

Anna TRUSEK - HOŁOWNIA<sup>1</sup>

## ROLA MEMBRANY W JEDNOFAZOWYM I DWUFAZOWYM BIOREAKTORZE MEMBRANOWYM

**Streszczenie.** W pracy przedstawiono koncepcję jedno - i dwufazowego bioreaktora membranowego z membraną o charakterze pasywnym i aktywnym. Zwrócono uwagę na szczególne zalety bioreaktora z membraną katalityczną łączącego w sobie zalety immobilizowanych biokatalizatorów, jak i możliwość separacji reagentów od biokatalizatora. Na przykładzie wybranych enzymów lipolitycznych przedstawiono możliwości preparatyki membrany katalitycznej. Przedstawiono charakterystykę otrzymanych preparatów oraz rozpatrzono możliwość ich aplikacji w środowisku rozpuszczalnika organicznego.

## MEMBRANE ROLE IN MONO- AND BIPHASE MEMBRANE BIOREACTOR

**Summary.** The conceptions of mono- and biphasic membrane bioreactor with passive or active role of membrane were presented. The solution of bioreactor with catalytic membrane is especially interesting by the connection of advantages of immobilized enzymes and reactant separation. The catalytic membranes were prepared for lipolytic enzymes. Their characteristics and properties in organic solvent solution are presented in this paper.

### 1. Wprowadzenie

Koszty procesów biotechnologicznych związane są nie tylko z procesem przemiany enzymatycznej czy biotransformacji mikrobiologicznej, ale również z procesem separacji nie przereagowanych substratów od powstałych produktów oraz reagentów od katalizatora. Wymagana wysoka czystość bioproduktów, szczególnie tych stosowanych w medycynie i far-

---

<sup>1</sup> Politechnika Wrocławska, Instytut Inżynierii Chemicznej, ul. Norwida 4/6, 50-373 Wrocław, e-mail: trusek@iic.pwr.wroc.pl

macji, sprawia, że często proces oczyszczania jest kosztowniejszy aniżeli proces przemiany biochemicznej.

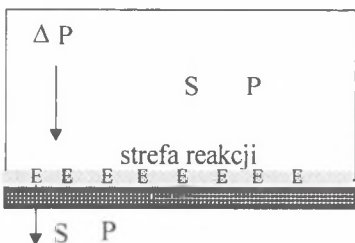
W celu minimalizacji kosztów inwestycyjnych dąży się do takich rozwiązań procesowych, które w jednej jednostce aparaturowej wiążą proces przemiany biochemicznej i separacji. Interesującą propozycję takiego rozwiązania stanowi bioreaktor membranowy [1].

### 1.1. Jednofazowy bioreaktor membranowy

Klasyczny ciśnieniowy proces membranowy towarzyszący przemianie biochemicznej ma zwykle za zadanie rozdzielić reagentów od biokatalizatora. Rzadko możliwa jest separacja substratu od produktu ze względu na niewielkie z reguły różnice w wielkościach tych cząsteczek. Wyjątek stanowią np. reakcje hydrolizy polimerów czy reakcje kondensacji.

Na skutek zastosowanego nadciśnienia, cząsteczki biokatalizatora gromadzą się na powierzchni membrany tworząc warstwę polaryzacyjną i powodując zatykanie się porów membrany [2]. Problemy te mogą zostać rozwiązane poprzez kontrolowaną immobilizację biokatalizatora na membranie przed rozpoczęciem procesu przemiany biochemicznej. Membrana w tym przypadku uzyskuje dodatkowo obok funkcji separacyjnej, charakter katalityczny - rys. 1. Immobilizacja wiąże się często z korzystną zmianą aktywności i stabilności katalizatora oraz umożliwia jego wielokrotne wykorzystanie.

Membranę katalityczną można otrzymać poprzez adsorpcję komórek mikroorganizmu lub cząsteczek enzymu na powierzchni membrany, ich upakowanie w porach membrany lub chemiczne związanie enzymu z membraną [3].



