

Biokatalytické reaktory s dvoma kvapalnými fázami

VLADIMÍR BÁLEŠ - RENÁTA ŠEVČÍKOVÁ - VIERA ILLEOVÁ

Súhrn. V práci sme poukázali na možnosti realizácie biokatalytických reakcií viacfázových kvapalných systémov, najmä s využitím kvapalných membrán. Je zrejmé, že pre niektoré biokonverzie je viacfázový bioreaktor výhodný.

V posledných dvoch desaťročiach sa upriamila značná pozornosť na biokatalytické reakcie vo viacfázových reakčných zmesiach. Tieto snahy vychádzajú:

- z potreby využívania substrátov málo rozpustných vo vode pri rôznych biokatalyzovaných konverziách (napr. stereošpecifických redukciách) nahradzujúcich niektoré stupne organickej syntézy viacerých typov molekúl,
- z potreby odstránenia inhibície danej reakcie produktom dobre rozpustným v organickom rozpúšťadle,
- z potreby posunutia reakčnej rovnováhy pri syntetických reakciách (syntéza peptidov, esterov) katalyzovaných príslušnými hydrolytickými enzýmami v smere syntetickom za súčasného uvoľňovania molekuly vody,
- z potreby zjednodušiť separáciu produktu nasledujúcu za reakčným stupňom, zlacniť ju, prípadne spojiť s produkčným stupňom v jednom zariadení.

Vývoj v tejto oblasti sa ubera niekoľkými líniami. Jedným typom riešenia sú dvojfázové systémy pozostávajúce z vodnej a organickej fázy, pričom pomery objemov fáz môžu byť rôzne v závislosti od typu fermentácie.

Doc.Ing. Vladimír Bálež, CSc., Ing. Renáta Ševčíková, Ing. Viera Illeová, Katedra chemického a biochemického inžinierstva, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

Systém s veľkým objemom organickej a malým objemom vodnej fázy je vhodný napr. pre mikrobiálny rast na palivových olejoch.

Veľmi malé množstvo vody obsahuje aj biokatalytický systém, v ktorom je biokatalyzátor uzavretý dovnútra reverznej mycely povrchovo aktívnej látky v organickom rozpúšťadle, prípadne do mikroemulznej kvapôčky. Práce v tejto oblasti publikujú Martínek, Berezin a kol. [1,2,3], Luisi, Laane a kol. [4,5,6,7], Kitahara [13].

Ďalším riešením viacfázového biokatalytického systému je trojfázový systém, prípadne systémy opačného usporiadania. Kvapalné membrány boli vyvinuté pri separačných procesoch pomocou nepórovitých tuhých membrán ako riešenie problémov súvisiacich s nízkymi rýchlosťami transportu látok cez tieto membrány. Oproti takým membránam majú kvapalné membrány nižšiu viskozitu a väčšinou oveľa väčšiu medzifázovú plochu prestupu látky. Kým tuhé membrány rozdeľujú zmesi na základe veľkosti molekúl, kvapalné membrány na základe rozpustnosti látok v membránovej fáze, prípadne na základe chemickej afinity medzi molekulou separovanej látky a molekulou prenášača v membráne.

Zariadenia používané na operácie s kvapalnými membránami

Pri porovnávaní prestupu látky pri extrakcii a pri permeácii kvapalnými membránami zohrávajú dôležitú úlohu hydrodynamické podmienky, preto je možné fermentačnú a separačnú časť spojiť do jedného zariadenia, avšak treba poznamenať že zatiaľ je takých postupov málo.

Kvapalné membrány na nosičoch možno vytvoriť v batérii dutých vlákien, v póroch ktorých je uzavretá membránová fáza a vodné fázy pretekajú vnútrom a vonkajškom dutých vlákien. Iným usporiadaním je permeačná komora, predelená nosičom zachytávajúcim membránovú fázu vo svojich póroch, na kompartmenty obsahujúce vodné fázy. Takéto zariadenie použil Behr [9] pri permeácii aminokyselín cez toluénovú membránu (za súčasného protismerného transportu chloridového aniónu), ako aj Nuchnoi [10] pri pertrakčnej acidogénnej fermentácii. Najčastejšie používaným zariadením je miešaná nádoba, cez ktorú súprudne resp. krížovo tečú emulzná a kontinuálna fáza. Emulzná fáza sa pripravuje v emulzifikátore distribúciou vnútornej vodnej fázy do membránovej fázy za miešania. Po skončení permeácie sa emulzná a kontinuálna fáza oddeľujú v usadzováku. Vnútoraná vodná fáza

sa od membránovej oddeľuje niektorým vhodným deemulzifikačným postupom.

