



Reaktor membranowy do kontrolowanej enzymatycznej deacetylacji chitozanu

Małgorzata M. Jaworska, Dorota Szelerska, Ewa Konieczna
Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska,
Warszawa

Membrane reactor for control enzymatic deacetylation of chitosan

Summary

The aim of presented paper was to investigate the possibility of applying a membrane reactor for control enzymatic deacetylation of chitosan. The comparison with the process carried out in a batch reactor was also shown. The chitin deacetylase separated from *Absidia orchidis vel coerulea* was used in experiments. Three different circulation rates of the reaction mixture through the membrane module were investigated: 100, 150 and 200 mL/min. It was found that for the circulation rate of 100 mL/min the change of deacetylation degree was similar to that obtained for batch reactor. Increasing the circulation rate the increase in the amount of liberated acetic acid was observed and for circulation of 200 mL/min it was two times higher than that obtained in a batch reactor: 566 and 298,5 μmol that corresponded with the change of deacetylation degree of 11% and 6%, respectively. It seems that a membrane reactor is more suitable for the control enzymatic deacetylation process than a batch reactor.

Key words:

Adres do korespondencji

Małgorzata M. Jaworska,
Wydział Inżynierii
Chemicznej i Procesowej,
Politechnika Warszawska,
ul. Waryńskiego 1,
00-645 Warszawa.

1. Wprowadzenie

Chitozan, kopolimer glukozy (GlcN) i N-acetylglukozaminy (GlcNAc), jest pochodną chityny, której znaczenie rośnie z roku na roku. Ze względu na swoje unikatowe właściwości takie jak: bioaktywność, nietoksyczność czy biodegradowalność, znajduje zastosowanie w medycynie, biotechnologii, ochronie roślin czy ochronie środowiska.

Chitozan produkowany jest na skalę przemysłową na drodze chemicznej deacetylacji chityny. W procesie tym chityna traktowana jest stężonym roztworem NaOH (40-50%) w podwyższonej temperaturze (90-110°C). W efekcie otrzymuje się chitozan o wysokich stopniach acetylacji (procentowa zawartość merów GlcNAc w łańcuchu polimeru, AD = 35-45%). Polimer o niższych stopniach acetylacji można uzyskać przez wielokrotną deacetylację lub zastrzenie warunków prowadzenia procesu. Niestety prowadzi to także do równoczesnej hydrolizy łańcucha polimeru (1). Metoda chemiczna powoduje także generowanie znacznych ilości ścieków o wysokich stężeniach kwasów i zasad; stężony HCl jest wykorzystywany do demineralizacji chityny.

Wszystkie te niedogodności sprawiają, że od wielu lat prowadzone są badania nad nowymi, alternatywnymi metodami produkcji chitozanu takimi jak: bezpośrednia separacja ze ścian grzybów strzępkowych należących do Mucoraceae (2-4), czy też enzymatyczna deacetylacja chityny (5-7). Enzymatyczna deacetylacja może być także wykorzystana do modyfikowania chitozanu o wysokich stopniach acetylacji i przekształcania go do polimeru o niskich AD (8,9), przy jednoczesnym zachowaniu niezmienionej masy cząsteczkowej. Taki proces jest trudny do przeprowadzenia na drodze chemicznej.

Enzymatyczna deacetylacja prowadzona jest z wykorzystaniem deacetylazy chitynowej. Enzym ten występuje głównie w komórkach grzybów strzępkowych należących do rodziny Mucoraceae (*Absidia*, *Mucor*), gdzie bierze udział w syntezie chitozanu, składnika ściany komórkowej (10). Hydrolizuje on wiązanie między grupą aminową a acetylową w merach N-acetylglukozaminy zawartych w chitynie i chitozanie, co prowadzi do utworzenia merów glukozaminy (GlcN):