Rys. 1. Schemat jednofazowego bioreaktora membranowego z membraną katalityczną

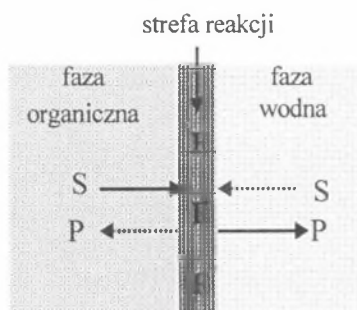
Fig. 1. Scheme of monophasic membrane bioreactor with catalytic membrane

### 1.2. Dwufazowy bioreaktor membranowy

W układzie dwufazowym rolą membrany jest utrzymanie w swych porach granicy międzyfazowej, a moduł membranowy z racji swej funkcji nazywany jest w tym przypadku kon-

taktorem faz. Stanowi on aparat konkurencyjny do klasycznych urządzeń stosowanych w procesach transportu masy [4].

W procesach biochemicznych membranowy kontaktor faz stosowany jest głównie w układach dwufazowych zawierających rozpuszczalnik organiczny, w których faza organiczna pełni funkcję rezerwuaru hydrofobowych reagentów (substratów, produktów), zaś faza wodna z rozpuszczonym w niej enzymem bądź zawieszonymi komórkami mikroorganizmów stanowi fazą reakcyjną. Również w przypadku membranowego kontaktora faz membranie nadać można dodatkowo charakter katalityczny poprzez immobilizację katalizatora na jej powierzchni lub w jej porach - rys. 2. Rozwiązanie takie ma wiele zalet zarówno z punktu widzenia bioreaktora dwufazowego, jak i separatora [4].



Rys. 2. Schemat membranowego kontaktora faz z membraną katalityczną

Fig. 2. Scheme of membrane phase contactor with catalytic membrane

Zastosowanie jedno- lub dwufazowego bioreaktora z membraną katalityczną wymaga odpowiedniego doboru membrany oraz metody immobilizacji katalizatora. Istotne jest, aby immobilizowany katalizator charakteryzował się wysoką aktywnością i stabilnością. Niekiedy immobilizacji towarzyszy również zmiana specyficzności substratowej [5].

Praca przedstawia dobór rodzaju membrany i sposobu immobilizacji lipazy z *Candida antarctica* i lipazy z trzustki wieprzowej dla reakcji hydrolizy maślanu glicydydu w środowisku rozpuszczalnika organicznego.

## 2. Materiały i metody

**Enzym:** lipaza z *Candida a.* z Fluka(USA), lipaza z trzustki wieprzowej z Sigma (USA).

**Substrat:** S-maślan glicydydu (98%) z Aldrich (USA).

**Membrany** płaskie o powierzchni  $4,9 \text{ cm}^2$  z polipropylenu (PP) –  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  i polisulfonu (PS) –  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  z Eurosep (Polska), z poliamidu (PA) –  $0,25 \text{ }\mu\text{m}$  i celulozy (C) –  $0,05 \text{ }\mu\text{m}$  z Millipore (USA), z azotanu celulozy (NC) –  $0,02 \text{ }\mu\text{m}$  z Politechniki Szczecińskiej.

**Aparatura:** Komórka ultrafiltracyjna z Millipore (USA), aparat do miareczkowania z firmy Mettler Toledo (Szwajcaria).

**Pomiar stężenia białka** - Ilość białka w roztworze przed i po immobilizacji określana była za pomocą metody Lowry'ego [6].

**Aktywność enzymatyczna** - Zdolność katalityczna immobilizowanych lipaz określana była na podstawie reakcji hydrolizy S-maślanu glicydydu, której jeden z produktów - kwas masłowy - miareczkowany był zasadą sodową. Reakcję prowadzono przy stężeniu substratu równym  $60 \text{ mM}$  w  $0,05 \text{ M}$  buforze Tris-HCl nasyconym izooktanem o pH 7,8 dla lipazy z *Candida antarctica* i pH 8,7 dla lipazy z trzustki wieprzowej. Do testu używano  $10 \text{ ml}$  roztworu substratu. Test enzymatyczny trwał  $1 \text{ godzinę}$  i był przeprowadzany w temperaturze  $23^\circ\text{C}$ . Za jedną jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje powstanie  $1 \text{ }\mu\text{mola}$  kwasu w warunkach reakcji, w czasie  $1 \text{ h}$ , w objętości  $10 \text{ ml}$ .

