

Doktori (Ph.D) értekezés

**Biokatalitikus szennyvíztisztítási technológia
fejlesztése**

DOI:10.18136/PE.2023.844

Varga Béla

okleveles környezetmérnök

Témavezető:

Dr. Somogyi Viola

egyetemi docens

Pannon Egyetem

Vegyésmérnöki- és Anyagtudományi Doktori Iskola

2023

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem
Vegyészmérnöki- és Anyagtudományi Doktori Iskolája keretében

bio-, környezet- és vegyészmérnöki tudományok tudományágban

Írta: Varga Béla

Témavezető: Dr. Somogyi Viola

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Dr. Somogyi Viola

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....
(bíráló)

Bíráló neve: igen /nem

.....
(bíráló)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Veszprém,

.....
(a Bíráló Bizottság elnöke)

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

Veszprém,

.....
(az EDHT elnöke)

Tartalmi összefoglaló

A szerves mikroszennyezők jelenléte a különböző víztestekben és azok által okozott problémák kiemelt figyelmet kaptak az elmúlt évtizedben. Ennek eredményeként az Európai Unióban átfogó monitoring kampányok indultak, illetve számos technológia kidolgozása kezdődött meg a mikroszennyezők környezetterhelésének csökkentésére. Az egyik ilyen megoldás oxidoreduktáz enzimek, mint pl. a lakkáz által katalizált folyamatokban történő átalakítás kevésbé toxikus anyagokká. A lakkáz enzim szennyvíztisztításban történő ipari léptékű használatának elterjedéséhez azonban szükség van olyan költséghatékony immobilizálási módszerek kidolgozására, amelyek lehetővé teszik az enzim többszöri felhasználását és stabilitás megőrzését a tisztítás során.

A doktori munkámban ennek érdekében két lakkáz immobilizálási módszer kidolgozását végeztem el, karakterizáltam az előállított biokatalizátorokat, és tesztelem azok alkalmazhatóságát. Az első immobilizációs módszer a lakkáz alginát mátrixban való csapdázása volt. Az előállított katalizátor jellemzését követően megvizsgáltam diklofenák eltávolítására történő használatát.

Az első immobilizálási kísérlet eredményei és a szakirodalmi adatok elemzése alapján felismertem, hogy a lakkáz által katalizált mikroszennyező átalakítás eredményeként olyan reakciótermékek keletkeznek, amelyek membránszeparációval elválaszthatóak. Ennek érdekében az enzim integrált membrán bioreaktorban való használatához dolgoztam ki egy új immobilizálási módszert, amellyel az enzimből aggregátumokat hoztam létre egy cellulóz mikroszűrő membrán pórusaiban.

Az rögzítés optimális paramétereit a válaszfelületek módszerével határoztam meg az enzim adszorpciójára (lakkáz: 3 mg/ml, pH: 4, idő: 9 óra, hőmérséklet: 29°C), illetve a keresztkötésre vonatkozóan (glutáraldehid koncentráció: 100 mM, idő: 2 óra, hőmérséklet: 4°C). Az előállított enzimmkatalitikus membránt ezt követően jellemeztem, és megvizsgáltam annak gyakorlati alkalmazhatóságát diklofenák lebontására.

Kulcsszavak: lakkáz, mikroszennyező, alginát, enzimmkatalitikus membrán bioreaktor, diklofenák

Abstract

The presence of organic micropollutants in various water bodies and the problems caused by them have received special attention in the last decade. As a result, comprehensive monitoring campaigns and the development of different remediation technologies were launched to reduce the environmental impact of micropollutants. One such solution is the utilization of oxidoreductase enzymes, such as laccase, which can transform micropollutants into less toxic substances. However, in order to spread the use of the laccase enzyme in wastewater treatment on an industrial scale, it is necessary to develop cost-effective immobilization methods that allow the enzyme to be used multiple times and maintain stability during the treatment.

During my doctoral work, I developed two laccase immobilization methods, characterized the produced biocatalysts and tested their applicability. The first immobilization technique was the entrapment of laccase in an alginate matrix. After the characterization of the produced catalyst, I examined its use for the removal of diclofenac.

Based on the results and analysis of literature data, I realized that during the micropollutant transformation catalyzed by laccase, several transformation products are formed that have to be eliminated by membrane separation. For this purpose, I developed a new immobilization method for using this enzyme in an integrated membrane bioreactor. The method I formulated can make cross-linked enzyme aggregates from laccase in the pores of a cellulose microfilter membrane.

The optimal parameters of the immobilization were determined using the response surface method for enzyme adsorption (laccase: 3 mg/ml, pH: 4, time: 9 hours, temperature: 29°C) and for cross-linking (glutaraldehyde concentration: 100 mM, time: 2 hours, temperature: 4°C). After that, I characterized the produced enzyme catalytic membrane and examined its practical applicability for diclofenac degradation.

Keywords: laccase, micropollutant, alginate, enzymatic membrane bioreactor, diclofenac

Auszug

Die Gegenwart organischer Mikroverunreinigungen in verschiedenen Gewässern und die dadurch verursachten Probleme haben im letzten Jahrzehnt besondere Aufmerksamkeit erhalten. Infolgedessen wurden umfassende Überwachungskampagnen und die Entwicklung verschiedener Sanierungstechnologien gestartet, um die Umweltauswirkungen von Mikroverunreinigungen zu verringern. Eine solche Lösung ist die Verwendung von Oxidoreduktase-Enzymen wie Lakkase, die Mikroverunreinigungen in weniger toxische Substanzen umwandeln können. Um jedoch den Einsatz des Lakkase-Enzyms in der Abwasserbehandlung im industriellen Maßstab zu verbreiten, ist es notwendig, kostengünstige Immobilisierungsmethoden zu entwickeln, die eine mehrfache Verwendung des Enzyms ermöglichen und die Stabilität während der Behandlung erhalten.

Während meiner Doktorarbeit habe ich zwei Lakkase-Immobilisierungsmethoden entwickelt, die hergestellten Biokatalysatoren charakterisiert und auf ihre Anwendbarkeit getestet. Die erste Immobilisierungstechnik war der Einschluss von Lakkase in einer Alginatmatrix. Nach der Charakterisierung des hergestellten Katalysators untersuchte ich seine Verwendung zur Entfernung von Diclofenac.

Ich habe es anhand der Ergebnisse des ersten Immobilisierungsexperiments und der Analyse von Literaturdaten erkannt, dass bei der Lakkase katalysierten Mikroverunreinigungsumwandlung mehrere Umwandlungsprodukte entstehen, die durch Membrantrennung eliminiert werden müssen. Zu diesem Zweck habe ich eine neue Immobilisierungsmethode entwickelt, um dieses Enzym in einem integrierten Membranbioreaktor zu verwenden, womit vernetzte Enzymaggregate aus Lakkase in den Poren einer Zellulose-Mikrofiltermembran hergestellt gewirt.

Die optimalen Parameter der Fixierung wurden mit der Response-Surface-Methode für die Enzymadsorption (Lakkase: 3 mg/ml, pH: 4, Zeit: 9 Stunden, Temperatur: 29°C) und für die Quervernetzung (Glutaraldehydkonzentration: 100 mM, Zeit: 2 Stunden, Temperatur: 4°C). Danach habe ich die hergestellte enzymkatalytische Membran charakterisiert und ihre praktische Anwendbarkeit für den Diclofenac-Abbau untersucht.

Keywords: Lakkase, Mikroverunreinigung, Alginat, enzymatischer Membranbioreaktor, Diclofenac

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	9
Ábrajegyzék.....	10
Táblázatjegyzék	12
1 Bevezetés és célkitűzés	13
2 Szakirodalmi áttekintés	15
2.1 Mikroszennyezők problémája	15
2.1.1 Mikroszennyezők forrásai	16
2.1.2 Mikroszennyezők sorsa a hagyományos szennyvíztisztítóban.....	18
2.2 Mikroszennyezők eltávolításának technológiai megoldásai	19
2.3 Mikroszennyezők lebontása enzinkatalitikus technológiával.....	20
2.3.1 Lakkáz bemutatása	20
2.3.2 Enzinkatalitikus lebontás mechanizmusa	22
2.3.3 Lakkáz immobilizálása	24
2.3.4 Mikroszennyezők eltávolítása	31
3 Kísérleti rész.....	40
3.1 Felhasznált anyagok.....	40
3.1.1 Enzim.....	40
3.1.2 Membrán.....	40
3.1.3 További vegyszerek	41
3.2 Vizsgálati módszerek	42
3.2.1 Enzim aktivitás mérése	42
3.2.2 Diklofenák koncentrációjának meghatározása	43
3.2.3 Fehérjék koncentrációjának meghatározása	43
3.3 Lakkáz immobilizálása alginát mátrixban	44
3.3.1 Lakkáz rögzítésének menete.....	44
3.3.2 Előállított alginát gyöngyök karakterizációja.....	44
3.3.3 Alginátban immobilizált enzim újrahasznatának vizsgálata.....	46
3.3.4 Kinetikai paraméterek meghatározása ABTS szubsztráttal.....	46
3.3.5 Diklofenák lebontása alginátban immobilizált lakkáz enzimmel.....	46
3.4 Lakkáz immobilizálása membránon	47
3.4.1 Membrán kiválasztása	47
3.4.2 Lakkáz rögzítésének menete.....	47
3.4.3 Immobilizált aktivitás és immobilizálási hatékonyság meghatározása	49
3.4.4 Immobilizációs protokoll optimalizálása.....	49
3.4.5 Membrán felületének vizsgálata	50
3.4.6 Tércsatorna hatásának vizsgálata.....	51
3.4.7 Tárolási stabilitás vizsgálata	52
3.4.8 Szubsztrát koncentráció hatásának vizsgálata	52
3.4.9 Membrán többszöri felhasználásának vizsgálata.....	53
3.4.10 Diklofenák átalakítása enzinkatalitikus membránnal	53
4 Eredmények.....	55