W wyniku tej reakcji oprócz merów glukozaminy tworzony jest także kwas octowy, który jest uważany za inhibitor dla deacetylazy chitynowej (11,12). Z tego względu istnieje konieczność sprawnego wydzielenia kwasu octowego ze środowiska reakcji. Taką możliwość stwarza reaktor membranowy wykorzystywany do prowadzenia enzymatycznej reakcji z jednoczesnym odbiorem produktu (13-16). W tego typu reaktorze mieszanina reakcyjna zawierająca rozpuszczony chitozan oraz deacetylazę chitynową cyrkuluje w układzie z modułem membranowym o średnicach porów wystarczająco dużych, by umożliwić usuwanie wytwarzanego kwasu octowego, a jednocześnie na tyle małych, by zatrzymać deacetylazę chitynową w układzie reakcyjnym.

Deacetylaza chitynowa jest białkiem o masie cząsteczkowej od 27 kDa (*Aspergillus nidulans*, [17]) do 110 kDa (*Rhizopus stolonifer*, [18]) zatem zastosowanie modułu o średnicy porów rzędu 10 kDa, jak się wydaje, jest wystarczające.

Celem prezentowanej pracy było określenie możliwości zastosowania reaktora membranowego do kontrolowanej enzymatycznej deacetylacji chitozanu. Kontrola

procesu, otrzymywanie chitozanu o ściśle określonym stopniu acetylacji, byłaby możliwa poprzez sterowanie warunkami prowadzenia cyrkulacji roztworu reakcyjnego przez moduł membranowy oraz czasem prowadzenia procesu. W pracy wykorzystywano deacetylazę chitynową wyizolowaną z grzybów strzępkowych *Absidia orchidis* vel *coerulea* o masie cząsteczkowej ok. 76 kDa (19). Porównano także działanie deacetylazy chitynowej w reaktorze okresowym oraz w reaktorze membranowym.

2. Materiały i metody

2.1. Odczynniki

Chitozan o stopniu acetylacji 47,5% (pomiar na podstawie widma IR) i średniej masie cząsteczkowej w zakresie 300-700 kDa (lepkość 1% roztworu w 1% roztworze kwasu octowego w temperaturze 25°C $\mu = 85$ cp, dane producenta) był darowizną firmy Gillet-Machtani-Chitozan (Francja-Indie). Pozostałe odczynniki, o czystości analitycznej, zakupiono w firmie POCh.

2.2. Deacetylaza chitynowa

Grzyby strzępkowe *Absidia orchidis* vel *coerulea* NCAIM F 00642, darowizna National Culture of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapest (Węgry) namnażane były w hodowli okresowej w warunkach optymalnych dla wzrostu oraz na optymalnej pożywce. Po zakończeniu hodowli biomasa była oddzielona od medium hodowlanego (wirowanie, 6000 obr/min, 30 min), przemyta 2-3 razy wodą i zamrożona. Rozmrożoną biomasę (4°C, przez noc), homogenizowano, a następnie oddzielono stałe pozostałości (wirowanie, 6000 obr/min, 45 min, 4°C). Klarowny surowy ekstrakt komórkowy wysolono siarczanem amonu (80% nasycenia) i pozostawiono na noc (4°C). Wytrącone białka usunięto na drodze filtracji (filtry o średnicy porów 0,45 μ m), a następnie klarowny roztwór zawierający deacetylazę chitynową dializowano (zestaw Vivaflow 50 firmy Sartorius, Niemcy, z modułem membranowym z regenerowanej celulozy o *cut-off* 10 kDa) w celu usunięcia siarczanu amonu (enzym przeprowadzono do roztworu HCl pH 4,0) oraz zatężono metodą ultrafiltracji z wykorzystaniem tego samego modułu.

