczalna

Źródłem katalazy był gotowy produkt *Terminox Ultra* wytwarzany przez *Novozymes*. Alginian sodu o niskiej lepkości pochodził z firmy *Sigma-Aldrich*. Pozostałe odczynniki zakupiono w *POCH*.

Do badań przygotowano roztwór *Terminoxu Ultra* rozcieńczony wodą destylowaną w stosunku 1:4. Roztwory alginianu sodu o stężeniach 2, 3 i 4% mas. i roztwory chlorku wapnia o stężeniach 0,5%, 1% i 2% mas. przygotowano przez rozpuszczenie w wodzie destylowanej.

Roztwory alginianu sodu z dodatkiem 1 ml lub 0,5 ml rozcieńczonej katalazy były wkraplane za pomocą strzykawki umieszczonej w pompie infuzyjnej. W strzykawce zamocowano igłę o średnicy 1,2 mm, której koniec był płasko ścięty. Do każdej z szeregu zlewek zawierających po 10 ml roztworu CaCl_2 o odpowiednim stężeniu wkraplano po jednej

kropki alginianu z katalazą. Roztwory żelujące w zlewkach były mieszane za pomocą mieszadełek magnetycznych. Proces żelowania prowadzono w temperaturze pokojowej. W określonych odstępach czasu od 0,5 h do 72 h granulki były wyjmowane z roztworu chlorku wapnia, przemywane wodą destylowaną i wykorzystywane do oznaczania aktywności pozostałej w nich katalazy. Przed oznaczeniem aktywności enzymu granulki roztworzano w 2 ml roztworu cytrynianu sodu. Dodatkowo jedną kroplę roztworu alginianu sodu z katalazą wkraplano do 2 ml roztworu cytrynianu sodu, aby wykorzystać ją do oznaczenia początkowej aktywności katalazy.

Omówienie wyników doświadczeń

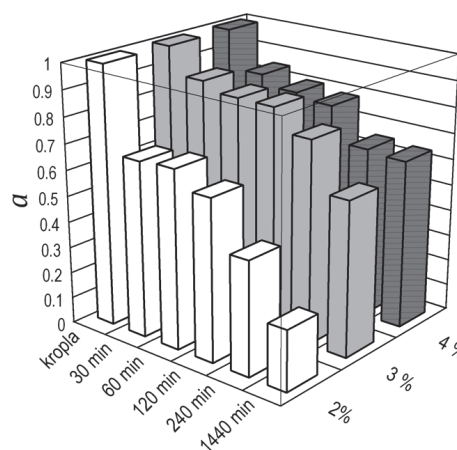
Do oznaczania aktywności katalazy zastosowano metodę wykorzystującą elektrodę tlenową [Milek, 2011]. Znajomość rzeczywistej aktywności katalazy w kropki alginianu a_k i w granulce a_g po odpowiednim czasie żelowania pozwala na obliczenie bezwymiarowej aktywności katalazy z zależności

$$a = \frac{a_g}{a_k} \quad (1)$$

Aktywność katalazy w granulce oznaczano po jej rozpuszczeniu w roztworze cytrynianu sodu, aby wyeliminować opory dyfuzyjne, które występują przy zastosowaniu całych granulki. Warto zwrócić uwagę na to, że wyznaczona w ten sposób bezwymiarowa aktywność biokatalizatora jest równoważna sprawności pułapkowania, którą zazwyczaj wyraża się w procentach.

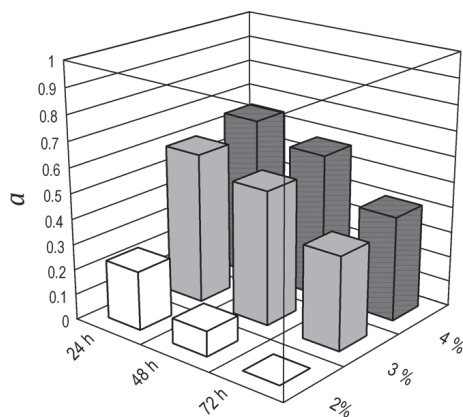
Wpływ stężenia alginianu sodowego

Wpływ stężenia alginianu sodu oraz czasu żelowania na aktywność katalazy w granulce biokatalizatora przedstawia rys. 1.



Rys. 1. Wpływ stężenia alginianu na aktywność biokatalizatora podczas żelowania przez 24 godziny

Dla wszystkich stosowanych stężeń alginianu obserwuje się stopniowe zmniejszanie się aktywności katalazy w granulach z upływem czasu. Świadczy to o tym, że enzym stopniowo uwalniał się poprzez pory żelu do roztworu chlorku wapnia. Najszybszy spadek aktywności występował podczas pierwszych 30 min żelowania, kiedy przy przejściu zolu w żel zmniejsza się objętość granulki. Między 30 i 120 min zmiany były już jednak stosunkowo niewielkie. Ponadto z rys. 2 wyni-



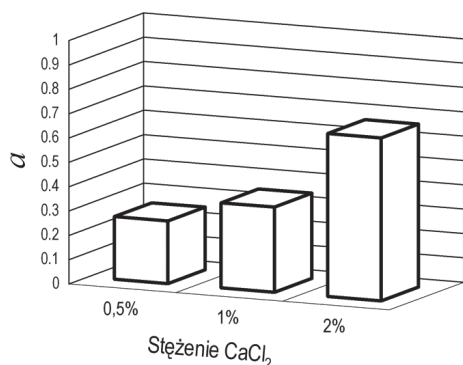
Rys. 2. Wpływ stężenia alginianu i czasu przetrzymywania granulek biokatalizatora w roztworze chlorku wapnia na aktywność katalazy

ka, że wzrost stężenia alginianu sodu z 3% do 4% nie wpływa znacząco na sprawność pułapkowania enzymu. Z kolei niższe stężenie alginianu (2%) znacznie obniża sprawność pułapkowania obniżając tym samym aktywność uzyskanego biokatalizatora. W ten sposób po 24 godzinach aktywność biokatalizatora wyprodukowanego z 4% alginianu zmalała o około 35%. Natomiast dla alginianu o stężeniu 2% spadek ten wynosił 77%.