4.1	Lakkáz immobilizálása alginát mátrixban	55
4.1.1	Előállított gyöngyök karakterizációja	55
4.1.2	Diklofenák eltávolítása	62
4.2	Lakkáz immobilizálása membránon	66
4.2.1	Membrán anyagának kiválasztása	67
4.2.2	Immobilizálás optimalizálása	67
4.2.3	Membrán karakterizációja	74
4.2.4	Diklofenák lebontása immobilizált lakkázzal.....	79
5	Diszkusszió.....	84
5.1	Alginátban végzett lakkáz immobilizáció értékelése.....	84
5.2	Alginátban immobilizált diklofenák átalakításának értékelése.....	85
5.3	Membránon való immobilizáció értékelése	86
5.4	Membránon immobilizált lakkázzal végzett diklofenák átalakítás értékelése.....	90
	Irodalomjegyzék	92
	Tézispontok	106
	Theses	109
	Publikációk	112
	Köszönetnyilvánítás.....	114
	Mellékletek	115

Rövidítésjegyzék

2,4-DCPh: 2,4-diklorofenol	HBT: 1-hidroxibenztriazol
ABTS:(2,2'-azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)	IBU: ibuprofén
AMP: ampicilin	IPU: izoproturon
AMX: amoxicillin	KCZ: ketokonazol
APAP: acetaminofén	LOEC: Lowest observed effect concentration
AS: acetosyringon	MFA: Mefenaminsav
BPA: biszfenol A	NOM: natural organic matter
CA: cellulóz-acetát	NP: nonil-fenol
CBZ: karbamazepin	NPX: naproxén
CHL: klóramfenikol	OP: oktilfenol
CIPRO: ciprofloxacin	OTC: oxitetraciklus
CLEA: cross-linked enzyme aggregates	PES: poliéter-szulfon
COUM: cianursav	PLGA: tejsav-glikolsav kopolimerek
CP: klorofenol	QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship
CPS: klórpírifosz	SA: sziringaldehid
DCF: diklofenák	SAR: structure activity relationship
E1: ösztron	SMZ: szulfametoxazol
E2: 17 β -ösztradiol	STZ: szulfatiazol
EDC: Endokrin rendszert károsító anyag	TC: tetraciklin
EE2: Etinilösztradiol	TFA: trifluor-ecetsav
EMR: enzimatisz membránreaktor	TMP: trimetoprim
ERYC: eritromicin	U: aktivitás egység
GFB: gemfibrozil	VLA: vialursav
HBA: 4-hidroxibenzil-alkohol	

Ábrajegyzék

1. ábra Gyógyszermaradványok útja a környezetbe és az ivóvízbe [27].....	17
2. ábra Lakkáz enzimben található réz tartalmú aktív helyek [61].....	21
3. ábra A lakkáz enzim által katalizált átalakítások lépései, lehetséges szintézis utak [13]	24
6. ábra Kísérletekhez használt kis méretű membrán tartó modul.....	48
7. ábra Sterlitech CF042D membrán modul [177]	54
8. ábra Alginát gyöngyök méretének változása száradás során.....	55
9. ábra Lakkáz tartalmú alginát összetétele	56
10. ábra Aktivitás a gyöngyök darabszámának függvényébe.....	57
11. ábra Alginát aktivitásának pH függése	58
12. ábra Michaelis-Menten kinetika alginátban rögzített lakkázra.....	59
13. ábra Alginát aktivitásának hőmérsékletfüggése	59
14. ábra Immobilizált lakkáz aktivitásának és tömegének változása újrahasználat során	60
15. ábra Alginát gyöngyök változása ismételt felhasználás során.....	61
16. ábra Lakkáz tartalmú alginát gyöngyök aktivitásának csökkenése tárolás során.....	61
17. ábra Szabad és alginátban immobilizált lakkáz aktivitásának változása tárolás során	62
18. ábra Diklofenák eltávolítása alginátban immobilizált és szabad lakkázzal.....	63
19. ábra Enzim nélkül végzett vak kísérlet során mért UV-Vis spektrum	64
20. ábra Szabad enzimmel végzett diklofenák átalakítása.....	64
21. ábra Enzim nélkül készített alginát jelenlétében mért UV-Vis spektrum változás...	65
22. ábra Alginátban immobilizált lakkázzal végzett diklofenák lebontás során mért UV- Vis spektrum.....	65
23. ábra Diklofenák szabad enzimmel történő átalakítása során keletkező termékek....	66
24. ábra Lakkáz aktivitásának változása különböző membránokon való rögzítés során	67
25. ábra Lakkáz adszorpció pH függése	68
26. ábra Lakkáz termikus denaturációja 15 - 40°C között.....	69
27. ábra Az egyes faktorok hatása az enzim adszorpciójára.....	71
28. ábra Glutáraldehid és hőmérséklet hatása a membrán aktivitására	73
29. ábra Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek a cellulóz-acetát membránról a kezelés előtt (A) és után (B, C).....	74

30. ábra Lakkáz tartalmú és kezeletlen membrán térfogatárama különböző nyomásokon	75
31. ábra Enzimatiskus membrán tárolási stabilitásának vizsgálata	76
32. ábra Nyomás és reakciósebesség közötti összefüggés.....	77
33. ábra Különböző térfogatáram esetén mért koncentráció változás	77
34. ábra Membránon immobilizált lakkáz enzimkinetikai vizsgálata	78
35. ábra ABTS átalakítása enzimkatalitikus membránnal több ciklusban.....	79
36. ábra pH hatása a diklofenák eltávolítására enzimkatalitikus membránon	80
37. ábra Különböző térfogatárammal mért diklofenák eltávolítási hatékonyságok	80
38. ábra Diklofenák UV-Vis spektrumának változása enzimatiskus membránnal való kezelés során	81
39. ábra Diklofenák eltávolítása enzimkatalitikus membránnal nagyméretű EMBR rendszerben	82
40. ábra UV spektrum változása EMBR rendszerből gyűjtött permeátumban.....	83
41. ábra Enzimkatalitikus membrán EMBR-ben végzett diklofenák átalakítás után.	83

Táblázatjegyzék

1. táblázat Különböző lakkáz immobilizációs módszerek alkalmazása során elért eredmények (adaptálva saját gyűjtésből [5])	28
2. táblázat Mikroszennyezők eltávolításának hatékonysága szabad enzimmel végzett kísérletekben	34
3. táblázat Immobilizált enzimmel végzett lebontások eredményei	36
4. táblázat A kísérletekhez használt membrán tulajdonságai [163]	41
6. táblázat Lakkáz adszorpciójának optimalizálása cellulóz-acetát membránon.....	70
7. táblázat Keresztkötés optimalizálása	72

1 Bevezetés és célkitűzés

A szerves mikroszennyezők jelenléte a különböző vizekben és azok által okozott problémák kiemelt figyelmet kaptak az elmúlt évtizedben [1]. Ennek eredményeként az Európai Unióban is átfogó monitoring kampányok indultak [2].

Számos technológiai megoldás létezik a mikroszennyezők kibocsátásának csökkentésére. Az egyik lehetőség, hogy oxidoreduktáz enzimek, mint pl. a lakkáz [3] vagy a tormaperoxidáz [4], által katalizált folyamatokban alakítjuk át a szennyezőket kevésbé toxikus anyagokká [5]. Ezek az enzimek ipari méretben előállíthatóak, akár mezőgazdasági hulladékok felhasználásával [6], így a fajlagos költségeik csökkenthetőek, ezáltal javul a hozzáférhetőségük [7], ami elősegíti a gyakorlati alkalmazást.

A lakkáz enzim 1800-as évek végén történő kimutatása [8] óta, számos ipari felhasználása alakult ki [9]. Például használható színezékek bontására textiliparban, így pl. farmer fehérítésre [10] vagy színezékeket tartalmazó szennyvíz tisztítására [11]. Használják élelmiszeriparban különböző fenolok bontására, pl. a borászatban [12]. Alkalmazható számos szervesanyag zöld kémiai szintézisének első lépéseként [13]. Emellett a lakkáz szelektivitásából és nagy reaktivitásából adódóan bioszenzorok fejlesztésénél is használják pl. fenolok [14], gyógyszerhatóanyagok [15] detektálására. Bioremediációban policiklusos aromás szénhidrogének eltávolítására [16] vagy gyógyszermaradványok eltávolítására [17] használható.

A lakkáz enzim szennyvíztisztításban történő ipari léptékű használatának elterjedéséhez szükség van olyan költséghatékony immobilizálási módszerek kidolgozására, amelyek növelni képesek az enzim stabilitását, és lehetővé teszik az enzim többszöri felhasználását a tisztítás során. A disszertációmban két ilyen módszer kidolgozását végeztem el. A szakirodalomban számos immobilizálási módszerrel találkozunk például, ahogy az a szakirodalmi áttekintésben olvasható, azonban ezek szennyvíztisztításban való alkalmazása vagy nagyon költséges, vagy a hordozó és az adalékanyagok miatt ökológiai kockázatot hordoz. A kutatásom célja olyan módszerek kidolgozása, amelyek biológiailag lebontható anyagokat használnak hordozóként, így a katalizátor elhasználódása után azok ártalmatlanítása nem okoz környezetterhelést. Ebből kifolyólag a választás a kalcium-alginátban való rögzítésre és a cellulóz-alapú membránok használatára esett. Ezekre vonatkozóan kevés információ állt rendelkezésre a kutatás kezdetekor. Az alginát egy univerzálisan használható hordozó, amelynek a

lebontása biológiailag kivitelezhető. A cellulóz-acetát (CA) hordozóként való használatának előnye, hogy egyrészt biológiailag lebontható, másrészt membránként való használatával ötvözhető a membránszeparációs eljárás az enzimkatalitikus átalakítással anélkül, hogy a nehezen lebontható mikroműanyagok kibocsátásának kockázata növekedne. Emellett fontos szempont volt, hogy olyan módszereket dolgozzak ki, amelyek magukban rejtik a keletkező, esetlegesen akár toxikus reakciótermékek eltávolításának lehetőségét is.