Faktory ovplyvňujúce separáciu kvapalnými membránami

Okrem vybratého zariadenia majú na účinnosť procesu s kvapalnými membránami vplyv najmä zloženie a rozpustnosť membrán, vlastnosti emulzie a spôsob jej rozbiťania.

1. Zloženie membrány

Kvapalná membrána vždy obsahuje (v prípade usporiadania voda, olej/voda, akým sa zaoberáme) organické rozpúšťadlo a povrchovo aktívnu látku stabilizujúcu primárnu emulziu. Okrem toho môže podľa potreby obsahovať extraktant, prípadne prenášač uskutočňujúci sprostredkovaný transport membránou. Koncentrácia extraktantu v membránovej fáze zabraňuje vytvoreniu tretej fázy po rozbití emulzie (napr. ak fungujú ako prenášače kvartérne amóniové soli).

a) Rozpúšťadlo

Kvôli nižšej rozpustnosti vo vode a lepšej stabilite emulzie sa uprednostňujú alifatické rozpúšťadlá pred aromatickými. Významným kritériom je viskozita rozpúšťadla, keďže prestup látky je v mnohých prípadoch riadený difúziou petroleja ako Shellsol T s viskozitou 1 - 2 cP.

Pri použití kvapalných membrán v prítomnosti živých buniek alebo enzýmov je treba zohľadňovať toxicitu rozpúšťadla, resp. jeho denaturačnú schopnosť voči enzýmom. Laane a kol. [12] utriedili na základe údajov z literatúry všeobecné zákonitosti pre optimalizáciu rôznych biokatalytických systémov v rôznych typoch médií s obsahom organického rozpúšťadla. Z ich záverov vyplýva, že biokatalýza v prítomnosti organického rozpúšťadla je vysoká pre nepolárne solventy s $\log P \geq 4$ (rozpustnosť vo vode menšia ako 0,04 % hmotn.), stredná pre rozpúšťadlá s $\log P \in \langle 2; 4 \rangle$ a veľmi nízka pre rozpúšťadlá s $\log P \leq 2$ (rozpustnosť vo vode väčšia ako 0,4 % hmotn.). Hodnotu $\log P$ (P -rozdeľovací koeficient v systéme oktán:voda) možno podľa Rekkera [13] určiť na základe hydrofóbných fragmentálnych konštánt. Pre biokatalytické systémy je teda vhodné použitie nasledovných rozpúšťadiel [13]: heptán, oktán, nonán, dekán, undekán, dodekán, tetradekán, hexadekán, dekanol, undekanol, dodekanol, difenylé-

ter, cymén, etyldekanoát, pentylbenzoát, dibutylftalát, dipentylftalát, dihexylftalát, dioktylftalát, dodecylftalát, dilaurylftalát, butyloleát.

May a Li [14] použili v kvapalných membránach na enkapsuláciu ureázy izoparafíny so strednou molovou hmotnosťou $386,5 \text{ g.mol}^{-1}$ a s hustotou $0,836 \text{ g.cm}^{-3}$. Také isté rozpúšťadlo použil Mohan a Lina na redukciu a separáciu dusičnanov a dusitanov pomocou bakteriálneho bezbunkového enzýmového komplexu enkapsulovaného do emulzných kvapalných membrán [15].