Wydłużenie przetrzymywania granulek alginianowych w roztworze chlorku wapnia (Rys. 2) prowadzi do dalszego, stopniowego uwalniania się katalazy z granulek. Biokatalizator otrzymany z 2% alginianu nie wykazywał po 72 h aktywności katalazy. Natomiast w biokatalizatorach otrzymanych z alginianu 3% i 4% stwierdzono aktywności katalazy stanowiące odpowiednio 36% i 41% aktywności początkowej.

Wpływ stężenia chlorku wapnia

Przeanalizowano wpływ stężenia chlorku wapnia w zakresie stężeń od 0,5% o 2% na efektywność pułapkowania, a tym samym na aktywność biokatalizatora.

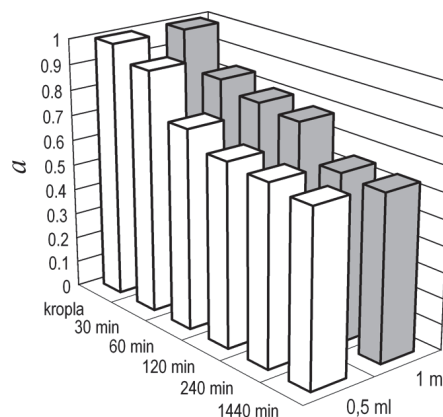


Rys. 3. Wpływ stężenia chlorku wapnia na aktywność katalazy w 4% granulach alginianowych po 24 h żelowania

Przez cały 24-godzinny okres żelowania zauważono kształtującą się prawidłowość – ze wzrostem stężenia chlorku wapnia uzyskiwano wzrost efektywności pułapkowania katalazy niezależnie od użytego stężenia alginianu. Reprezentatywne są przedstawione na rys. 3 wyniki pomiarów aktywności katalazy po 24 h żelowania dla alginianu o stężeniu 4%.

Wpływ ilości dodawanego enzymu

Biokatalizator otrzymany przez immobilizację bardzo aktywnej katalazy *Terminox Ultra* (1 ml roztworu) charakteryzował się znacznymi oporami dyfuzyjnymi przy zastosowaniu go do rozkładu nadtlenu wodoru. W takiej sytuacji często zmniejsza się ilość stosowanego enzymu. Z tego względu sprawdzono wpływ ilości dodawanego enzymu. Na rys. 4 porównano sprawności pułapkowania katalazy dla 1 ml oraz 0,5 ml enzymu użytych podczas immobilizacji. Z rysunku wynika, że



Rys. 4. Wpływ ilości katalazy na efektywność pułapkowania w 4% alginianie

zmniejszenie ilości dodawanego enzymu nie wpłynęło w istotny sposób na efektywność pułapkowania.

Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że na sprawność pułapkowania katalazy w żelu alginianu wapnia ma wpływ stężenie użytego alginianu oraz stężenie chlorku wapnia w roztworze żelującym.

Natomiast ilość użytego roztworu katalazy podczas immobilizacji nie wpływała na sprawność pułapkowania.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń i wykonanych pomiarów można zalecać przy immobilizacji katalazy stosowanie alginianów o stężeniu co najmniej 3% mas. i roztworów żelujących o zawartości chlorku wapnia 2% mas.

LITERATURA

- Amsden B., Turner N., 1999. Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.*, 65, 605-610. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19991205)65:5<605::AID-BIT14>3.0.CO;2-C
- Arya S. K., Srivastava S. K., 2006. Kinetics of immobilized cyclodextrin glucanotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 507-510. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.12.019
- Betigeri S.S., Neau S.H., 2002. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials* 23, 3627-3636. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00095-9
- Catana R., Ferreira B.S., Cabral J.M.S., Fernandes P., (2005). Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis. *Food Chem.*, 91, 517-520. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.04.041
- Jeganathan J., Bassi A., Nakhla G., 2006. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation *J. Hazard. Mater.*, B137, 121-128. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2005.11.106
- Knezevic Z., Bobic S., Milutinovic A., Obradovic B., Mojovic L., Bugarski B., 2002. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. *Process Biochem.*, 38, 313-318. DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00085-7
- Martinsen A., Skjåk-Braek G., Smidsrød O., 1989. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 79-89. DOI: 10.1002/bit.260330111
- Martinsen A., Storø I., Skjåk-Braek G., 1992. Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 186-194. DOI: 10.1002/bit.260390210
- Mittal A., Khurana S., Singh H., Kamboj R.C., 2005. Characterization of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) immobilized in Ca alginate beads. *Enzyme Microb. Technol.*, 37, 318-323. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.10.005
- Won K., Kim S., Kim K.J., Park H.W., Moon S.J., 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem.*, 40, 2149-2154. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.08.014
- Yi Y., Kermasha S., Neufeld R., 2005. Matrix physicochemical properties affect activity of entrapped chlorophyllase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 1395-1402. DOI: 10.1002/jctb.1341
- Milek J., 2011. Badanie i modelowanie dezaktywacji katalazy. Praca doktorska, ZUT, Szczecin.