2.3. Układ badawczy

2.3.1. Reaktor okresowy

Chitozan (0,9 g) zmieszano z 500 mL roztworu HCl (pH 4,0), a następnie małymi porcjami (5-10 mL) dodawano 0,1 M roztwór HCl aż do całkowitego rozpuszczenia chitozanu. Całość uzupełniono w kolbie miarowej do 1,00 L roztworem HCl o pH 4,0. Tak przygotowany roztwór umieszczano w termostatowanym, zamkniętym reaktorze o całkowitej objętości 1,3 dm³ wyposażonym w mieszadło magnetyczne. Pokrywa reaktora była dodatkowo ogrzewana za pomocą taśmy grzewczej połączonej z autotransformatorem w celu zapobieżenia skraplania się par na powierzchni pokrywy reaktora (temperatura roztworu reakcyjnego była stale kontrolowana i utrzymywana na stałym poziomie 50°C±0,5°). Chitozan oraz deacetylazę chitynową preinkubowano osobno około 15-20 min w temperaturze reakcji (50°C). Reakcja inicjowana była przez dodanie roztworu enzymu do roztworu chitozanu. W określonych odstępach czasu z układu pobierano próbki (2 mL), które natychmiast mieszano z 0,15 mL 1 M NaOH w celu zatrzymania reakcji. Wytrącony chitozan usuwano przez wirowanie (3000 obr/min, 30 min); stężenie kwasu octowego oznaczano w klarownym roztworze.

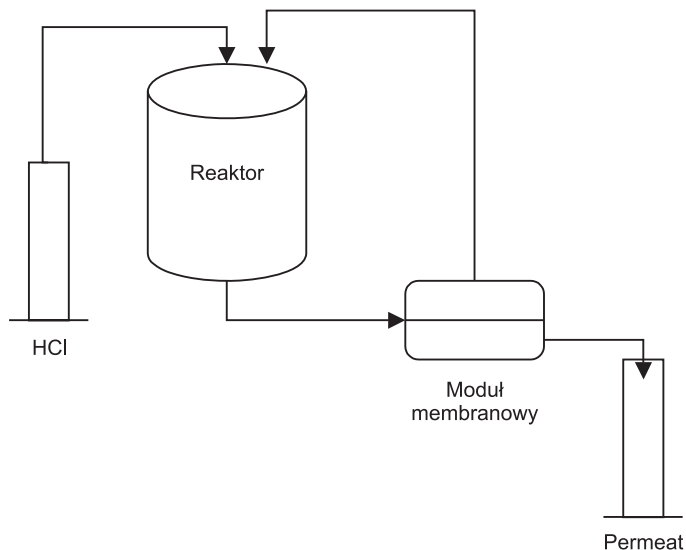
2.3.2. Reaktor membranowy

Reaktor ten przygotowywano w ten sam sposób, co reaktor okresowy z tą różnicą, że połączono go z układem Vivaflow 50 firmy Sartorius (Germany) wyposażonym w moduł membranowy o *cut-off* 10 kDa i powierzchni 50 cm² (nr katalogowy VF05CO). Cyrkulację roztworu uruchomiono 2 min po dodaniu deacetylazy chitynowej do reaktora. Ubytki roztworu wynikające z odprowadzania permeatu z modułu filtracyjnego uzupełniano za pomocą roztworu HCl pH 4,0 dozowanego w sposób ciągły z szybkością odpowiadającą szybkości permeacji (rys. 1).

W określonych odstępach czasu z układu reakcyjnego pobierano po 2 mL roztworu, który mieszano natychmiast z 0,15 mL 1 M NaOH w celu zatrzymania reakcji; wytrącony chitozan usuwano poprzez odwirowanie. Próbkę (2 mL) pobierano także z permeatu uzyskanego z modułu filtracyjnego. Kontrolowano także objętość permeatu oraz objętość HCl dodanego do układu w trakcie prowadzenia procesu.

2.4. Oznaczanie kwasu octowego

Kwas octowy oznaczano metodą HPLC: stosowano układ izokratyczny (Waters 625 LC System) z kolumną HyperREZ XP Organic acid (65°C) z prekolumną HyperREZ XO Carbohydrate H⁺ Guard Column, detektorem refraktometrycznym (Waters410



Rys. 1. Schemat układu reaktora membranowego.