**Adsorpcja enzymu na powierzchni membrany** -  $8 \text{ ml}$  roztworu enzymu o stężeniu  $235 \text{ }\mu\text{g/ml}$  w  $0,05 \text{ M}$  buforze Tris-HCl o pH odpowiednim dla danego enzymu filtrowano w komórce ultrafiltracyjnej przy ciśnieniu  $0,06 \text{ MPa}$  przez okres  $1 \text{ godziny}$  w temperaturze  $23^\circ\text{C}$ . Po zakończonym procesie immobilizacji niezwiązane białko usuwano poprzez kilkukrotne przemywanie membrany porcjami po  $10 \text{ ml}$   $0,05 \text{ M}$  buforu Tris-HCl.

**Upakowanie enzymu w porach membrany** - Upakowanie w porach membrany przeprowadzone zostało tak jak adsorpcja enzymu, przy różnicy dotyczącej jedynie orientacji membrany w stosunku do podawanego strumienia roztworu białka.

**Immobilizacja enzymu poprzez wiązanie chemiczne** - Na przemytą membranę w komórce ultrafiltracyjnej podawano  $8 \text{ ml}$  roztworu aktywatora, odpowiednio na membranę poliamidową  $25\%$  roztwór aldehydu glutarowego i  $10\%$  roztwór diwinylosulfonu na membranę celulozową. Membranę poliamidową aktywowano zarówno powierzchniowo, jak i wewnątrz porów; natomiast celulozową, ze względu na hydrofobowy charakter aktywatora, jedynie powierzchniowo. Aktywację prowadzono przez okres  $1 \text{ h}$ , po czym nie związany aktywator wmywano wodą, a następnie  $0,05 \text{ M}$  buforem o pH odpowiednim dla danego enzymu. Dalej postępowano jak w przypadku adsorpcji.

**Stabilność immobilizowanego enzymu** - Stabilność enzymu wyrażono poprzez określenie czasu połowicznego zaniku aktywności. Membrany zawierające immobilizowany enzym inkubowano w temperaturze  $23^\circ\text{C}$ , w buforze nasyconym izooktanem. Co pewien czas określano aktywność katalizatora, przeprowadzając reakcję hydrolizy maślanu glicydydu. Wyznaczono czas utraty  $50\%$  aktywności początkowej.

### 3. Wyniki i ich omówienie

Badania przedstawione w pracy prowadzone były pod kątem preparatyki membrany katalitycznej i dalszej jej aplikacji w środowisku rozpuszczalnika organicznego.

Badania rozpoczęto od przetestowania membran pod kątem ich trwałości w obecności heksanu i izooktanu, rozpuszczalników często stosowanych w przemianach enzymatycznych prowadzonych z udziałem lipaz. Określono przepuszczalność membrany względem wody przed i po inkubacji przez 24 h w roztworze rozpuszczalnika organicznego. Zaobserwowano wpływ rozpuszczalników organicznych na membrany polimerowe, przy czym ich przepuszczalność nie zmienia się więcej niż o 10%, stąd wszystkie z testowanych membran przebadane zostały pod kątem ich aplikacji w preparatyce membran katalitycznych z udziałem enzymów lipolitycznych.

#### 3.1. Efektywność wiązania białka

Badania przeprowadzono z lipazą z trzustki wieprzowej oraz lipazą z *Candida antarctica*. Lipazy te różnią się między sobą budową i sposobem aktywacji [7]. Enzymy immobilizowano poprzez adsorpcję, upakowanie w porach oraz poprzez wiązanie chemiczne na różnego typu membranach.

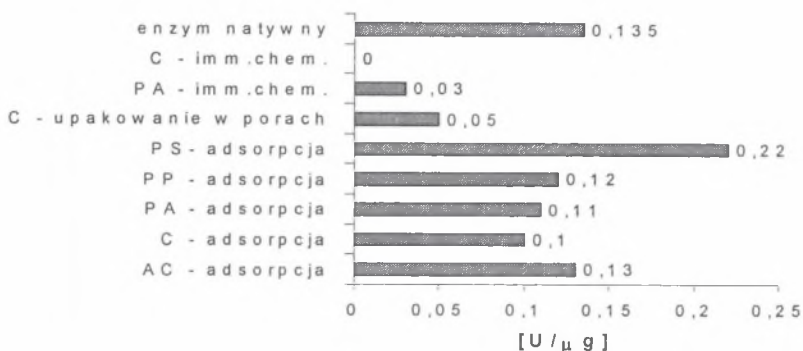
Wydajność immobilizacji w zależności od rodzaju membrany i metody immobilizacji wyniosła 10 - 91% dla lipazy z *Candida antarctica* i 6,5 - 31% dla lipazy z trzustki wieprzowej. W przypadku obu lipaz efektywne okazało się wiązanie białka na membranie poliamidowej poprzez aldehyd glutarowy oraz poprzez adsorpcję na membranie polipropylenowej. Immobilizacja na membranie celulozowej niezależnie od wybranej metody przebiegała z bardzo niską wydajnością.