Asher [16,17,18] uvádza rozpúšťadlá vhodné na prípravu emulzných kvapalných membrán používaných na medicínske účely - prečistené uhľovodíky s molovou hmotnosťou do 1000 g.mol^{-1} , t.j. parafíny, izoparafíny, naftalény, ďalej prečistené minerálne oleje, silne hydrogenované rastlinné oleje a živočíšne tuky (obsahujúce minimálne o 10% viac vodíka ako je normálna saturácia), silikónové oleje a perfluorované uhľovodíky s kinematickou viskozitou $1.10^{-6} - 1,5.10^{-4} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$

Všetky tieto skupiny vyhovujú požiadavkám na ne kladeným a to neodbúrateľnosť v tráviacom trakte, neškodlivosť a neschopnosť ukladania v tele. Asher [18] je takisto autorom kapsúl kvapalných membrán schopných odstraňovať v gastrointestinálnom trakte cicavcov rôzne toxíny, pričom tieto kapsuly sa postupne solubilizujú účinkom žľových kyselín a pankreatických sekrecií. Na tento účel sú vhodné triglyceridy, diglyceridy, dlhoreťazcové mastné kyseliny, medicimálne $C_6 - C_{14}$ alkoholy, fosfolipidy, monoglyceridy a α -hydroxymastné kyseliny.

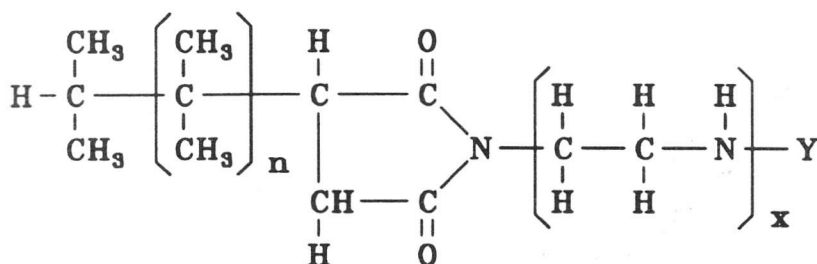
b) Stabilizátor emulzie

Výberu povrchovoaktívnej látky vhodnej ako stabilizátor emulzie sa nevenovala zatiaľ pozornosť adekvátnej jeho dôležitosti vzhľadom k tomu, že nielen určuje stabilitu emulzie, ale tiež podmieňuje osmózu vody do vnútornej vodnej fázy a rozpustnosť membránovej fázy vo vode a často vyvoláva veľký odpor prestupu látky. Veľmi často používanými stabilizátormi sú SPAN 80 (sorbitol monooleát) a rôzne polyamíny (Paranox 106, ECA 4306). Nevýhodou SPAN 80 je jeho veľká schopnosť prenášať molekuly vody, čím spôsobuje napučiavanie emulzie osmózou. Nehodí sa pre systémy obsahujúce NaOH vo vnútornej vodnej fáze, lebo má vysokú rozpustnosť vo vode. Tieto problémy nie sú spojené s použitím ECA 4360, avšak tento v dôsledku svojej zásaditosti reaguje s prítomnými organickými a anorganickými kyselinami a môže vyvolať veľký odpor prestupu látky. Ďalšie možnosti poskytujú sorbitol monolaurát, sorbitol monopalmitát, sorbitol stearát, sorbitol

tristearát, sorbitol trioleát, estery mastných kyselín a polyoxyetylénsorbitolu, monoglyceridy a diglyceridy [19]. Vývoj vhodného stabilizátora predstavuje jeden z predpokladov využitia kvapalných membrán aj v priemyselnom meradle.

Ako už bolo vyššie spomenuté, na zlepšenie stability emulzie možno pridávať do membránovej fázy ďalšie látky, tzv. "strengthening agents", napr. [20] polyizobutylény, najmä nižšej molovej hmotnosti okolo 900 g.mol^{-1} polyetylén - anhydrid kyseliny jantárovej - pantaerytritol, kopolyméry etylén - vinylacetát, decylmetakrilát - vinylpyridín kopolyméry.

Uprednostňované sú modifikátory so všeobecným vzorcom:



kde n sa mení od 10 do 60, x sa mení od 3 do 10 a Y je vybrané zo skupiny $C_1 - C_{10}$ hydrokarbylradikálov obsahujúcich H a O.