A kísérleti munkám célja, hogy feltérképezsem a választott két immobilizálási módszer lehetőségeit és korlátait és esetleges fejlesztési lehetőségeit. Ennek érdekében a kísérleti munkám két részre osztható:

Lakkáz immobilizálása alginát mátrixban: Az alginátban való rögzítés, számos enzim immobilizálására használható. Mivel az immobilizálási módszer alapjai a szakirodalomban már fellelhetőek (2.2.3.1 fejezet), így a kutató munka céljaként a lakkáz enzimekre való adaptálásának kidolgozását, az előállított biokatalizátor jellemzését és egy nem-szteroid gyulladáscsökkentő, a diklofenák (DCF), mint választott modell mikroszennyező lebontására való alkalmazásának vizsgálatát határoztam meg. (3.3. és 4.1 fejezet)

Lakkáz immobilizálása membránon: A kutatás első időszakában megjelent szakirodalmi adatok elemzése alapján felismertem, hogy a lakkáz által katalizált mikroszennyező átalakítás során olyan reakciótermékek keletkeznek, amelyek membránszeparációval elválaszthatóak. Ennek érdekében a lakkáz integrált membrán bioreaktorban való használatához kidolgoztam egy új immobilizálási módszert, amellyel enzim aggregátumokat hoztam létre egy mikroszűrő membrán pórusaiban. A rögzítés paramétereit a válaszfelületek módszerével optimalizáltam, majd az előállított enzimkatalitikus membránt jellemeztem. Ezt követően megvizsgáltam annak gyakorlati alkalmazhatóságát DCF lebontására. (3.4 és 4.2. fejezet)

A kutatásom eredményei elsősorban lakkáz enzimmel történő mikroszennyező lebontást kívánják segíteni, de a kidolgozott eljárás alkalmazható más lakkáz által katalizált folyamatban is pl. fenol származékok, színezékeket tartalmazó ipari szennyvizek kezelésére is.

2 Szakirodalmi áttekintés

Disszertációm szakirodalmi áttekintéseként elsőként a mikroszennyezők problémakörével és a biológiai szennyvíztisztítóknál való eltávolításukkal foglalkozom. Ezt követően bemutatom a kutatás során használt lakkáz enzim tulajdonságait, immobilizálási lehetőségeit, majd összefoglalom a mikroszennyezők szabad és immobilizált lakkázzal végzett eltávolítására vonatkozóan megjelent fontosabb publikációk eredményeit.

2.1 Mikroszennyezők problémája

Mikroszennyezők alatt olyan szennyezőanyagokat értünk, amelyek koncentrációja ng/l - µg/l tartományban van a vizsgált mintákban [18] és káros hatásúak, toxicitásukból, ellenállóképességükéből vagy bioakkumulációs tulajdonságukból adódóan [19]. A mikroszennyezők kifejezést szerves és szervesetlen szennyezőanyagokra is használják, azonban a disszertációhoz kapcsolódó kutatás során csak a szerves mikroszennyezőkkel, azon belül is egy szűkebb csoporttal, a gyógyszerhatóanyagokkal foglalkoztam.

A mikroszennyezők káros ökológiai hatásainak vizsgálata már az 1990-es évektől zajlanak [20]. A krónikus és akut toxicitásra vonatkozó adatok alátámasztják, hogy ezek a szennyezőanyagok humánegészségügyi kockázatot jelentenek, és károsak a vízi élővilágra. Egy 2004-es felmérés kimutatta, hogy a szteroid hormonok szaporodási rendellenességet okozhatnak bizonyos halaknál, már ng/l koncentráció tartományban [21]. Az ökológiai kockázatok mellett bizonyítást nyert, hogy a szennyvíztisztítóknál a folyamatos kis koncentrációjú antibiotikum terhelés hatására bizonyos baktériumok képesek voltak adaptálódni [22], ami felveti az antibiotikum rezisztens baktériumok kialakulásának lehetőségét is.

Ahogy azt 2006-ban Fent és mtsi. [23] is sürgették, hosszú távú ökotoxikológiai vizsgálatok lefolytatása szükséges, mivel az akkori felmérésben mért koncentráció tartomány bizonyos komponensek esetén (pl. DCF) közel volt ahhoz a legkisebb koncentrációhoz, amelynél a hatás már megfigyelhető (lowest observed effect concentration, LOEC érték). Egy ezzel foglalkozó tanulmány [24], ökológiai kockázatbecslésen alapulva megerősítette, hogy a folyóvizekben található számos

mikroszennyező rendkívül bioaktív és károsíthatja az ökológiai rendszereket. Laboratóriumi kísérletek során, amelyben 4 modellkomponensre (acetaminofén (APAP), venlafaxin, karbamazepin (CBZ), gemfibrozil (GFB)) vonatkozóan végeztek alacsony terheléses vizsgálatokat Zebradánióval (*Danio rerio*), kimutatták, hogy a halak számos szervrendszere károsodást szenved [25]. Ezt később populáció szinten is megállapították [26].

2.1.1 Mikroszennyezők forrásai

A mikroszennyezők számos forrásból kerülhetnek a környezetbe és az ivóvízbe (1. ábra Gyógyszermaradványok útja a környezetbe és az ivóvízbe [27]), azonban a mikroszennyezők anyagáramainak pontos meghatározásához szükséges adatok még hiányosak, mivel sok olyan forrás van, amelyre vonatkozóan ritkán végeznek csak monitoring kampányokat [27]. Mivel elsősorban a szennyvíztisztításra vonatkozóan állnak rendelkezésre adatok, ezért ezeket tekintik a legjelentősebb forrásoknak. Ennek ellenére a természetes víztestekbe kerülő összes kibocsátás akár 30-80%-áért más kibocsátók a felelősek [28].

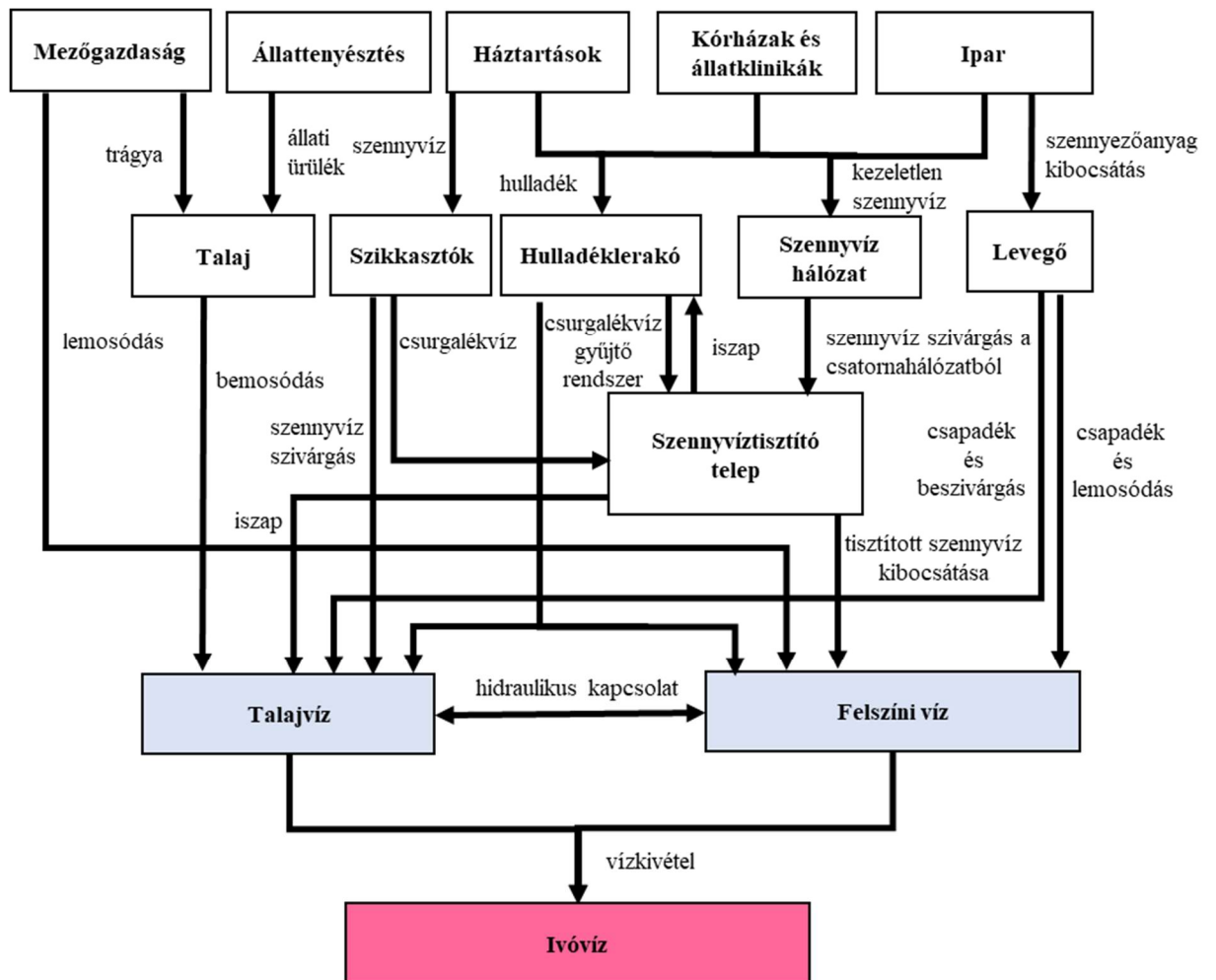
A gyógyszerhatóanyagok kibocsátásának legkézenfekvőbb forrása lehetne a gyártás során keletkező szennyvizek okozta terhelés, azonban az erre vonatkozó szigorú szabályozás és a „Good Manufacturing Practice” előírásainak köszönhetően ezek az anyagáramok gyakorlatilag elhanyagolhatóak. Bizonyos országokban azonban, ahol az erre vonatkozó előírások kevésbé szigorúak, ott jelentős emisszióval járulnak hozzá a környezetterheléshez [20].

