



Pannon Egyetem

Vegyésmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskola

Biokatalitikus szennyvíztisztítási technológia fejlesztése

DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Készítette:

Varga Béla

Témavezető:

Dr. Somogyi Viola

egyetemi docens

Pannon Egyetem

Mérnöki Kar

Fenntarthatósági Megoldások Kutatólaboratórium

2023

Bevezetés

A szerves mikroszennyezők eltávolítására a lakossági szennyvíztisztításban napjainkban még nem megoldott, így speciális tisztítási technológiák kidolgozására van szükség, amelyek képesek ezen szennyezők okozta környezetterhelés csökkentésére. Az egyik ilyen megoldás oxidoreduktáz enzimek által katalizált folyamatokban történő átalakítás kevésbé toxikus anyagokká. A lakkáz enzim szennyvíztisztításban történő ipari léptékű használatának elterjedéséhez azonban szükség van olyan immobilizálási módszerek kidolgozására, amelyek lehetővé teszik az enzim többszöri felhasználását és stabilitásának megőrzését a tisztítás során. Erre vonatkozóan számos különböző rögzítési és stabilizálási módszer került kidolgozásra. A kutatásom célja olyan módszerek kidolgozása, amelyek biológiailag lebontható anyagokat használnak hordozóként, így a katalizátor elhasználódása után azok ártalmatlanítása sem okoznak környezetterhelést, illetve alkalmasak a lakkáz által katalizált reakció során keletkező reakciótermékek visszatartására is.

Alkalmazott módszerek

Doktori kutatásom két fő területre bontható az alkalmazott enzim immobilizálási módszer szerint. Elsőként a lakkáz kalcium-algínát mátrixban való csapdázással történő rögzítésével foglalkoztam. Ennek eredményeként a lakkáz enzimet tartalmazó gyöngyök képzésével állítottam elő egy olyan biokatalizátort, amely szűréssel eltávolítható. A rögzítési protokoll lakkázra történő adaptálását követően megvizsgáltam annak üzemeltetés szempontjából legfontosabb tulajdonságait: fajlagos aktivitását, aktivitásának hőmérséklet és

pH függését, enzimkinetikai állandóit, tárolási stabilitását és újrahasználatának lehetőségeit. Ezt követően választott mikroszennyező, a diklofenák (DCF) átalakításával vizsgáltam annak alkalmazását.

A kutatás második szakaszában a lakkáz enzimkatalitikus membrán bioreaktorban való használatához kidolgoztam egy új, adszorpción és glutaraldehiddel történő keresztkötésen alapuló immobilizációs módszert, amellyel a lakkáz enzim aggregátumok formájában rögzíthető cellulóz-acetát mikroszűrő membrán pórusaiban. A rögzítés paramétereit a válaszfelületek módszerével optimalizáltam, majd az előállított enzimkatalitikus membránt karakterizáltam. Ehhez az alginát eseténben is vizsgált jellemzők mellett, a diklofenák lebontása esetén vizsgáltam a térfogatáram hatását is. A kis méretű membrán modulban egyszeri átszűréssel végzett kísérleteket követően, egy nagyobb laboratóriumi membrános rendszerben is vizsgáltam a folyamatos recirkuláltatással történő mikroszennyező átalakítást.

Tézisek

I. Lakkáz enzim immobilizálása alginát mátrixban

1. Megállapítottam, hogy a lakkáz enzim **nagy immobilizálási hatékonysággal rögzíthető kalcium-alginát gyöngyökben, azonban az előállított katalizátor fajlagos aktivitása alacsony** a kialakuló diffúziós gátlás következtében. Az alginátban történő csapdázás során az immobilizálás hatékonysága 98,2%-os, azonban az előállított katalizátorban az enzim csak a teljes tömeg 0,1%-át teszi ki nedves tömegre viszonyítva, míg száraz tömegre viszonyítás esetén a hordozó

3%-át. Az immobilizálás során a szabad lakkáz kezdeti 457 U/mg fajlagos aktivitásához képest, az előállított alginát gyöngyök fajlagos aktivitása csupán 0,00026 U/mg.