Differential Refractometer), zaś jako eluent stosowano 0,005 M H_2SO_4 . Metoda została zwalidowana do oznaczania stężenia kwasu octowego w roztworach HCl-chitozan. Dolna granica oznaczalności została potwierdzona przy stężeniu 10 nmoli/mL ze średnim odchyleniem standardowym $SD = 9\%$.

2.5. Oznaczanie stężenia białka

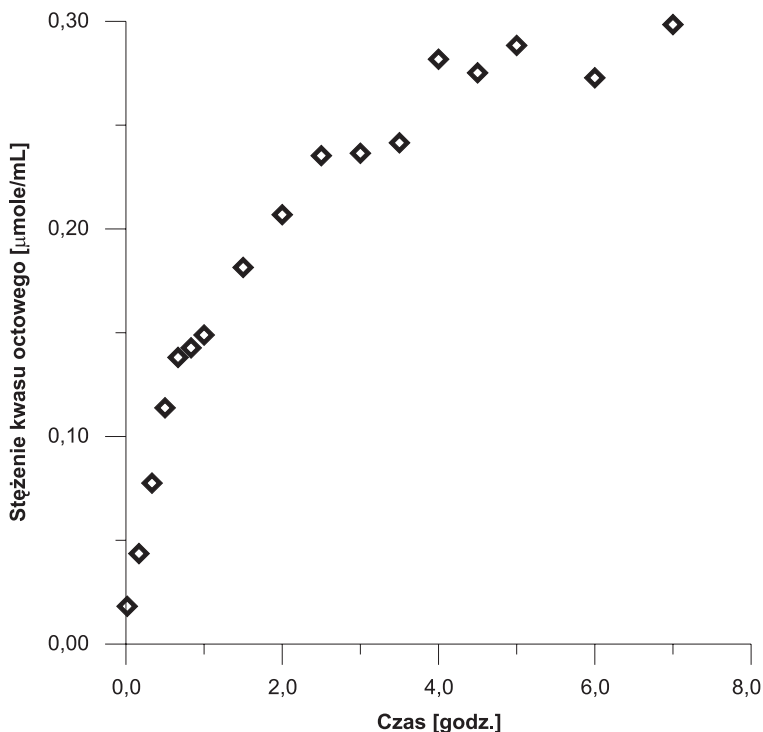
Stężenie białka oznaczano kolorymetryczną metodą Bradforda z wykorzystaniem gotowego roztworu Coomasi Brilliant Blue G-250 firmy BioRad (USA), nr kat. 500-0006.

3. Wyniki doświadczeń

We wszystkich doświadczeniach stosowano taką samą ilość enzymu wynoszącą 240 μg oraz roztwór chitozanu o stężeniu 0,9 g/L w HCl (pH 4,0), co odpowiadało stężeniu merów GlcNAc 2,349 $\mu\text{mol/mL}$

3.1. Deacetylacja w reaktorze okresowym

Zmiany stężenia kwasu octowego w reaktorze okresowym przedstawiono na rysunku 2.