Hasonló okokból a kórházakból kikerülő szennyvizek sem tartoznak a legnagyobb terhelést okozó források közé [20], bár a kórházakhoz hasonló pontszerű szennyező forrásokból származó kibocsátás igen változó lehet [29]. A kórházak esetén az elsődleges szennyezést a szennyvízzel együtt kikerülő antibiotikumok jelentik.

A legnagyobb forrást a lakossági gyógyszer felhasználás és a felhasználást követően keletkező hulladékok jelentik [20]. Ezek gyűjtésére szigorú jogi szabályozás van érvényben az Európai Unióban (2004/27/EC irányelv) és számos más országban is [30]. Ennek ellenére a fel nem használt gyógyszerek jelentős része nem megfelelően kerül ártalmatlanítására [31], és közvetlenül a csatornahálózatba vagy a lakossági hulladékba kerül [32]. Utóbbiak a hulladékkezelési technológiától függően, általában deponálásra kerülnek [20], ennek következtében a hulladéklerakókon a keletkező csurgalékvizek

jelentős mennyiségben tartalmaznak különböző mikroszennyezőket. Ezek nem megfelelő ártalmatlanítása esetén potenciális szennyező források alakulnak ki [33].

Az állattenyésztésben használt gyógyszerek és azok metabolitjainak egy jelentős része a trágyába kerül. Ezeknek a mezőgazdasági felhasználása során a szántóföldekről a bemosódás [34] vagy a hígtrágyák szennyvíztisztítóknál való nem megfelelő kezelése esetén jelentenek környezetterhelést [35].



1. ábra Gyógyszermaradványok útja a környezetbe és az ivóvízbe [27]

A gyógyszerhatóanyagok általában nem szívódnak fel teljesen a szervezetben. Ebből kifolyólag jelentős mennyiség átalakítás nélkül vagy metabolitként kerül a szennyvízhálózatba [36]. Mivel a kommunális szennyvíztisztítók elsősorban a szilárd anyagok, a főbb tápanyagok (nitrogén, foszfor) és a szervesanyagok eltávolítására szolgálnak, a nehezen lebontható gyógyszermaradványok egy része átalakítás nélkül halad át a technológián, ezzel szennyezve a befogadó víztestet [37]. Ennek okait a következő fejezetben fejtem ki részletesen.

2.1.2 Mikroszennyezők sorsa a hagyományos szennyvíztisztítóban

A szennyvíztisztítóban történő mikroszennyező lebontás függ az adott molekula szerkezetétől. Azok a komponensek, amelyek elektron donor csoporttal rendelkeznek (fenol-, amin-, metoxi-, fenoxi- és alkil-csoport), általában hatékonyabban eltávolíthatók, mint azok, amelyeken az erős elektron akceptor csoportok dominálnak (halogénid-, karbonil-, karboxil- és szulfonamid-csoport) [38]. Utóbbiak esetén általában alacsony (<30%) hatékonysággal történik csak a biológiai szennyvíztisztítóban [38].

Gyakran előfordul a különböző publikációkban, hogy egy-egy mikroszennyező esetén az alacsony hatásfok helyett negatív hatásfokot határoznak meg a befolyóból és az elfolyóból vett minták vizsgálata alapján. Ennek az az oka, hogy a mikroszennyezők egy része nem a mért molekula formájában, hanem konjugáltan érkezik a szennyvíztisztítóba [39]. Bár néhány esetben már ismertek ezek a molekulák, mint pl. a CBZ esetén [40], de ezek általában nem képezik a mérési kampányok részét. Ebből kifolyólag számos komponens esetén a befolyóból vett mintákhoz képest magasabb koncentrációt mértek a szennyvíztisztítót elhagyó tisztított szennyvízben. Az egyik leggyakoribb, negatív eltávolítási hatásfokkal rendelkező komponens a CBZ [39], de DCF-ra vonatkozóan is jelentek meg erre vonatkozó adatok [41].

A különböző szerves mikroszennyezők a szennyvíztisztítóba bekerülve, amennyiben nem hozzáférhetőek a mikroorganizmusok számára, sok esetben töltésüktől és hidrofób jellegüktől függően a szennyvíz iszapon adszorbeálódnak [42]. Az így megkötött komponensek az elő- és utóülepítés során kerülnek eltávolításra a szennyvízből. Ezek azonban másodlagos szennyezésként jelennek meg a fölösiszap-hasznosítási technológiákban. Ezt követően, biogáz előállítására történő hasznosítás esetén az anaerob rothasztóból kikerülő maradék iszapban [43] vagy komposztálás esetén a kész komposztban [44] csak részlegesen kerülnek átalakításra ezek a szennyezőanyagok.

Figyelembe véve, hogy a biológiai átalakítás során nem teljes az eltávolítás, ezért a tisztítást akkor tekinthetnénk megfelelőnek, ha az elfolyó toxicitása csökkenne. Ennek vizsgálata azonban összetett feladat. Ha meghatározásra került az elfolyóval távozó mikroszennyezők összetétele, ez alapján lehetőség van szerkezet-aktivitási összefüggésen (SAR) és a mennyiségi szerkezet-aktivitási összefüggésen (QSAR)

alapuló modellek használatára [45]. A toxicitás becsléséhez azonban az egyes komponensekre vonatkozóan többféle toxikológiai tesztet kellene készíteni, több szervezetet és többféle hatásmechanizmust vizsgálni. A szennyvíz komplexitásából adódóan a toxicitás vizsgálatánál nem elegendő az alkotó elemek ismerete, általában mért információra van szükség [46].

A szennyvíztisztítóknak tehát a mikroszennyezők átalakítása nem játszódik le teljesen. Így a hagyományos biológiai szennyvíztisztítási technológiákat kiegészítve negyedleges tisztításként további kezeléssel kell átvennie a szennyvíznek, ha a mikroszennyezők okozta környezeti kockázatot is csökkenteni kívánjuk.

2.2 Mikroszennyezők eltávolításának technológiai megoldásai

A mikroszennyezők szennyvízből való eltávolítására számos technológiai megoldás áll rendelkezésre. Ezen szennyezők lebontására szolgáló eljárásokat csoportosíthatjuk aszerint, hogy azok már ipari méretben alkalmazásra kerültek vagy még fejlesztési fázisban vannak. A már használt technológiák (pl. ózonos kezelés, fotolízis, adszorpció, membrán szűrés) jellemzően olyan eljárások, amelyek már korábban is valamilyen funkciót láttak el a fejlett szennyvíztisztító telepeken (pl. fertőtlenítés). Más megoldások fejlesztése még olyan fejlettségi szinten van, hogy annak költségei vagy hatékonysága még nem tette lehetővé a nagyobb léptékű alkalmazást, ilyenek pl. elektrokémiai oxidáción, fenton-kémiai oxidáción, fotokatalízisen alapuló eljárások [47].

A biológiai tisztítás során nem eltávolítható szerves és szervetlen szennyezőanyagok eltávolítására egyik legrégebb óta használt negyedleges tisztítási eljárás, a különböző adszorbenseken történő megkötés. Az adszorpcióval való sikeres mikroszennyező eltávolításra vonatkozóan számos kutatási eredmény érhető el, különösen biztatóak a különböző hulladékokból előállított adszorbensek szennyvíztisztításban való használatára vonatkozó eredmények [48]. Ezen eljárás használata esetén azonban számolni kell az adszorbens előállításának, elválasztásának és regenerálásának költségeivel, így elsősorban mint utókezelés használható más eljárásokat követően a melléktermékek eltávolítására [47].

Lehetőség van nyomáskülönbségen, illetve molekulaméretre alapuló membrános eljárások használatára is a mikroszennyezők kijutásának meggátlása érdekében [49]. A nanoszűrés és fordított-oszmózis alkalmazásával megbízható eltávolítás érhető el, azonban ezek esetén 10-20% másodlagos, töményebb szennyvíz keletkezésével kell számolni, amely további kezelést igényel [47].

Az ózonnal történő eltávolítás során mesterségesen előállított ózont juttatnak a folyadék fázisba. Az ózon, mivel vizes közegben instabil, szabadgyökök keletkezése mellett bomlik, amelyek számos szerves szennyezőanyag oxidációjára képesek. Elterjedten íz és szagrontó anyagok oxidálására és fertőtlenítésre használják [50], de mikroszennyezők eltávolítására is alkalmazható [51].

Az úgynevezett nagyhatékonyságú oxidációs eljárások használata esetén különböző módszerekkel oxidálják a szerves mikroszennyezőket [52]. Ezek az eljárások magukban foglalják többek között a fotolízist, fotokatalízist, amely során fény hatására történik az oxidáció, a vegyszeres oxidációs eljárásokat, mint pl. a fenton eljárás és annak különböző változatai, amelyek hidroxigyökök segítségével oxidálják a szerves komponenseket [53]. Ezen túl lehetőség van kavitáción alapuló ultrahangos eljárásokat, elektrokémiai oxidációt, és a mikrohullámú oxidációt is alkalmazni erre a célra [47].

2.3 Mikroszennyezők lebontása enzimekatalitikus technológiával

A mikroszennyezők enzimekkel való átalakítására során oxidoreduktáz enzimek (lakkáz, tirozináz, tormaperoxidáz, mangán-peroxidáz) segítségével kerülnek eltávolításra a szerves komponensek [54].

A doktori disszertációmban a lakkázzal foglalkoztam részletesen, mivel az oxidoreduktázok közül ez az enzim képes a legtöbb mikroszennyezőt oxidálni anélkül, hogy bármilyen külön vegyszer (pl. hidrogén-peroxid) adagolására lenne szükség szennyvíztisztításban való alkalmazás során. Az alábbiakban erre az enzimre vonatkozóan olvasható egy szakirodalmi áttekintés.