Kapcsolódó publikáció: 4

2. Az alginát mátrixban immobilizált lakkáz használata során **az adszorpció jelentős mértékben hozzájárul a diklofenák eltávolításához**. Az ABTS átalakítása során a gyöngyökben akkumulálódnak a keletkező termékek, amelyek egyrészt színezik az alginát gyöngyöket, másrészt csökkentik a gyöngyök látszólagos aktivitását. Az alginát gyöngyökben immobilizált lakkázzal végzett diklofenák kezelés esetén, az eltávolítás meghatározó mechanizmusa az alginát mátrixban történő adszorpció.

Kapcsolódó publikációk: 4, 7

II. Lakkáz enzim immobilizálása mikroszűrő membrán pórusaiban

3. Lakkáz enzimet sikeresen immobilizáltam cellulóz-acetát membránon két lépéses immobilizációs módszerrel, amely során az enzim először adszorpcióval kerül megkötésre, majd keresztkötésekkel kerül stabilizálásra enzim-aggregátumok formájában a membránon. Megállapítottam, hogy a lakkáz adszorpcióval történő immobilizációja során **a hőmérséklet emelés javítja a megkötés hatékonyságát, azonban ehhez fontos a termikus denaturáció figyelembevétele a rögzítés során**.

Az immobilizálás adszorpciós körülményeinek optimalizálásával meghatároztam, hogy a legnagyobb hatékonyság pH=4 pufferoldatban feloldott 3 mg/ml-es lakkáz oldattal, 9 órás adszorpció során, 29°C-on érhető el.

Glutáraldehiddel történő keresztkötés során kimutattam, hogy **a keresztkötő koncentrációjának hatása csak alacsonyabb hőmérsékleten végzett keresztkötés esetén számottevő** és hogy a 4°C-ra történő hűtéssel a membrán aktivitása javítható. Az adszorbeált enzim aktivitásának maximumát 4°C-on 100 mM glutáraldehiddel végzett 2 órás keresztkötés esetén veszi fel.

A kidolgozott immobilizációs módszerrel keresztkötések jönnek létre az enzim molekulák között, amelyekből aggregátumok keletkeznek, amit elektronmikroszkópos felvételek segítségével erősítettem meg. Megállapítottam, hogy a kidolgozott módszerrel a membránon 0,39 µm átmérőjű aggregátumok alakultak ki.

Meghatároztam, hogy **az immobilizációs eljárás során megváltozik membrán pórusmérete,** valamint az aggregátumok jelenléte miatt csökken a membrán permeabilitása. A membrán pórusmérete az immobilizálást követően 0,19 µm-ről 0,24 µm-re növekedett. A membrán desztillált vízzel meghatározott térfogataránya a nyomástól függően, átlagosan 21%-kal csökkent.

Kapcsolódó publikációk: 3, 8, 13

4. Megállapítottam, hogy az előállított lakkáz tartalmú, cellulóz-acetát alapú **enzimkatalitikus membránnal végzett átalakítás hatékonysága függ a szubsztrát térfogatáramától**. ABTS szubsztrát átalakítása során a konverzió és a térfogatáram fordítottan arányos és a változás exponenciális összefüggéssel írható le a vizsgált 0,4 – 1,9 liter/óra tartományon. Az alacsonyabb térfogatárammal végzett diklofenák átalakítás során azonban a térfogatáram-konverziót leíró függvény minimumot vesz fel, a vizsgált 0,02 – 0,07 liter/óra közötti tartományon. Kapcsolódó publikációk: 3, 13

5. Mérési adatok segítségével megerősítettem, hogy a szabad enzimmal és **membránon immobilizált enzimmal végzett diklofenák átalakítás során keletkező kisebb oldhatóságú reakciótermékek mikroszűrés segítségével eltávolíthatóak**.

Az oxidoreduktáz enzimek által katalizált kémiai reakcióban a szakirodalmi információk elemzése alapján megállapítottam, hogy a keletkező reakciótermékek toxicitása az adott komponenstől függően változhat, ezért olyan immobilizációs módszerek kidolgozását célszerű elvégezni, amelyek ezen anyagok eltávolítására is alkalmasak. A keletkező reakciótermékek a lakkáz által katalizált reakcióban általában a kiindulási komponensből összekapcsolódó molekulák keletkeznek, amelyek elválasztása adszorpciós vagy membrán-szeparációs eljárásokkal lehetséges.