#### 3.2. Aktywność immobilizowanych katalizatorów

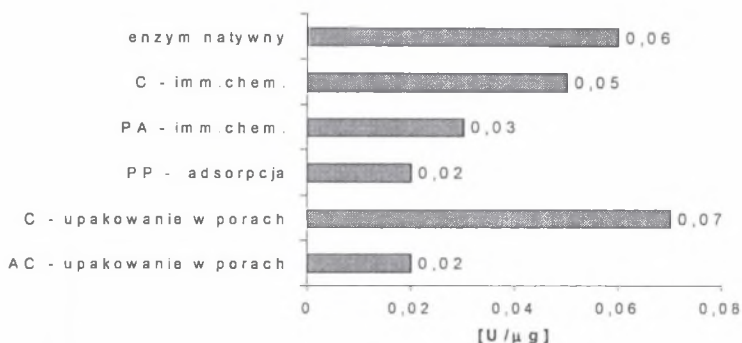
Aktywność immobilizowanych białek określono na podstawie reakcji hydrolizy estru, S-maślanu glicydydu przeprowadzonej w buforze nasyconym izooktanem. Aktywność wyrażono w jednostkach aktywności przypadających na 1 µg immobilizowanego białka. Wyniki przedstawiono na rys. 3 i 4 odpowiednio dla lipazy z *Candida antarctica* i lipazy z trzustki wieprzowej.

Szczególnie wysoką aktywność lipazy z *Candida antarctica* zaobserwowano w przypadku adsorpcji na membranie polisulfonowej. Uzyskana wartość aktywności właściwej wskazuje na wzrost powinowactwa immobilizowanego enzymu w stosunku do badanego substratu. Po immobilizacji lipazy z *Candida antarctica* drogą chemiczną lub poprzez upakowanie w porach membrany enzym traci znaczny procent swojej aktywności, a po immobilizacji enzy-

mu na membranie celulozowej poprzez wiązanie z diwinylosulfonem, enzym całkowicie utracił aktywność katalityczną w stosunku do badanego substratu.



Rys. 3. Aktywność immobilizowanej lipazy z *Candida antarctica*  
Fig. 3. Activity of lipase from *Candida antarctica*



Rys. 4. Aktywność immobilizowanej lipazy z trzustki wieprzowej  
Fig. 4. Activity of lipase from pancreatic porcine

Najwyższą aktywność właściwą preparatu uzyskano w przypadku enzymu upakowanego w porach membrany celulozowej oraz enzymu związanego chemicznie poprzez diwinylosulfon. W przypadku pozostałych preparatów lipazy z trzustki wieprzowej immobilizowanej na membranach aktywność oznaczona jest znacznie poniżej aktywności oczekiwanej, co wskazuje, że podczas procedury immobilizacji tracony jest znaczny procent aktywności katalitycznej białka.

### 3.3. Czas połowicznego zaniku aktywności

Stabilność immobilizowanych enzymów określona została poprzez wyznaczenie czasu połowicznego zaniku aktywności. Obie lipazy w formie natywnej charakteryzują się stosun-



kowo niską stabilnością; okres połowicznego zaniku aktywności lipazy z *Candida antarctica* wynosi 37 h, lipazy z trzustki wieprzowej 13 h.