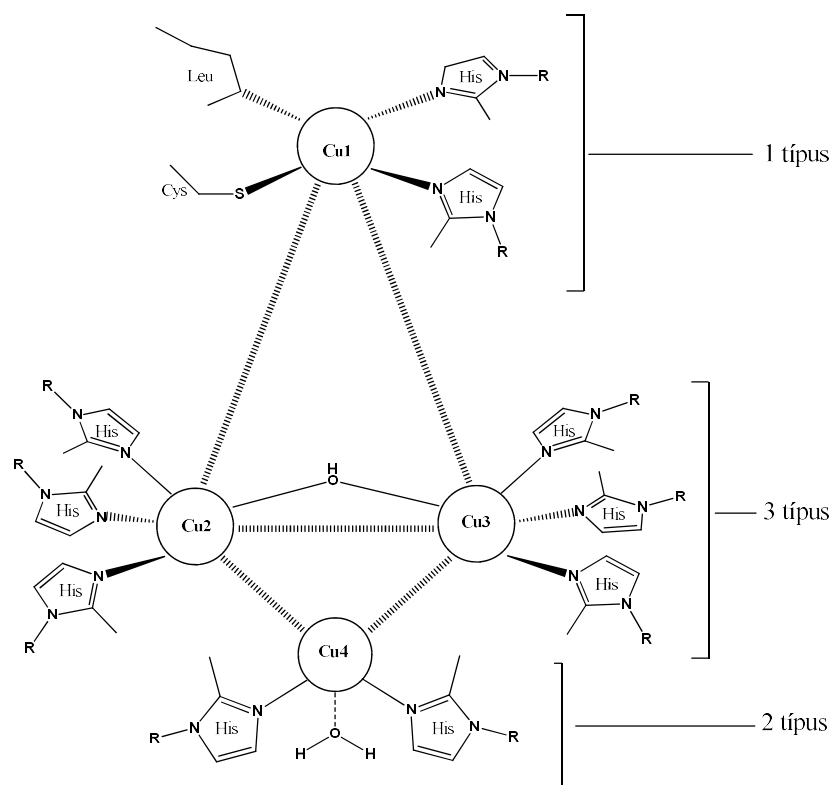
2.3.1 Lakkáz bemutatása

A lakkáz (EC 1.10.3.2), az oxidoreduktázok csoportján belül az oxigenáz enzimek csoportjába sorolható. Az oxigenázok csoportosíthatóak aszerint, hogy a lejátszódó redox reakcióban egy oxigén molekulát (monooxigenáz) vagy két oxigén molekulát (dioxigenáz) redukálnak. Általában az oxigenázok működéséhez valamilyen kofaktor, jellemzően FAD/NADH, NADPH jelenléte szükséges [55]. Az oxigenázok közül kerülnek ki a természetes folyamatokban az aromás komponenseket lebontó enzimek. Ezek képesek oxidálni számos kis-molekulatömegű szubsztrátot, mint pl. dihidroxibenzolok, aminofenol, polifenol, poliamid [56].

A lakkázok réz-tartalmú monooxigenázok, amelyek számos fenolszármazék és aromás vegyület oxidációját képesek katalizálni, de elsősorban a lignin szerkezetéhez

használatára használható [57]. Számos izoenzimét termelnek különböző baktériumok, gombák és növények [58], amelyek eltérő szerkezetűek lehetnek. A lakkáz által katalizált folyamatban egy molekula oxigénből keletkezik víz, amelyhez a remediációs felhasználás esetén szerves szennyezőanyag szolgáltat egy elektront. A talaj bioremediációban való használata során, ezek az extracelluláris enzimek képesek oxidálni a nehezen oldódó szennyezőanyagokat, illetve olyan a talajhoz kötődő komponenseket, amelyek a baktériumok számára nem hozzáférhetőek [57]. Szennyvíztisztításban való alkalmazás során elsősorban fenolszármazékok oxidációjára használható. A katalizált reakcióban a lakkáz elsősorban fenolos csoportokat támad, de természetes vagy szintetikus mediátorok alkalmazása esetén indirekt elektrontranszfer is lehetséges [59].

A lakkáz szerkezetében legalább három réz található (multiréz oxigenáz), amelyek elhelyezkedését 3 típusra szokták osztani (2. ábra). Ezek elhelyezkedésükből, koordinációjukból adódóan eltérően detektálhatóak [60]. Az első típus (T1) réznek erős adszorpciója van 600 nm körül, míg a második (T2) csak gyenge fényadszorpciót mutat, de elektron paramágneses spektroszkópián (EPR) detektálható. A harmadik típus (T3) adja a karakterisztikus kék színt, mivel erős fényelnyelése van 330 nm-en.



2. ábra Lakkáz enzimben található réz tartalmú aktív helyek [60]

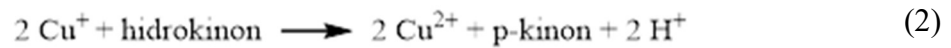
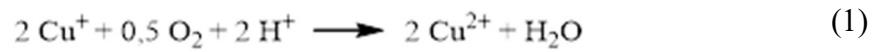
A lakkáz szerkezete függ attól, hogy milyen szervezetből származik az enzim. A kutatás során használt *Trametes versicolor*-ból származó lakkázra vonatkozóan, modellezésen alapuló részletes információk találhatóak a szakirodalomban [61], amelyek összefoglalása az alábbiakban olvasható.

A lakkáz fehérje mérete hozzávetőlegesen 70 kDa, szerkezete három domainbe rendeződik. Mind a három domain hasonló β -redő típusú architektúrával rendelkezik, amelyek kis, réz tartalmú proteinekhez kapcsolódnak. Az egyes réz atomoknak a fehérjében eltérő funkciója van [61]. A T1 helyen történik a primer oxidációja a különböző szerves komponenseknek. Az elektrosztatikus felületi feszültségek vizsgálata alapján a *Trametes versicolor*-ból származó lakkáznak negatív töltése van, izoelektromos állandója (pI) savas, értéke: 3,5. Az enzim-szubsztrát komplex modellezése alapján Piontek és mtsi. [61] számos a szerkezetből adódó következtetést vontak le. Megállapították, hogy a szubsztrátok ehhez a gyengén negatív töltésű részhez kapcsolódnak a T1 helyen. Ennek a negatív töltésnek az lehet a funkciója, hogy stabilizálja a keletkező gyökös reakcióterméket a folyamatban. A lakkáz szubsztrát szelektivitását általában ennek a kötőhelynek a geometriája és kémiai szerkezete határozza meg, továbbá a T1 helyen található réz határozza meg az enzim redox potenciálját, amely korrelációt mutat az lakkáz reaktivitásával. Az oxigén redukciója a T2/T3 helyen történik, amely két „csatornán” keresztül hozzáférhető. Az egyik a T2 helyhez, a másik a T3 helyhez vezet, amelyekben eltérően hozzáférhető a réz. Ezek a csatornák lehetővé teszik a víz áramlását a fehérje szerkezetén belül, miközben a víz hidrogén-híd kötésekkel kapcsolódik az egyes aminosavakhoz. A reakció mechanizmusa "two-sided ping-pong bi-bi", ami azt jelenti, hogy a víz molekulák már az új szubsztrát bekötése előtt távoznak az enzimről. A „kék réz oxidáz” enzimekre jellemző ilyen szerkezet teszi lehetővé a gyors hozzáférést az oxigén molekulához a reakció során.

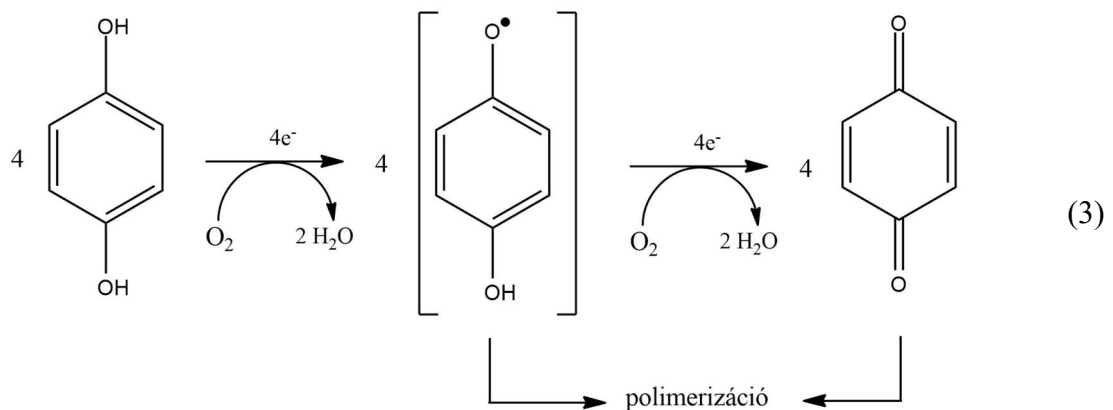
2.3.2 Enzinkatalitikus lebontás mechanizmusa

A lakkázzal végzett átalakítások reakciómechanizmusának kutatása régóta foglalkoztatja a kutatókat. 1960-ban már jelent meg publikáció [62] erre vonatkozóan, amelyben spektrofotometriás és magnetometriás módszerrel vizsgálták a lakkáz által