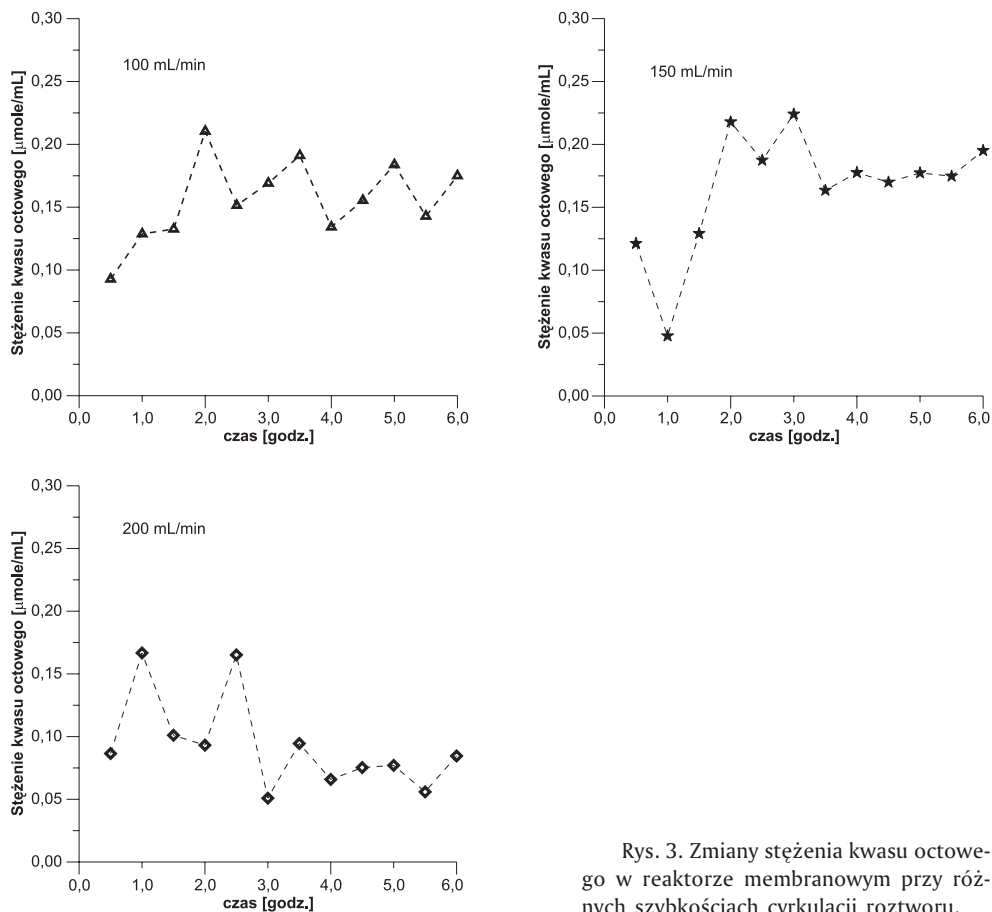
Rys. 2. Zmiany stężenia kwasu octowego w reaktorze okresowym.

Najszybsze zmiany stężenia kwasu octowego w medium reakcyjnym obserwowano w ciągu pierwszej godziny prowadzenia procesu. Następnie stężenie kwasu zmieniało się znacznie wolniej i po około 4 godzinach trwania procesu osiągnęło swoją maksymalną wartość, 0,29 ($\mu\text{mol/mL}$)/ min. Dalsze prowadzenie procesu (do 15 godz., dane nie przedstawione na rysunku) nie wpłynęło znacząco na przebieg procesu deacetylacji.

Prezentowany przebieg zmian stężenia kwasu octowego może świadczyć o inibicji deacetylazy chitynowej przez produkt reakcji, kwas octowy. Enzym po 4 godzinach prowadzenia procesu uległ prawdopodobnie całkowitej inaktywacji. Całkowita ilość kwasu octowego wytworzonego w wyniku deacetylacji chitozanu w ciągu 6 godzin prowadzenia procesu wynosiła 298,5 μmola , co odpowiadało oczekiwanej zmianie stopnia acetylacji o 6%.