A szabad enzimmal végzett diklofenák átalakítás során a keletkező reakciótermékek egy része sárga színű, 450 nm körüli UV-Vis elnyeléssel rendelkező reakciótermékek adnak. Mivel ezek oldhatósága kisebb, mint

a kiindulási komponensé, ezért kívánnak az oldatból. Az enzimátikus membránnal végzett átalakítás során egyszeri átszűrés esetén ezen reakciótermékek nem kerülnek eltávolításra, azonban a permeátum visszaforgatásával ezek egy része eltávolítható.

Kapcsolódó publikációk: 1, 3, 5, 6, 8

Publikációk

Külföldi folyóiratban megjelent publikációk:

1. **Varga, B.**, Somogyi, V., Meiczinger, M., Kováts, N., Domokos, E. (2019) Enzymatic treatment and subsequent toxicity of organic micropollutants using oxidoreductases - A Review, *Journal Of Cleaner Production*, 221, 306-322. Q1, IF: 7,246
2. Meiczinger, M., **Varga, B.**, Wolmarans, L., Hajba, L., Somogyi, V. (2022) Stability improvement of laccase for micropollutant removal of pharmaceutical origins from municipal wastewater, *Clean Technologies and Environmental Policy*, 23, 3213-3223, Q2, IF=4,7
3. **Varga, B.**, Meiczinger, M., Jakab, M., Somogyi, V. (2023) Design and Optimization of Laccase Immobilization in Cellulose Acetate Microfiltration Membrane for Micropollutant Remediation, *Catalysts*, 13(2):222, Q2, IF=4,501.

Hazai folyóiratban megjelent publikációk:

4. **Varga, B.,** Somogyi, V., Meiczinger, M., Domokos, E. (2019) Immobilization of laccase in alginate beads, *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, 47(2)

Konferencia részvétel, teljes szövegű megjelenéssel:

5. **Varga, B.** Somogyi, V. Meiczinger, M., Domokos, E. (2017) Review on products of enzymatic degradation of micropollutants in wastewater, 12th Conference On Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems, Dubrovnik
6. **Varga, B.,** Somogyi, V., Meiczinger, M., Nagy, E., Domokos, E. (2018) Investigation of Diclofenac Degradation in Different Matrices, Conference On Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems, Novi Sad

Konferencia részvétel, csak kivonatos megjelenéssel:

7. **Varga, B.** Meiczinger, M., Somogyi, V., Nathnakumar, K., Nagy, E., Domokos, E., Lal, B. (2018) Degradation of diclofenac with laccase enzyme immobilized in alginate beads, 10th Eastern European Young Water Professionals Conference, Zágráb
8. **Varga, B.,** Wolmarans, L., Meiczinger, M., Somogyi, V. (2019) Immobilization of Laccase Inside a Microfiltration Membrane for Removal of Diclofenac, ANQUE-ICCE-CIBIQ, Santander

9. Meiczinger, M., **Varga, B.**, Nagy., E., Somogyi, V. (2019) Investigation of Immobilization Efficiency of Laccase by Different Technique in Biocatalytic Membrane Reactor ANQUE-ICCE-CIBIQ, Santander
10. **Varga, B.** (2019), Biokatalitikus technológia fejlesztése mikroszennyezők eltávolítására, Green Solution Veszprém
11. **Varga, B.**, Somogyi, V., Meiczinger, M., Domokos, E. (2018) Diklofenák eltávolítása enzimkatalitikus eljárással különböző közegekben, Környezetmérnöki Konferencia és Szakmai Nap, Debrecen
12. **Varga, B.** (2018) Diklofenák eltávolítása lakkáz enzimmel különböző közegekben, Víz- és szennyvízkezelés az iparban (VSZI'18), Zalakaros
13. **Varga, B.**, Meiczinger, M., Somogyi, V. (2021) Keresztkötött lakkáz aggregátumok létrehozása mikroszűrő membrán pórusaiban, II. FKF Szimpózium, Budapest