Príklady a perspektívne možnosti využitia kvapalných membrán v biotechnológii

1. Pertraktívna acidogénna fermentácia s použitím kvapalných membrán na nosičoch.

Nuchnoi [29,10] použil kvapalné membrány na nosičoch na zvýšenie produktivity bakteriálnej acidogénnej fermentácie acetátu a *n*-butyrátu. Pertrakcia tu prebieha v jednotke predelenej nosičom nasýteným membránovou fázou, na jednej strane membrány cirkuluje fermentačná pôda prečerpávaná z fermentora a na druhej strane 1 M roztok NaOH. Nosičom je teflon, membránovú fázu tvorí 20 % hmotn. tri-*n*-oktylfosfínoxid ako prenášač rozpustený v petroleji. Toto usporiadanie odstránilo inhibíciu konečným produktom a predĺžilo mikrobiálnu aktivitu, čo viedlo k 5-násobne vyššej produktivite oproti klasickej fermentácii.

2. *Enzýmová syntéza L-leucínu s kontinuálnou regeneráciou koenzýmu pomocou emulzných kvapalných membrán.*

Makryales [30] uvádza novú techniku imobilizácie systémov enzým/koenzýmových pomocou kvapalných membrán na modelovej reakcii redukčnej aminácie α -ketoizokapronátu (2-oxo-4-metylpentanoátu) na L-leucín. Reakciu katalyzuje enzým leucíndehydrogenáza, pričom spotrebovaný koenzým NADH sa regeneruje oxidáciou mravčanu formiátdehydrogenázou na CO_2 . Na enkapsuláciu enzýmov autor použil emulzné kvapalné membrány z parafínov s prídavkom SPAN 80 a Adogen 464. Systém bol testovaný aj v kontinuálnom usporiadaní. Podobným spôsobom možno syntetizovať dihydroxyfenylalanín (liečivo Parkinsonovej choroby) z pyruvátu, pyrokatecholu a NH_3 .

3. *Separácia a koncentrácia aminokyselín pomocou emulzných kvapalných membrán.*

Thien, Hatton a Wang [31] ukázali na L-fenylalaníne ako modelovej látke súčasnú separáciu a koncentráciu pomocou emulzných kvapalných membrán účinkom transportu sprostredkovaného Aliquatom 336. Membrána obsahovala parafíny, Paradox 100 a decylalkohol ako stabilizátory. Autori zvolili danú metódu z dôvodu nepoužiteľnosti klasickej extrakcie na separáciu aminokyselín v dôsledku existencie ich molekúl v nabitej forme.

V uvedenej práci sa využil vymieňací prenášačový transport záporne nabitých molekúl fenylalanínu (pri pH 11) z vonkajšej do vnútornej vodnej fázy s protismerným transportom Cl^- . Z ich výsledkov vyplýva, že rýchlosť separácie, koncentrácia fenylalanínu vo vnútornej vodnej fáze a rýchlosť napučievania sa zvyšujú so zvyšujúcou sa hnacou silou - koncentračným gradientom Cl^- v membráne. Použitý anión neovplyvňoval uvedené výsledky. Zvyšovanie koncentrácie prenášača zvyšovalo počiatočné toky a rýchlosť napučievania.

V práci sa predstavuje stratégia optimalizácie procesu s emulznými kvapalnými membránami, pričom hlavný dôraz sa kladie na hydratačné charakteristiky stabilizátora a špecifitu prenášača, ktorá je v priamom vzťahu k hydrofóbnosti prenášanej molekuly.

Hydrofóbnú škálu aminokyselín zoradili Nozaki a Tanford [32] na základe údajov voľnej energie transferu hydrofóbného bočného reťazca aminokyselín údajov voľnej energie transferu hydrofóbného bočného reťazca aminokyselín z vody do 100 %-ného organického rozpúšťadla. Podľa

toho je možné separovať aminokyseliny s minimálnym, resp. žiadnym opracovaním priamo z fermentačnej pôdy, čo je významný poznatok z hľadiska množstva aminokyselín produkovaných biotechnologicky na rôzne účely (potravinárske aditíva, krmovinárstvo v parenterálnej výžive). Vo vývoji metódy stojí v popredí výber vhodného selektívneho prenášača, ktorého špecificitou by bolo možné kontrolovať organickú syntézu, keďže táto je výrazne ovplyvňovaná stérickými efektami v komplexe substrát - prenášač. Jeden z nových perspektívnych prenášačov z aminokyselín a ich derivátov uviedol Maruyama [24].