3.2. Deacetylacja w reaktorze membranowym

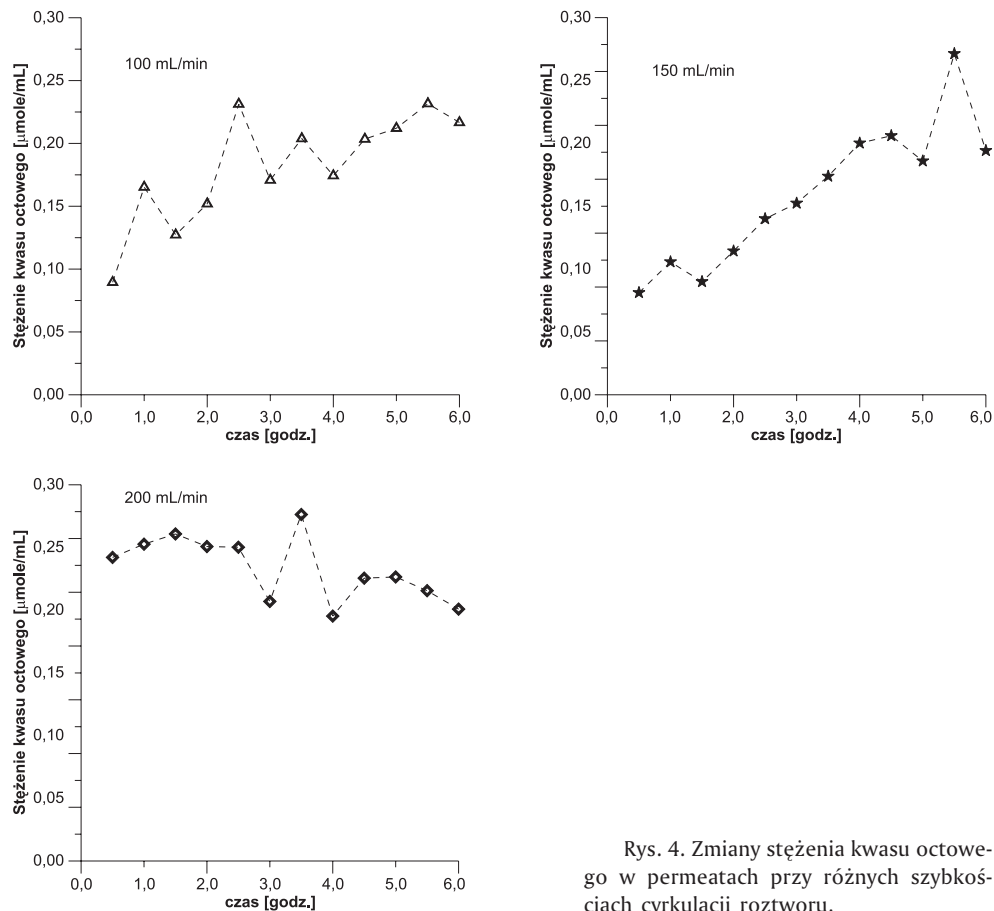
Doświadczenia w reaktorze membranowym prowadzono przy 3 szybkościach cyrkulacji roztworu: 100, 150 i 200 mL/min; proces był prowadzony w warunkach nie ustalonych. Wyniki doświadczeń przedstawiono na rysunku 3 (zmiany stężenia



Rys. 3. Zmiany stężenia kwasu octowego w reaktorze membranowym przy różnych szybkościach cyrkulacji roztworu.

kwasu octowego w mieszaninie reakcyjnej) oraz na rysunku 4 (zmiany stężenia kwasu octowego w permeacie).

Z danych doświadczalnych widać wyraźnie, że wyniki uzyskane dla szybkości cyrkulacji 100 mL/min i 150 mL/min są do siebie zbliżone, zaś proces prowadzony przy cyrkulacji 200 mL/min znacznie odbiegał od poprzednich. W dwóch pierwszych przypadkach obserwowano powolny wzrost stężenia kwasu octowego w medium reakcyjnym, przy czym przy szybkości cyrkulacji 100 mL/min, poczynając od 3 godz. prowadzenia procesu obserwowano dodatkowo wyraźne oscylacje. Końcowe stężenia kwasu octowego były zbliżone: odpowiednio 0,175 μmol/mL i 0,195 μmol/mL. Stężenie kwasu octowego w reaktorze, w procesie prowadzonym przy szybkości cyrkulacji 200 mL/min, było znacznie niższe od poprzednich i malało w trakcie prowadzenia procesu, osiągając końcową wartość 0,085 μmol/mL. Niższe stężenie kwasu octowego w mieszaninie reakcyjnej wpływa korzystnie na prowadzenie procesu ze względu na zmniejszenie wpływu inhibitora (kwasu octowego) na deacetylazę chitynową.