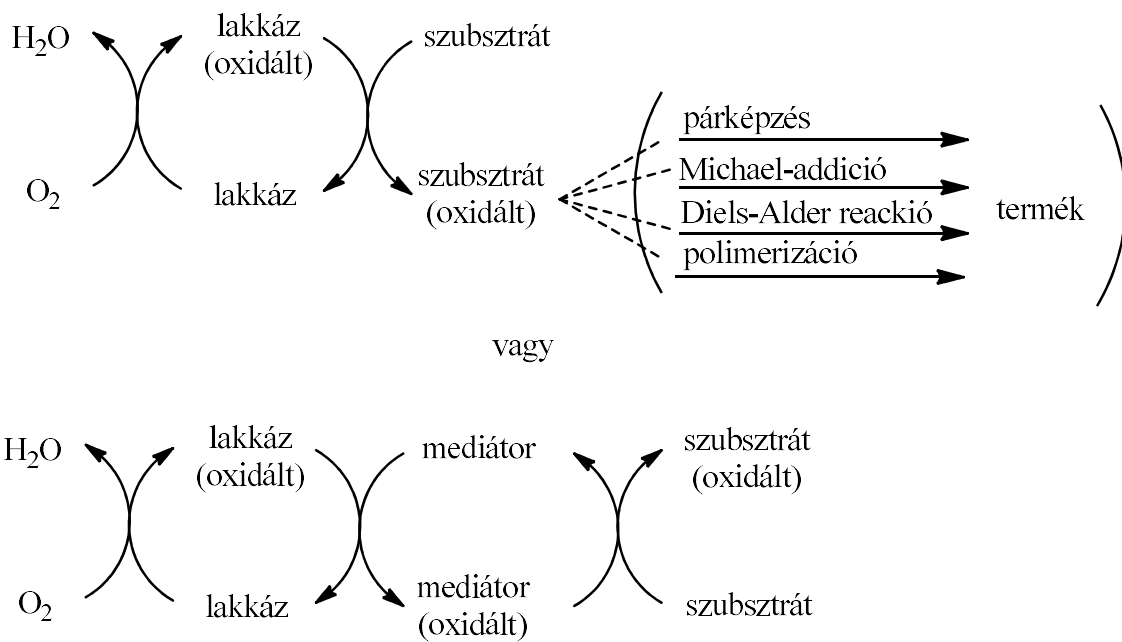
katalizált reakciót. A lejátszódó redox folyamatot az alábbi egyszerűsített reakcióegyenletekkel (1, 2) írták le [62]:



A lakkázzal történő átalakítás során az enzim a vizsgált molekula fenolos csoportjait támadja, de indirekt módon mediátorok alkalmazásával lehetőség van nem fenol-származékok oxidációjára is. A szerves mikroszennyezők, oxigenázok által katalizált lebontása nem feltétlenül vezet a molekula degradációjához [5]. A katalizált reakció, gyökös oxidáció, ahogy az az előző fejezetben már említésre került, ahogy az a (3) egyenleten is látható **Hiba! A hivatkozási forrás nem található..**



Mivel a lakkáz ipari termelésben hasznosítható zöld kémiai szintézisekben katalizátorként, ezért átfogó ismeretek állnak rendelkezésre az általa katalizált reakciók mechanizmusáról, amely lehet párképzés, Michael addíció, Diels-Alder reakció vagy polimerizáció [13].



3. ábra A lakkáz enzim által katalizált átalakítások lépései, lehetséges szintézis utak [13]

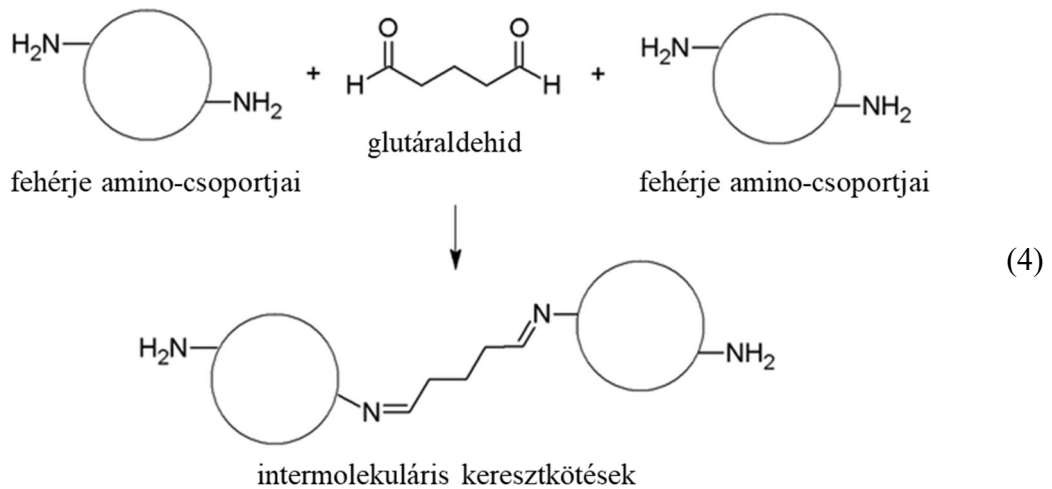
2.3.3 Lakkáz immobilizálása

A megfelelő immobilizációval növelhető a kezelés hatékonysága és az enzimek stabilitása [63]. A különböző immobilizálási módszerekkel elért eredményeket az 1. táblázatban foglaltam össze.

Az enzimek stabilizálásának és immobilizálásának elsődleges célja, hogy az enzimek élettartamát megnöveljük. A különböző alkalmazások megkövetelték azt, hogy akár extrém körülmények például magas hőmérséklet vagy szélsőséges kémhatás között is használhatóak legyenek ezek az enzimek. A szennyvíztisztítás során az extrém körülmény azonban nem a magas hőmérsékletet, sótartalmat vagy szerves oldószerek használatát jelenti. A szennyvizek kezelése során nagyobb esélye van a nyíróerők által okozott enzim denaturációnak [64] vagy a mikroorganizmusok által történő lebontásnak [65], így elsősorban ezektől kell védeni az enzimet.

Az enzim stabilitásának növelésére az immobilizáláson kívül más módszerek is használhatóak. Rögzítés nélkül pl. kémiai módosítással, enzimek tudatos tervezésével [66] vagy stabilizáló anyagok [67] hozzáadásával is növelhető az enzimek ellenállóképessége. A hordozó nélkül történő stabilizálásának az egyik legegyszerűbb módja a keresztkötések létrehozása [68]. Ennek elterjedt módszere a glutáraldehiddel történő keresztkötések kialakítása, de más két funkciós csoporttal rendelkező vegyület is használható, mint pl. 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid [69]. Általában véve

az ilyen módon történő kémiai kötések nem irányítottan, egy meghatározott helyen jönnek létre a fehérjék között, hanem egy-egy funkciós csoporton keresztül. Glutáraldehid esetében például az amin funkciós csoportokon keresztül (4. egyenlet) [70]. Ennek eredményeként nem csak intermolekuláris, hanem intramolekuláris kötések is létrejöhetnek.



Az enzim immobilizálási módszerek fejlesztése egy nagyon szerteágazó kutatási terület, bizonyos kutatók szerint csak részben tudomány, részben már inkább művészet [13], mivel a felhasználásnak megfelelő immobilizációs módszer megválasztásánál számos tényezőt kell figyelembe venni [71]:

- az enzim tűrőképességét az immobilizáláshoz használt vegyszerek és körülményekkel szemben,
- az enzim felületén elhelyezkedő funkciós csoportokat,
- a fehérje méretét,
- az enzim töltését, izoelektromos állandóját,
- az enzim polaritását, hidrofób vagy hidrofíl részeit,
- a szubsztrát és a termék enzimen belüli és enzimen kívüli transzport folyamatait.

Az immobilizálási módszerek három fő típusát különböztethetjük meg azok szerint, hogy adszorpción, kémiai keresztkötésen, csapdázáson vagy kapszulázáson alapulnak.

Az adszorpció módszerek alapja, hogy a fehérje és az adszorbens között intermolekuláris kölcsönhatások eredményeként az enzim feldúsul a szilárd hordozó felületén [71]. Ennél a módszernél kifejezetten fontos az enzim töltése és polaritása. Ennek a módszernek a használatánál általában nem elkerülhető, hogy idővel az enzimek lemosódjanak a hordozó felületéről [72]. Ez bizonyos felhasználások esetén amellet,

hogy csökkenti az átalakítás hatékonyságát, az előállított termék elszennyeződését is eredményezheti.

A kovalens rögzítés vagy keresztkötésen alapuló immobilizáció során az enzim és a hordozó felülete között vagy az enzim molekulák között, erős kémiai kötések alakulnak ki. Az ilyen jellegű rögzítéshez használt felület sokféle lehet [70]. Lehet akár a bioreaktor fala, töltetes reaktor esetén, valamilyen üvegből vagy polimerből előállított hordozó vagy akár egy membrán pórusa is.

Az enzimek közötti kötések létrehozásával különböző aggregátumok hozhatók létre. Ennek legelterjedtebb változata a keresztkötött enzim aggregátumok (CLEA) előállítása [70]. Ennek a módszernek a legfőbb előnye, hogy nem szükséges segédanyagként hordozót adni az enzimhez, ami növelné a katalizátor fajlagos tömegét, mert a kialakuló CLEA elválasztható az oldatból. Ezáltal akár nagyobb dózisban használható az enzim a reaktorban, mint hordozón történő rögzítés esetén [73].

A keresztkötéssel való rögzítés során figyelembe kell venni, hogy az enzim aktivitása csökkenhet annak függvényében, hogy hogyan történik a kötések létrehozása [73]. Az enzim érzékeny lehet a kémiai reakció során használt vegyszerekre, illetve a reakció körülményei (pH, hőmérséklet, oldószeres stb.) denaturációt okozhatnak. Emellett a kialakuló kovalens kötések megváltoztathatják az enzim három-dimenziós szerkezetét. A lejátszódó reakció során megszűnhetnek bizonyos kovalens vagy másodlagos kötések, amely a konformáció megváltozását eredményezhetik, továbbá a kialakuló új kötések rögzíthetik az enzim szerkezetét valamilyen állapotban. Ezek egyrészt ellenállóbbá teszik azt a környezeti hatásokkal szemben, másrészt azonban bizonyos enzimek esetén, amelyek pl. szubsztrát hatására változtatják a konformációjukat (szubsztrát indukált illeszkedés), elveszíthetik ezt a tulajdonságukat, aminek eredményeképpen jelentősen csökkenhet az aktivitásuk.