Niemal we wszystkich przypadkach, preparaty enzymu immobilizowanego charakteryzują się znacznym wydłużeniem czasu wysokiej aktywności enzymu. Przy lipazie z *Candida antarctica* szczególną uwagę zwrócono na immobilizację poprzez adsorpcję na membranie polipropylenowej, poliamidowej i celulozowej, gdzie okres połowicznego zaniku aktywności wynosi blisko 200 h, zaś w przypadku lipazy z trzustki wieprzowej na preparat enzymu upakowanego w porach membrany celulozowej ( $t_{1/2} = 127$  h)

#### 4. Podsumowanie

W pracy przedstawiono możliwości reaktora membranowego w przemianach biochemicznych prowadzonych w układach jedno - i dwufazowych. Membrana, obok funkcji separacyjnej, może pełnić dodatkowo funkcję katalityczną, gdy zawiera ona biokatalizator immobilizowany na powierzchni lub w porach. Szczególną uwagę zwrócono na układ z membraną katalityczną stosowaną w układach zawierających rozpuszczalnik organiczny, w których często prowadzone są przemiany z udziałem enzymów lipolitycznych.

Praca przedstawia charakterystykę preparatów zawierających immobilizowaną na membranach lipazę z *Candida antarctica* oraz lipazę z trzustki wieprzowej. Przebadano kilka różnych membran, które są trwałe w środowisku rozpuszczalnika organicznego. Przetestowano różne sposoby immobilizacji białka: adsorpcję na powierzchni, upakowanie w porach membrany oraz wiązanie chemiczne. Na podstawie ilości immobilizowanego białka, jego aktywności katalitycznej oraz stabilności wybrano najodpowiedniejsze sposoby immobilizacji obu lipaz; adsorpcję na powierzchni membrany polipropylenowej w przypadku lipazy z *Candida antarctica* i upakowanie w porach membrany celulozowej dla lipazy z trzustki wieprzowej. Preparaty te mogą zostać zastosowane zarówno w jedno-, jak i dwufazowych reaktorach membranowych. Dużą zaletą otrzymanych preparatów enzymów immobilizowanych jest ich wysoka stabilność, często znacznie przewyższająca stabilność preparatów enzymów natywnych. Stwarza to możliwości dla bioreaktora membranowego, który w porównaniu z klasycznymi urządzeniami pozwala na równoczesne prowadzenie reakcji z separacją, jak również pozwala na utrzymanie wysokiej aktywności katalitycznej.

## Literatura

1. Noworyta A.: Zintegrowane procesy membranowe. INŻ. CHEM. 2001, t. 22, nr 3a, s. 85-96.
2. Kołtuniewicz A.: Wydajność ciśnieniowych procesów membranowych. Oficyna PWR, Wrocław 1996.
3. Noworyta A.: Membrane reactors, W: Membrane Separations, Ed. Noworyta A., Trusek-Hołownia A., Wyd. Argi, Wrocław 2001, s. 97-119.
4. Trusek-Hołownia A.: Membrane contactors, W: Membrane Separations, Ed. Noworyta A., Trusek-Hołownia A., Wyd. Argi, Wrocław 2001, s. 215-235.
5. Trusek-Hołownia A.: Activity of catalytic membrane, Materiały konferencyjne ICOM, Toulouse, Francja 2002.
6. Lowry O., Rosebrough N.: Biol. Chem. 1951, nr 193, s. 265-270.
7. Jaeger K.-E., Reetz M.: Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, TIBTECH, 1998, T. 16, 396-403.

Pracę wykonano w ramach projektu finansowanego przez KBN, nr projektu:  
PBZ/KBN/14/T09/99/01a

## Abstract

The conceptions of mono- and biphasic membrane bioreactors are presented in the paper. Membrane, besides the function of reagent separation, could have the catalytic role when the biocatalyst is immobilized on the membrane surface or inside the membrane pores. The application of catalytic membrane in membrane contactors are of particular interest.

The paper presents the characteristics of catalytic membranes that contain lipase from *Candida antarctica* and from pancreatic porcine. These lipases differ greatly from each other in their structure and properties. The enzymes were immobilized by adsorption on membrane surface, entrapment in pores and chemical binding with the membrane. Several kinds of membrane materials were tested.

Based on the amount of immobilised protein, its catalytic activity and stability, the most suitable methods of immobilisation of both lipases, adsorption on the polypropylene membrane surface in the case of lipase from *Candida antarctica* and packing in the cellulose membrane pores for the lipase from pancreatic porcine were selected. These preparations could be applied in mono- and biphasic membrane reactors. A great advantage of the enzyme immobilised preparations is their high stability in the buffer saturated with organic solvent, which often exceeds remarkably the stability of native enzyme preparations. That allows, with comparison with classical equipments, to carry out reactions simultaneously with reactants separations with the high enzyme activity for a long time.