Rys. 4. Zmiany stężenia kwasu octowego w permeatach przy różnych szybkościach cyrkulacji roztworu.

Zmiany stężenia kwasu octowego w permeacie odpowiadały zmianom w reaktorze: przy szybkości cyrkulacji 100 mL/min oraz 150 mL/min obserwowano wzrost stężenia kwasu octowego w trakcie prowadzenia procesu, podczas gdy przy 200 mL/min jego stężenie powoli malało. We wszystkich przypadkach stężenie w permeacie było wyższe niż to w reaktorze. Współczynniki podziału (stosunek stężenia kwasu octowego w permeacie do stężenia w reaktorze) zmieniały się od 1,24 i 1,16 do 5,54 (dla cyrkulacji odpowiednio 100, 150 i 200 mL/min). Tak wysokie współczynniki podziału można wytłumaczyć tym, że prawdopodobnie enzym został zaadsorbowany na membranie i w obszarze przymembranowej warstewki polaryzacyjnej zachodziła dalsza deacetylacja chitozanu. Produkt deacetylacji, kwas octowy, mógł być od razu transportowany wraz ze strumieniem permeatu. Jednocześnie po stronie permeatu nie stwierdzono obecności cukrów redukujących (dane nie zamieszczone), które mogłyby świadczyć o obecności w permeacie chitozanu lub jego oligomerów. Nie stwierdzono także obecności białek, które świadczyłyby o przenikaniu enzymu przez membranę.

Wraz ze zmianą szybkości cyrkulacji roztworu przez moduł membranowy obserwowano także zmianę szybkości permeacji (tab.). Szybkości permeacji uzyskane w układzie HCl-chitozan-kwas octowy były wyższe niż te uzyskiwane w układzie HCl (pH 4,0) – kwas octowy (5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$); odpowiednio $21 \pm 1 \text{ mL}$, $33 \pm 1 \text{ mL}$, $44 \pm 1 \text{ mL}$ dla szybkości cyrkulacji 100 mL/min, 150 mL/min, 200 mL/min.

Tabela

Porównanie deacetylacji chitozanu w reaktorze okresowym i w reaktorze membranowym; początkowa zawartość merów N-acetylglukozaminy 2349 μmol , czas prowadzenia procesu 6 godz.

	Szybkość permeacji	Końcowa ilość kwasu octowego w reaktorze	Całkowita ilość uwolnionego kwasu octowego	Oczekiwana zmiana stopnia acetylacji
	(mL/ godz.)	(μmol)	(μmol)	(%)
reaktor okresowy	–	298,5	298,5	6,0
reaktor membranowy				
100 mL/min	104 ± 2	175,0	287,5	5,8
150 mL/min	128 ± 2	195,1	338,2	6,8
200 mL/min	156 ± 2	84,6	566,0	11,4

Porównując całkowity efekt deacetylacji w reaktorze okresowym oraz w reaktorze membranowym (tab.) można zaobserwować, że przy cyrkulacji 100 mL/min całkowita ilość kwasu octowego powstałego w wyniku enzymatycznej deacetylacji chitozanu odpowiada tej, jaką uzyskano w reaktorze okresowym (odpowiednio 298,5 i 287,5 μmol), lecz wraz ze wzrostem szybkości cyrkulacji uzyskiwano wzrost ilości wytworzonego kwasu octowego uzyskując aż 566 μmol w ciągu 6 godz. prowadzenia procesu przy cyrkulacji 200 mL/min. W konsekwencji, oczekiwana zmiana stopnia acetylacji rośnie wraz ze wzrostem szybkości cyrkulacji roztworu reakcyjnego przez moduł membranowy od 5,8% dla szybkości 100 mL/min do 11,4% dla szybkości 200 mL/min.

