

**Katarzyna CZYŻEWSKA, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA**

e-mail: katarzyna.czyzewska@pwr.edu.pl

Zakład Inżynierii Bioprosesowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wroclaw

**Zastosowanie katalazy w rozkładzie nadtlenu wodoru****Wstęp**

Katalaza (EC 1.11.1.6), enzym odpowiadający za enzymatyczny rozkład nadtlenu wodoru, cieszy się dużym zainteresowaniem w przemysłowych procesach biokatalizy. Wykazując aktywność oksydazy oraz peroksydazy, katalaza uczestniczy odpowiednio w rozkładzie nadtlenu wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego oraz w reakcjach typu redoks [Sooch i in., 2016]. Zaakceptowanie nadtlenu wodoru jako czynnika antyoksydacyjnego i konserwującego, jego powszechne stosowanie w procesach wybielania oraz restrykcyjne przepisy prawne regulujące ilość przedostającego się do otwartych strumieni nadtlenu wodoru, upowszechniają stosowanie katalazy w przemysłowych aplikacjach. Enzymatyczny rozkład nadtlenu wodoru uznawany jest za przyjazną środowisku alternatywę, w stosunku do tradycyjnych metod, poprawiającą ekonomię katalizowanych procesów, w wyniku zmniejszenia zużycia wody, energii elektrycznej, chemikaliów oraz generowanych ścieków [Hasan i in., 2015; Loncar i Fraaije, 2015].

Katalaza używana w procesach jednostkowych przemysłu tekstylnego umożliwia skuteczne usunięcie nadtlenu wodoru z kąpieli wybielającej, zapewniając wysoką wydajność barwienia [Hasani in., 2015]. Ponadto wykazano, że pozostałości katalazy nie wpływają na jakość włókien oraz efektywność barwienia. Tekstylnym i drzewnym procesom wybielania towarzyszą specyficzne warunki procesowe, związane z szerokim zakresem  $pH$  ( $5 \div 10$ ) i temperatur ( $30 \div 80^\circ C$ ). Większość komercyjnie dostępnych katalaz wykazuje optimum aktywności w  $20 \div 50^\circ C$ , w  $pH$  neutralnym [Loncar i Fraaije 2015; Choudhury, 2014].

Warunki procesowe towarzyszące przemysłowym procesom wybielania, angażujących enzymatyczne usuwanie nadtlenu wodoru, wymuszają poszukiwania nowych organizmów wykazujących wysoką stabilność w niesprzyjających warunkach operacyjnych. Uwaga badaczy skupia się na enzymach charakteryzujących się wysoką aktywnością w niskich temperaturach, które z powodzeniem wykorzystywane są w komercyjnych preparatach enzymatycznych. Rekombinowana katalaza wyizolowana z psychrotolerancyjnych mikroorganizmów, należących do rodzaju *Serratia*, ekspresjonowana w komórkach *E. coli* charakteryzuje się wysoką stabilnością oraz niezmiennymi właściwościami katalitycznymi w specyficznych warunkach procesowych. Dzięki termostabilności w szerokim zakresie temperatur ( $20 \div 70^\circ C$ ) może stanowić interesujące narzędzie w tekstylnych i kosmetycznych procesach biokatalizy [Sarmiento i in., 2015].

Immobilizacja enzymów na podłożu stałym jest powszechnie stosowaną praktyką w przemysłowych procesach biokatalizy, umożliwiającą ograniczenie kosztów procesu, dzięki ponownemu wykorzystaniu biokatalizatora w kolejnych szarżach na drodze łatwej separacji z mieszaniny reakcyjnej, zwiększeniu jego stabilności w warunkach procesowych oraz ograniczeniu wpływ inhibitorów.

Popularną metodą immobilizacji katalazy stosowaną w tekstylnych aplikacjach jest enkapsulacja oraz adsorpcyjne lub kowalencyjne wiązanie do powierzchni nośników m.in. membran [Eberhardt i in., 2004; Tukul i Alptekin, 2004; Loncar i Fraaije, 2015]. Zastosowanie bioreaktorów membranowych pozwala połączyć korzyści płynące z enzymatycznej biokatalizy oraz separacji membranowych [Rios i in., 2004]. Immobilizacja katalazy zarówno na powierzchni nośników stałych oraz w wyniku enkapsulacji jest utrudniona z uwagi na burzliwy przebieg reakcji, mogący skutkować oderwaniem się enzymu z powierzchni nośnika lub rozerwaniem hydrożelowych kapsułek [Loncar i Fraaije, 2015].