A harmadik csoportja az immobilizációs módszereknek a csapdázás vagy kapszulázás valamilyen polimer mátrixban. A csapdázás során az enzimet valamilyen monomerrel vagy kis molekulatömegű polimerekkel keverik össze [71], majd ezt követően a polimerizációt úgy végzik el, hogy az enzim a kialakuló polimerben rögzüljön. Az egyik legelterjedtebb módszer, az ún. sol-gel eljárás, amelyet gyakran használnak felületeken való rögzítéshez.

A csapdázáson alapuló módszereknél a legfőbb kezelendő probléma, a polimerizációhoz szükséges környezet és vegyszerek denaturáló hatásának kiküszöbölése. Emellett csökkentheti az átalakítás hatékonyságát a szubsztrát és a

termékek polimer mátrixban történő diffúziójának gátlása. Ezek következtében jelentősen csökkenhet az immobilizált enzim látszólagos aktivitása a szabad enzimhez képest.

A kapszulázás nagyon hasonló a csapdázásos módszerhez, azonban ebben az esetben az enzim a polimer mátrixban kialakított résekben, pórusokban helyezkedik el. Ilyenek pl. a micelláris polimerizációval végzett rögzítések, amelyek esetén a micellákban történik az enzim rögzítése [71]. Ennek a módszernek az előnye, hogy az így kialakított hordozókban gyakorlatilag polimer membránok választják el az enzimet a reakcióközegtől, hasonlóan a sejtfalakhoz biológiai rendszerekben. Ezek megfelelő tervezésével speciális mikrokörnyezet hozható létre az enzim körül, amely megnövelheti az enzim ellenállását a reakcióközeg pH-ja, hőmérséklete vagy a gátlást okozó szervesanyag tartalmával szemben [23].

Az ipari felhasználás elősegítése érdekében olyan módszerek kerültek kifejlesztésre, amelyek ezen módszereken alapulnak, vagy ezeket kombinálják. Ilyen például a rögzítés különböző hordozókhoz, pl. faszénhez [74], mágneses nanorészecskékhez [75], csapdázás alginát gyöngyökben [76] vagy rögzítés membránon [77].

Minden módszernek megvannak a maga előnyei és hátrányai. Például az ún. "single enzyme" nanorészecskék létrehozásával kiváló diszpergálhatóság érhető el, ami nagyban javítja a szubsztrát hozzáférését az enzimhez és az enzim stabilitását [78]. Biológiaiilag lebontható hordozók előállíthatók hulladékokból, mint pl. kókuszrostból [79], amelyek csökkenthetik az előállítás és a felhasználás utáni ártalmatlanítás költségeit. Keresztkötések kialakításán alapuló módszerek esetén, mint pl. a CLEA előállítása, intermolekuláris kötések alakulnak ki az enzimmolekulák között, amelyek nagy katalizátor sűrűséget eredményeznek, és megnövelik az enzim élettartamát és működési stabilitását. A keresztkötés megfelelő módszerének használatával növelhető a stabilitás, amellett, hogy még elfogadható mértékben csökken az enzim aktivitása [80]. A CLEA előállításának a fő problémája, hogy nehéz szabályozni az aggregátumok méretét, amely bizonytalan hatékonyságot és elválasztási problémákat okoz.

Utóbbi probléma kiküszöbölése érdekében lehetőség van az enzimeket ún. rendezett szerkezetű mezopórusos hordozókon rögzíteni [81]. Ezek az anyagok biztosítják a szubsztrát hozzáférést az enzimhez, amellett, hogy növelik a stabilitást az összeköttetésben lévő pórusok segítségével. Nguyen és mtsi. [82] egy üreges keresztkötött enzim aggregátumot állítottak elő, amelyet poliéter-szulfon membránban rögzítettek tripánkék színezék lebontása céljából.

**1. táblázat Különböző lakkáz immobilizációs módszerek alkalmazása során elért eredmények
(adaptálva saját gyűjtésből [5])**

Immobilizációs módszer	Kezelt mikroszennyező	Eredmény	Forrás
Módosított kerámia membrán	38-féle antibiotikum keveréke	A hatékony eltávolításhoz mediátor alkalmazása szükséges	[83]
	EDC-k keveréke	Az immobilizálást követően a membrán aktivitása alacsony. Az eltávolítás fő mechanizmusa az adszorpció.	
	TC	56% eltávolítás (30% szabad enzimmel) magnövekedett stabilitás	[84]
	BPA	nagy mennyiségű lakkáz megkötése a membránon	[85]
CLEA[86]	APAP	szélesebb pH profil, magnövekedett stabilitás nagyobb reakciósebesség	[87]
	APAP, MFA, CBZ	szinergikus hatás CLEA és a mikroszűrés együttes használatkor	[88]
Bárium-alginát gyöngyök	APAP	előnyösebb karakterisztika immobilizálást követően, >70% aktivitás 5 ciklus után	[86]
Akril-gyöngyök	EDC-k keveréke	az eltávolítás részben a hordozón való adszorpcióval történik.	[3]
Poliakrilnitril gyöngyök	Biszfénol származékok	80% kezdeti aktivitás megtartás 30 nap működtetés után	[89]
	NP, OP	fluidizált reaktorban való alkalmazás, 95% aktivitás 50 nap működtetés után	[90]
Porózus SiO ₂ gyöngyök	STZ, SMZ	Stabilitás növekedés magas hőmérsékleten, szélesebb pH tartományban való használat	[91]
Mágneses CLEA	13 különböző gyógyszerhatóanyag	mágneses enzim visszanyerés 20 mp alatt, 1 év tárolási stabilitás	[92]
	TC, OTC, AMP, SMZ, ERYC, TMP, CHL	46,8% aktivitás visszanyerés	[93]
Mágneses alginát gyöngyök	TCS	Aktivitás megtartása valós szennyvízben	[94]
Kitozán bevonatú mágneses nanorészecskék	CPS	99%-os eltávolítás semleges pH-n	[75]
SiO ₂ nanorészecskék	BPA	jelentősen javult az enzim stabilitása lakossági szennyvízben	[95]
	BPA, DCF	teljes eltávolítás lúgos közegben (pH=8.4)	[96]
Poliamid/kitozán nanoszálak	BPA, EE2	Nagyobb hatékonyság immobilizált enzimmel, mint szabad enzimmel.	[97]
Keresztkötött kitozán	2,4-DCPh, CP	magnövekedett aktivitás, újrahasználat 7 napon át.	[98]
PLGA nanoszálak	DCF	javított aktivitás semleges pH-n	[99]
Oxigén-funkcionált bioszén	CBZ	javított tárolási, pH és hőmérséklet stabilitás	[74]

2.3.3.1 Lakkáz immobilizálása alginát mátrixban

Az immobilizálás számos előnnyel rendelkezhet a szabad enzimhez képest [100]. Javítani tudja az enzim stabilitását extrém körülményekkel szemben (magas hőmérséklet és pH) [101], ráadásul megkönnyítheti az enzim visszatartását a reaktorban azaz a katalizátor elválasztását az elfolyótól. Például mágneses nanorészecskéken való lakkáz immobilizáció esetén mágneses elválasztással eltávolítható az enzim a kezelést követően a szennyvízből [102]. Hasonlóan könnyen elválaszthatóak azok a katalizátorok is, amelyek makro-méretű hordozón, mint pl. alginát gyöngyökben megkötve tartalmazzák a lakkázt. Ezek elválasztása egy egyszerű szűréssel lehetséges, vagy alkalmazhatóak töltetes bioreaktorban is [103].

Az alginát egy algákból előállítható poliszacharid [104], amely remek hordozó víztisztításban való használathoz [105], mivel gazdaságosan előállítható és kis egészségügyi kockázatot hordoz [106]. Utóbbit jól példázza, hogy egészségügyben is használják különböző gyógyszerhatóanyagok burkolására [107], de számos élelmiszeripari felhasználása is létezik [108]. Például kalcium-alginát gyöngyökben sikeresen immobilizáltak poligalakturonáz enzimet almalé-tisztítása céljából, amely során nem csak nőtt az enzim stabilitása, hanem még annak optimális hőmérséklete és pH függése is módosult [109].

A kalcium-alginát gyöngyök előállítását egy reverzibilis keresztkötéssel történik, amely során a kétszeresen pozitív töltésű kalcium ionok alakítanak ki kötések az α -L-guluronsav és β -D-mannuronsav láncok között [106]. Az immobilizálás során használt alginát nátrium-ionokat tartalmaz, amelyeket kalcium-klorid oldatba való csepegtetéssel lehet kalciumra cserélni [110]. Amint az alginát-gél érintkezik a kalcium-tartalmú oldattal lejátszódik a sol-gél átmenet és egy hártya keletkezik a külső felszínén [111]. Ez a hártya idővel megvastagszik, attól függően mennyi ideig vannak a gyöngyök az oldatban. A gyöngyök szerkezetének merevségét meghatározza a kalcium-klorid oldat koncentrációja, az alginát koncentrációja és a keresztkötés ideje [112].

2.3.3.2 Lakkáz immobilizálása membránon

Az enzimek membránon való immobilizációjával nagy hatékonyság érhető el, azonban ehhez nem csak a megfelelő rögzítési módszer kiválasztása és optimalizálása szükséges, hanem fontos a megfelelő hordozó megtalálása is. A membránokkal szembeni legfontosabb elvárás üzemeltetési szempontból, hogy a kezelés körülményei

között is stabil elválasztást biztosítsanak és szerkezetük stabil maradjon [113]. Ezeket az elvárásokat szerves és szervetlen membránok is képesek teljesíteni.