4. Podsumowanie

Celem prezentowanych badań było określenie możliwości zastosowania reaktora membranowego do kontrolowanej enzymatycznej deacetylacji chitozanu z wykorzystaniem deacetylazy chitynowej wydzielonej z grzybów strzępkowych *Absidia orchidis* vel *coerulea*. Stwierdzono, że sterując szybkością cyrkulacji roztworu przez moduł membranowy można zwiększać stopień deacetylacji chitozanu. Możliwe zatem jest sterowanie procesem i produkowanie polimeru o ściśle określonych parametrach stopnia acetylacji przy jednoczesnym zachowaniu jego masy cząsteczko-

wej. Proces prowadzony w reaktorze okresowym, ze względu na inhibitujący wpływ kwasu octowego na deacetylazę chitynową, pozwala jedynie na ograniczoną deacetylację chitozanu; w badanym przypadku było to jedynie około 6%. Doświadczenia przeprowadzone w reaktorze membranowym pokazały, że zmiana stopnia deacetylacji może być nawet dwukrotnie większa w porównaniu z uzyskaną w reaktorze okresowym (około 11,4%). Potwierdza to przydatność tego typu reaktora do kontrolowanej enzymatycznej deacetylacji chitozanu.

Praca była realizowana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Informatyzacji nr T09C 055 21.

Literatura

1. Razi M., Desbrieres J., Tolaimate A., Alagui A., Vottero P., (2000), *Polym. Internat.*, 49, 337-344.
2. Jaworska M. M., Konieczna E., (2001), *App. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 220-224.
3. Jaworska M. M., Konieczna E., (1999), in: *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivative*, vol. V, Ed. H. Struszczyk, Polish Chitin Sci., Łódź, 197-203.
4. Nwe N., Stevens W. F., (2002), *Biotechnol. Letters*, 24, 131-134.
5. Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V., (1995), *Carbohydrate Res.*, 273, 235-242.
6. Tokuyasu K., Ono H., Ohnishi-Kameyama M., Hayashi K., Mori Y., (1997), *Carbohydrate Res.*, 303, 353-358.
7. Win N. N., Stevens W. F., (2001), *App. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 334-341.
8. Jaworska M. M., Konieczna E., (2004), in: *Adv in Chitin Science*, vol VII, Eds. I. Boucher, K. Jamieson, A. Retnakaran, Montreal (Canada), 109-111.
9. Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V., (1995), *Carbohydrate Res.*, 273, 235-242.
10. Bartnicki-Garcia S., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, P. A. Sanford, Elsevier Applied Science, London, New York, 23-35.
11. Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis V., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2564-2568.
12. Tokuyasu K., Ohnishi-Kameyama M., Hayashi K., (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1598-1603.
13. Bryjak J., Bryjak M., Noworyta A., (1996), *Enzyme Microbial Technol.*, 19, 196-201.
14. Kuo Ch., Chen C. C., Chiang B. H., (2004), *J. Food Sci.*, 69, E332-E337.
15. Rodriguez-Nogales J. M., Ortega N., Perez-Mateos M., Busto M. D., (2005), *J. Food Sci.*, 70, E104-E108.
16. Rios G. M., Belleville M. P., Paolucci D., Sanchez J., (2004), *J. Membrane Sci.*, 242, 189-196.
17. Alfonso C., Nuero O. M., Santamaria F., Reyes F., (1995), *Curr. Microbiol.*, 30, 49-54.
18. El Ghaouth A., Arul J., Grenier J., Asselin A., (1992), *Experim. Mycology*, 16, 173-177.
19. Jaworska M. M., Pilarek M., Konieczna E., (2001), in: *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivative*, vol. VII, Ed. H. Struszczyk, Polish Chitin Sci., Łódź, 79-86.