Membrany wytworzone z regenerowanej celulozy, z uwagi na powszechność występowania celulozy, będącej naturalnym polimerem budującym ścianę komórkową roślin, oceniane są jako atrakcyjne ekonomicznie oraz przyjazne środowisku nośniki, sprzyjające procesom immobilizacji [Pelton, 2009]. Literatura donosi o licznych pozytywnych rezultatach immobilizacji katalazy na nośnikach celulozowych, m.in. membranach wykonanych z octanu celulozy [Murtinho i in., 1998]. Dodatkowo zadawalające efekty uzyskiwano w przypadku elektrostatycznej nanowłóknistej membrany z modyfikowaną białkowo powierzchnią [Wang i in., 2009].

W prezentowanej pracy przedstawiono efekty immobilizacji rekombinowanej katalazy, wyizolowanej z psychrotolerancyjnych mikroorganizmów na powierzchni membrany z regenerowanej celulozy, które mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w jednostkowych operacjach przemysłu tekstylnego.

**Badania doświadczalne**

**Materiały.** Preparat enzymatyczny rekombinowanej katalazy otrzymano od firmy *Swissaustral*, USA. Diwinylosulfon zakupiono w firmie *Sigma-Aldrich*, USA, pozostałe odczynniki pochodziły z *POCH*, Polska.

**Aktywność i stabilność enzymu** natywnego testowano w szerokim zakresie  $pH$  ( $7 \div 11$ ) i stężeń substratu ( $10 \div 80$  g/l). Pracowano w systemie cyklicznym, przyjmując długość jednego cyklu jako 7 min. Po tym czasie sprawdzano, czy dodany substrat uległ rozkładowi. Stężenie  $H_2O_2$  oznaczano przy długości 230 nm, mierząc w sposób bezpośredni absorbcję badanego roztworu, wykorzystując równanie krzywej standardowej na pomiar nadtlenu wodoru:  $Abs(230) = 1,97 * C_{H_2O_2}$  [g/l]. Jeżeli wynik był pozytywny (tzn. stężenie spadło do wartości poniżej 0,25 g/l) dodawano kolejną porcję substratu w ilości pozwalającej na uzyskanie zadanego stężenia. Jeżeli nie – cykl przedłużano o kolejne 7, 14, 21 min, aż do uzyskania pełnego rozkładu substratu.

**Immobilizacja katalazy** była prowadzona z wykorzystaniem membrany z regenerowanej celulozy o średnicy porów 0,45  $\mu m$  (Whatman). Procedurę aktywacji membrany oraz immobilizacji prowadzono w przepływowych celkach z mieszałem (*Millipore*), o objętości 10 ml. Membranę aktywowano poprzez 2 h inkubację w 10% roztworze diwinylosulfonu w 1 M  $Na_2CO_3$ ,  $4^\circ C$ , 230 rpm. Po tym czasie membranę intensywnie przemywano wodą oraz roztworem 0,5 M  $NaHCO_3/Na_2CO_3$ , przy  $pH$  9. W procedurze immobilizacji enzymu stosowano 75-krotnie rozcieńczony roztwór katalazy w 0,5 M  $NaHCO_3/Na_2CO_3$ , przy  $pH$  9. Roztwór enzymu inkubowano nad powierzchnią membrany przez 24 h,  $4^\circ C$ , 230 rpm. Po zakończonej immobilizacji membranę przemywano 0,05 M buforem TRIS-HCl, przy  $pH$  10.

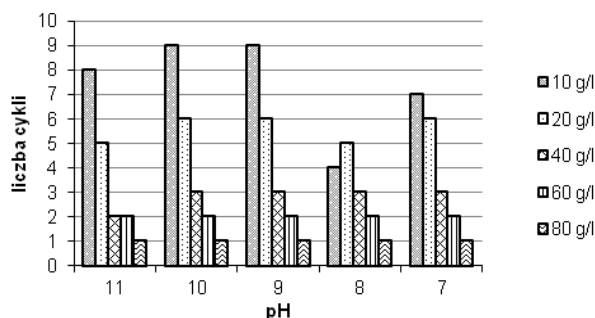
**Rozkład  $H_2O_2$**  z udziałem katalazy immobilizowanej na membranie płaskiej prowadzono w systemie okresowym w celkach membranowych (*Millipore*) przy  $25^\circ C$ , w 0,05 M buforze TRIS-HCl, przy  $pH$  10 i szerokim zakresie stężeń substratu:  $2,5 \div 85$  g/l. Wartość  $pH$  odpowiadała górnemu zakresowi jaki występuje w ściekach tekstylnych. Reakcję monitorowano spektrofotometrycznie pobierając co pewien czas próby z roztworu znajdującego się nad membraną.