Redukcia a separácia dusičňanov a dusitanov enzýmami enkapsulovanými pomocou emulzných kvapalných membrán

Mohan a Li [14] popísali redukciu a separáciu dusičňanov a dusitanov pomocou enkapsulovaného systému enzýmov získaného z bezbunkového homogenátu biomasy baktérií *Micrococcus denitrificans*. Membránovú fázu tvorili izoparafíny a stabilizátory SPAN 80 a vysokomolekulové polyamíny. Autori nezistili únik enzýmov z globúl ani negatívny vplyv zložiek membrány na enzýmovú aktivitu. Porovnaním katalytického účinku enkapsulovaného a voľného súboru enzýmov (prítomného v homogenáte) na NO_3 a NO_2 ako substráty, sa zistila znížená aktivita enkapsulovaného súboru. Tento jav autori vysvetľujú limitáciou rýchlosti enzýmovej reakcie difúziou substrátov ako aj produktov cez membránu.

Použitie kvapalných membrán v medicíne

Významné sú perspektívne možnosti využitia kvapalných membrán v medicíne najmä na enkapsuláciu rôznych enzýmov a iných liečiv, na degradáciu prípadne odstraňovanie nežiadúcich metabolitov, pri liečení mal-funkcií spôsobených napr. genetickými defektami. Príkladmi sú liečenie chronickej urémie hereditárnych enzýmových defektov (fenylnetonúria, akatalazémia). Predmetom štúdia bola už aj enkapsulácia enzýmov do lipozómov a erytrocytov [14], za analógy ktorých možno používať kvapalné membrány.

Imobilizácia ureázy do emulzných kvapalných membrán v systéme in vitro

May a Li [14] úspešne imobilizovali ureázu do emulzných kvapalných membrán bez straty enzýmovej aktivity uvoľňovaním enzýmu do vonkajšej vodnej fázy. Za tých istých podmienok bola aj Michaelisova konštanta takto imobilizovanej ureázy 50-násobne vyššia ako Michaelisova konštanta voľnej ureázy v roztoku. Tento fakt autori vysvetľujú pomalou difúziou produktov reakcie, čo spôsobuje, že rýchlosť tvorby produktu neodráža skutočnú rýchlosť enzýmovej premeny. Pomalá difúzia produktov navyše spôsobuje, že pH v bezprostrednej blízkosti enzýmu je alkalickéjšie ako vonkajší roztok a ovplyvňuje aktivitu ureázy. Ide o riešenie, ktoré sa úspešne môže uplatniť v medicíne, a to pri vývoji umelej obličky.

In vitro oxygenácia krvi

Kvapalné membrány môžu uzatvárať aj plynnú fázu, z ktorej molekuly plynu prestupujú do kontinuálnej fázy kontaktovanej s kvapalnými membránami. Tento spôsob použil Asher [18] na oxygenáciu krvi. V uvedenom usporiadaní sa krv dostáva do kontaktu s bublinami plynu pokrytými kvapalnými membránami, pričom kyslík prestupuje cez membránu do krvi, ktorú oxygenuje. Bubliny sa po skončení procesu odstraňujú ako trojfázová pena. Pena koaleskuje stlačením bublín za tvorby troch separovaných fáz: fázy krvi, fázy plynu a fázy kvapalných membrán. Na fázu kvapalných membrán boli použité halogénované uhľovodíky, ktoré nie sú zadržiavané v ľudskom tele.