**Stabilność substratowa** immobilizowanej katalazy była określona na drodze inkubacji uzyskanego preparatu w roztworze substratu 20 i 40 g/l, w 0,05 M buforze TRIS-HCl, przy  $pH$  10 i w temperaturze  $25^\circ C$ . Czas inkubacji wynosił 6, 12, 24 i 36 min. Po zadanym czasie inkubacji preparat przepłukiwano 0,05 M buforem TRIS-HCl, przy  $pH$  10. Następnie prowadzono reakcję rozkładu  $H_2O_2$ , zachodzącą

w celkach membranowych, w obecności substratu o stężeniu 2,5 g/l, w buforze 0,05M TRIS-HCl, przy pH 10 i w temperaturze 25°C, zgodnie z procedurą opisaną powyżej.

### Wyniki i dyskusja

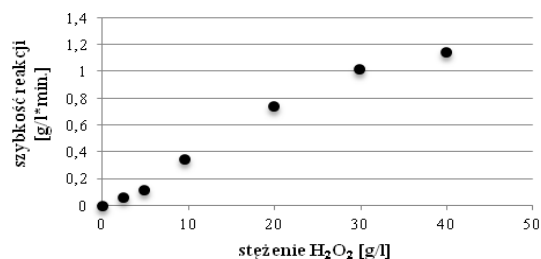
Natywna forma rekombinowanej katalazy wykazywała dobrą stabilność w szerokim zakresie pH oraz temperatur [Sarmiento i in. 2015], przy czym w obecności wysokich stężeń substratu stabilność enzymu drastycznie malała (Rys. 1). Przy stężeniu substratu 80 g/l, przy każdym z badanych pH, enzym został wykorzystany tylko w jednym cyklu (7 min.).



Rys. 1. Stabilność katalazy w formie natywnej w obecności różnych stężeń H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10÷80 g/l), w środowisku zasadowym. Jeden cykl odpowiadał momentowi obniżenia stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poniżej 0,25 g/l, po którym dodawano nową porcję substratu.

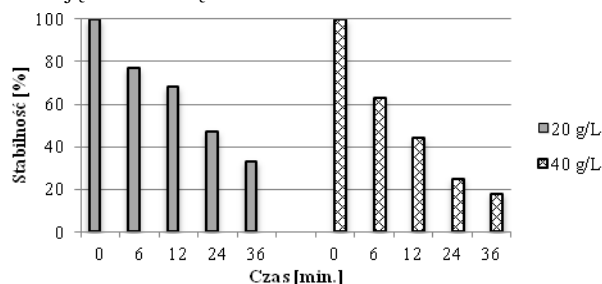
Oczekiwany efektami immobilizacji było zwiększenie stabilności badanej katalazy w silnie alkalicznym środowisku oraz możliwość jej ponownego wykorzystania w kolejnych szarżach. Uzyskane wyniki wskazują na uzyskanie zamierzonego celu.

Po immobilizacji enzym efektywnie rozkładał H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w stężeniu do 40 g/L. W tym obszarze wykazano klasyczną dla modelu *Michaelis-Menten* zależność pomiędzy stężeniem substratu a szybkością reakcji (Rys. 2). Stałe równania kinetycznego wyznaczone zgodnie z procedurą opisaną wcześniej [Trusek-Holownia i Noworyta, 2016] wyniosły  $K_M = 120$  g/l oraz  $k_3 = 1,948$  1/min.



Rys. 2. Zależność pomiędzy stężeniem nadtlenu wodoru a szybkością reakcji katalizowanej przez immobilizowaną na membranie katalazę, pH 10, 25°C. Stężenie powierzchniowe enzymu wynosiło 1,59 mg/cm<sup>2</sup>

Z technologicznego punktu widzenia nie jest uzasadnione prowadzenie procesów biokatalizy w zakresie inhibicji substratowej, stąd zakres stężeń powyżej 40 g/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nie był poddawany szczegółowej analizie w kierunku wyznaczenia stałych równania kinetycznego z inhibicją substratową.



Rys. 3. Stabilność katalazy w formie immobilizowanej na membranie celulozowej w obecności substratu 20 i 40 g/L (pH 10, t = 25°C).