Literatúra

1. MARTÍNEK, K. - LEVASHOV, A.V. - KLYACHKO, N.L. - BEREZIN, I.V., Dokl. AN USSR, 236, 1977, s.920.
2. MARTÍNEK, K. - CHMELNITZKIJ, J.L. - LEVASHOV, A.V. - BEREZIN, I.V., Dokl. AN USSR, 263, 1982, s.737.
3. MARTÍNEK, K. - BEREZIN, I.V. - KHMELNITZKIJ, J.L. - KLYACHKO, N.L. - LEVASHOV, A.V., Collec. Czech. Chem. Commun., 52, 1987, s.2589.
4. LUISI, P.L. - LAANE, C., Trends in Biotech., 4, 1986, s.153.
5. LUISI, P.L. - BONNER, F.J. - PELLEGRINI, A. - WIGET, P. - WOLF, R., Helvetica Chimica Acta, 62, 1979, s.740.

6. LUISI, P.L. - LUTHI, P. - TOMKA, I. - PRENOSIL, J. - PAUDE, A., *Annals N.Y. Academy of Sciences*, 434, 1984
7. LUISI, P.L. - GIOMINI, M. - PILENI, M.P. - ROBINSON, B.H., *Biochem. Biophys. Acta*, 947, 1988, s.209.
8. KITAHARA, A. - KON-NO, K., *J. Colloid Interface Sci.*, 49, 1974, s.391.
9. BEHR, J.P. - LEHN, J.M., *American Chem. Soc.*, 1973, s.6108.
10. NUCHNOI, P. - IZAWA, I. - NISHIO, N. - NAGAI, S., *J. Ferment. Technol.*, 65, 1987, s.699.
11. DRAXLER, J. - MARR, R., *Chem. Eng. Process.*, 20, 1986, s.319.
12. LAANE, C. - BOEREN, S. - VOS, K. - VEEGER, C., *Biotech. Bioeng.*, 1987, s.81.
13. REKKER, F.F. - KORT, H.M., *Eur. J. Med. Chem. Clin. Therap.*, 14, 1979, s.479.
14. MAY, S.W. - LI, N.N., *Biochem. Bioph., Res. Commun.*, 47, 1972, s.1179.
15. MOHAN, R.R. - LI, N.N., *Biotech. Bioeng.*, 16, 1974, s.513.
16. ASHER et al., *US Pat.* 4, 183, 960, Jan.15, 1980.
17. ASHER et al., *US Pat.* 4, 183, 918, 1980.
18. ASHER et al., *US Pat.* 4, 183, 962, 1982.
19. CHAN, CH.CH. - LEE, CH.J., *Chem. Eng. Science*, 42, 1987, s.83.
20. LEHN, J.H. - SAUVAGE, J.A., *Chem. Communications*, 1971, s.440.
21. CUSSLER, E.L., *AIChE J.*, 17, 1971, s.377,1300.
22. REUSCH, C.F. - CUSSLER, E.L., *AIChE J.*, 19, 1973, s.736.
23. MARUYAMA, K. - TSUKUBE, H. - ARAKI, T., *J. Amer. Chem. Soc.*, 104, 1982, s.5197.
24. MARUYAMA, K. - TSUKUBE, H., *Chem. Communications*, 1980, s.966.
25. LEACH, B.E. - ANGELICI, R.J., *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 1969, s.6296.
26. KATO, S. - KAWASAKI, J., *J. Chem. Eng. Japan*, 21, 1988, s.321.
27. KATO, S. - KAWASAKI, J., *J. Chem. Eng. Japan*, 20, 1987, s.232.
28. NUCHNOI, P. - JANO, T. - NISHIO, N. - NAGAI, S., *J. Ferment. Technol.*, 65, 1987, s.301.
29. MAKRYALES, K. - SCHEPER, T. - SCHUGERL, K. - KULA, M.R., *Chem. Ing. Tech.*, 57, 1985, s.362.
30. TIEN, M.P. - HATTON, T.A. - WANG, D.C., *Biotech. Bioeng.*, 32, 1989, s.604.
31. NOZAKI, J. - TANFORD, CH., *J. Biol. Chem.*, 246, 1971, s.2271.

Do redakcie došlo 3.12.1992.

Biocatalytic reactors with two liquid phases

Summary

In the work we pointed out possibilities of biocatalytic reactions realisation in multi-phase liquid systems particularly with utilisation of liquid membranes. It is obvious that to some bioconversions the multi-phase bioreactor is advantageous.