Stabilność preparatu (immobilizowanej katalazy) w testowanym zakresie stężeń substratu wyrażono poprzez czas połowicznego zaniku aktywności [Toscano i in., 1994]. Został on wyznaczony w oparciu o dane zamieszczone na rys. 3. Czas ten wyniósł 22,4 min przy 20 g/l nadtlenu wodoru i 13,3 min przy 40 g/l.

### Wnioski

Celem zaprezentowanej pracy była ocena potencjalnych możliwości aplikacyjnych w przemyśle tekstylnym immobilizowanej na membranie katalazy, wyizolowanej z psychrotolerancyjnych mikroorganizmów z rodzaju *Serratia*. Uzyskane wyniki odnoszące się do aktywności i stabilności immobilizowanego preparatu w alkalicznym środowisku potwierdzają jego użyteczność w zabiegach usuwania nadtlenu wodoru z kąpiele wybielających.

Dla testowanego enzymu zakres stężeń H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nie powinien przekroczyć wartości 40 g/l, powyżej której odnotowano silną inhibicję substratową. Zapewnienie wysokiej wydajności rozkładu wysokich stężeń H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wymuszałoby wcześniejsze rozcieńczenie (maksymalnie dwukrotnie) ścieków bardziej stężonych, co nie jest kosztowo atrakcyjne. Należy jednak podkreślić, że tolerancja substratowa badanego enzymu jest znacznie wyższa aniżeli innych komercyjnie dostępnych katalaz.

### LITERATURA

- Choudhury A.K.R. (2014). *Sustainable textile wet processing: applications of enzymes, in roadmap to sustainable textiles and clothing* [in:] Muthu S.S. (Ed.). Eco-friendly raw materials, technologies and processing methods, Springer. DOI: 10.1007/978-981-287-065-0
- Eberhardt A.M., i in. (2004). Immobilization of catalase from *Aspergillus niger* on inorganic and biopolymeric supports for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition. *Appl. Catal. B-Environ* 47, 153-163. DOI: 10.1016/j.apcatb.2003.08.007
- Hasan M.M., i in., (2015). Benefits of enzymatic process in textile wet processing. *Int. J. Fiber Text. Res.*, 5, 16-19
- Loncar N., Fraaije M.W., (2015). Catalases as biocatalysts in technical applications: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 3351-3357. DOI: 10.1007/s00253-015-6512-6
- Milek J., Wójcik M., Verschelde W., (2014). Thermal stability for the effective use of commercial catalase. *Pol. J. Chem. Tech.*, 16(4), 75-79. DOI: 10.2478/pjct-2014-0073
- Murtinho D., Lagoa A.R., Garcia F.A.P., Gil M.H., (1998). Cellulose derivatives membranes as supports for immobilisation of enzymes. *Cellulose*, 5(4), 299-308. DOI: 10.1023/A:1009255126274
- Pelton R. (2009). Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *Trends Anal. Chem.*, 28(8), 925-942. DOI: 10.1016/j.trac.2009.05.005
- Rios G.M., Belleville M.P., Paolucci D., Sanchez J., (2004). Progress in enzymatic membrane reactor – a review. *J. Membrane Sci.*, 242, 189-196. DOI: 10.1016/j.memsci.2003.06.004
- Sarmiento F., Peralta., Blamey J.M., (2015). Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Front Bioeng Biotechnol*, 3, 1-15. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00148
- Sooch B.S., Kauldhar B.S., Puri M., (2016). *Catalases. Types, structure, applications and future outlook* [in:] Ray R.C. (Ed.). Microbial enzyme technology in food applications, (eds.). CRC Press, Boca Raton. (ISBN: 9781498749831)
- Toscano G., Pirozzi D., Maremonti M., Gianfreda L., Greco G., Jr. (1994). Kinetics of enzyme deactivation: a case study. *Catalysis Today* 22(3), 489-510. DOI: 10.1016/0920-5861(94)80119-3
- Trusek-Holownia A., Noworyta A. (2016). The template parameters selection of the efficient utilisation of enzymatic membrane. *Chem. Eng. J.*, 305 54-60. DOI: 10.1016/j.cej.2016.04.043
- Tukel S.S., Alptekin O., (2004). Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Proc Biochem*, 39, 2149-2155. DOI: 10.1016/j.procbio.2003.11.010.
- Wang Z-G., Wan L-S., Xu Z-K., (2009). Immobilization of catalase on electrospun nanofibrous membranes modified with bovine serum albumin or collagen: Coupling site-dependent activity and protein-dependent stability. *Soft Matter*, 5, 4161-4168. DOI: 10.1039/b902637a

Pracę sfinansowano w ramach projektu nr 0401/0251/16 z działalności statutowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej w roku 2016/2017