Membránnal integrált rendszerben, amennyiben a membrán molekulatömeg vágási értéke kisebb, mint a lakkáz molekulamérete, akkor a lakkáz a reaktorban visszatartható, ami folyamatos üzemeltetést tesz lehetővé. Az enzim stabilitásától függően akár hosszabb időn át is nagy hatékonysággal tud működni [114]. Ebben az esetben a lakkáz nem kerül kémiai rögzítésre a membránon. A kis vágási értékű ultraszűrő membránok alkalmazása azonban bizonyos felhasználási területeken, mint pl. a szennyvíztisztítás, az eltömődés miatt számos üzemeltetési problémát vet fel [115].

A membránon történő kovalens rögzítéshez sok esetben kémiai módosítani kell a membrán felületét. Ezt a műveletet „grafting”-nak nevezik a szakirodalomban [116]. A grafting során általában a felületen található hidroxilcsoportokhoz kovalens kötéssel egy olyan szerves anyagot kötnek, amely funkciós csoportjaival már képes az enzimhez kapcsolódni. Erre az egyik elterjedt megoldás szilán vegyületek használata, pontosabban organo-alkoxi-szilánoké [63]. Ezek a molekulák egyik részükön szabad metoxi- vagy etoxicsoportokkal rendelkeznek. A felület módosítása során a szilánok hidrolízisével és az azt követő kondenzációval jönnek létre a szilán és a hordozó hidroxilcsoportjai között a kötések. Az így kialakított kötőhelyeken lévő szerves funkciós csoportok tovább módosíthatók, az adott enzimhez történő kötés érdekében. Ezzel a módszerrel többek között amino- ($-NH_2$), tiol- ($-SH$), vinil- ($CH=CH_2$), karbonil- ($-CHO$) vagy halogénfunkciós ($-X$) csoporttal rendelkező kötőhelyek alakíthatóak ki.

Alternatív megoldás lehet egy vékony, enzim megkötésére alkalmas réteg létrehozása a membrán felületén. Ehhez használható például zselatin, amiből Chea és mtsi. [117] hoztak létre egy rögzítésre alkalmas réteget titánalapú kerámia membránon. A zselatinban lévő aminocsoportokhoz glutáraldehid keresztkötő használatával tudták immobilizálni a lakkázt [118]. Ezzel a módszerrel lepketaplóból (*Trametes versicolor*) nyert lakkáz kerámia membránon való rögzítésével megnövekedett hatékonyságot értek el gyógyszermaradványok átalakítása során [77], és sikeresen alkalmazták az így előállított membránt biszfenol eltávolítására is [119]. Hasonlóan kitozánból is előállítható membrán bevonat poliszulfon membránon, amelyben immobilizálható lakkáz [120].

Különböző pórusméretű (0,2 μm és 1,4 μm) membránon történő lakkáz immobilizálás alapján megállapították [116], hogy a nagyobb pórusméretnek

köszönhetően nagyobb mennyiségű lakkáz köthető meg. Ennek magyarázata az, hogy a nagyobb pórusokhoz a lakkáz könnyebben hozzáfér az immobilizálás során, így az nem csak a felületen kerül megkötésre [116].

Polimer membránból különböző adalékanyagokkal előállíthatóak kompozit membránok, amelyek jó alapot adnak a különböző kémiai immobilizációs módszereknek. Például TiO_2 poliéter-szulfon membránnal való bekeverésével megkönnyíthető a membrán funkcionálizálása [121]. Az így előállított membrán nem csak az enzim stabilitását növelte meg különböző pH értéken, de megváltoztatta a membrán hidrophil jellegét is. Hasonlóan TiO_2 -ból és polivinilidén-fluoridból (PVDF) sol-gél eljárással előállítható funkcionálizált mikroszűrő membrán [122]. A mikroszűrő membrán használatával kiküszöbölhető volt a biszfenol A (BPA) átalakítás során keletkező polimerek által okozott eltömődés.

Fontos szempont, hogy az immobilizációhoz használt membrán anyaga stabil és gazdaságosan előállítható legyen, valamint esetleges roncsolódása esetén ne okozzon környezeti kockázatot. Zhang és mtsi. [123] ezt szem előtt tartva Koji gombából (*Aspergillus oryzae*) nyert lakkázt immobilizáltak porózus geopolimeren adszorpciós módszerrel. A használt geopolimer egy szervetlen, alumínium-szilikátból képződő polimer, melynek szerkezete nagyon hasonlít a zeolitokéhoz, azonban gazdaságosabb az előállítása. Felületén található oxigén-tartalmú funkciós csoportjainak köszönhetően erős affinitást mutat a különböző fém-ionokkal szemben, amelyet kihasználva hidrogén-híd kötésekkel keresztül valósítható meg az enzim immobilizációja. Ezen a hordozón való rögzítés hatására egyrészt a lakkáz enzimek megnőtt a termikus stabilitása, másrészt kevésbé érzékeny lett a hőmérséklet és a pH ingadozásaira [123].

2.3.4 Mikroszennyezők eltávolítása

A különböző mikroszennyezők lakkázzal való átalakításának eredményeként, ahogy azt a 2.2.2. fejezetben is bemutattam, elsősorban gyökök keletkeznek, amelyek további lépésekben reagálnak el más szerves anyagokkal. Ez felveti annak a kérdését, hogy a lakkázzal történő kezelés hatására milyen termékek maradnak a reakcióelegyben és azok toxicitása kisebb-e, mint a kiindulási oldaté. Mivel a lakkázzal történő eltávolítás mechanizmusa nem mineralizáció, ezért pontosabb kifejezés lenne az átalakítás, mint az eltávolítás. Ennek részletes indoklását és a reakciótermékek toxicitására vonatkozó adatokkal való összevetését, a kutatás keretében megjelent publikációm tartalmazza [5],

így az alábbiakban elsősorban a lebontás hatékonyságára vonatkozó eredményeket foglalom össze.

2.3.4.1 Mikroszennyezők eltávolítása szabad enzimmel

Az immobilizáció nélkül, a lakkáz feloldásával végzett kísérletek eltávolítási hatékonyságát számos paraméter befolyásolja. Ilyenek például kísérletek során használt puffer pH értéke, hőmérséklete, az oldat ionerőssége. Ezek a paraméterek, amelyek meghatározzák az enzim aktivitását. A lebontás szempontjából ezen túl fontos paraméter még az alkalmazott enzim mennyisége, a reakcióidő, szubsztrát koncentráció és az oldatban jelen lévő inhibitorok, más szerves anyagok is.

Az enzim szelektivitását az adott szubsztrát molekula szerkezete és az azokon található funkciós csoportok határozzák meg [124]. A lakkáz nem mutat szelektivitást az enantiomerekkel szemben [125], de a különböző mikroszennyezők csoportosíthatóak aszerint, hogy azok molekula szerkezetében az elektron akceptor vagy elektron donor funkciós csoportok dominálnak (2. táblázat). Azok a komponensek, amelyeken az elektron donor funkciós csoportok, mint pl. a hidroxil- vagy az amin funkciós csoportok vannak többségben, általában könnyebben bonthatóak lakkázzal. Ilyen mikroszennyezők például a különböző hormonok. Az ösztrom (E1) [126], 17 β -ösztadiol (E2) [127] és 17 α -etinilösztadiol (EE2) [126] eltávolítása ebből adódóan rövid idő alatt, nagy hatékonysággal elvégezhető. Hasonlóan jól bontható a BPA is, amely esetén akár 1,5 óra alatt teljes átalakítás érhető el [89]. Ezzel ellentétben azok a molekulák, amelyek erős elektron akceptor funkciós csoporttal rendelkeznek, mint pl. halogenid-, amid-, karboxilsav-csoportok, általában kevésbé reagálnak a lakkázzal. Tipikus ilyen mikroszennyező a karbamazepin (CBZ), amelynek szerkezetében karboxamid csoport található és nehezen bontható lakkázzal [128]. Azok a nem-fenolos szervesanyagok, amelyeken az elektron akceptor csoportok dominálnak, általában csak mediátorok segítségével oxidálhatóak, kivéve a DCF és az indometacin [129].

Ahogy az a 2. táblázatban is látható, az eltávolítás hatékonyságát nem csak a szerkezet határozza meg. Még az ún. „nagy redox potenciálú” lakkáz enzimek redox potenciálja sem haladja meg a 800 mV-ot [130]. Azokat a mikroszennyezőket, amelyeknek a redox potenciálja ennél nagyobb, nem képesek a lakkázok oxidálni [130]. Ezeknek a komponenseknek az oxidációjára redox mediátorok használatával van lehetőség. A mediátorok olyan kis molekulatömegű szerves anyagok, amelyek az enzim

által könnyen oxidálhatóak, és a belőlük keletkező köztitermékek nagyon reaktívak, magas a redox potenciáljuk [131]. Ilyen mediátorok az enzimek természetes közegében is előfordulnak, ezzel elősegítve pl. a lignin lebontását [130]. A technológiai alkalmazás során lakkáz-mediátor rendszerben lehet ezeket használni. Alkalmazhatóak természetes eredetű mediátorok is, de számos szintetikus alternatíva is elérhető [132]. Ilyen természetes mediátorok például a sziringaldehid (SA), acetosziringon (AS), vanillin (VA), acetovanillin, metil-vanillin, 4-hidroxi-benzil-alkohol (HBA) és a p-cianursav (COUM) [133]. A szintetikus mediátorok közül pedig a (2,2'-azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)-at (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT), violursavat (VLA) használják erre a célra [134]. Margot és mtsi. [135] különböző lakkáz-mediátor rendszereket teszteltek, izoproturon (IPU) és szulfamethoxazol (SMZ) kezelésére. Egyik komponens sem mutatott számottevő eltávolítást a természetes mediátorok (SA, AS) használatakor, azonban az ABTS használata esetén teljes eltávolítást értek el viszonylag rövid idő alatt. Hasonlóan HBT mediátorként való használatának eredményeként jelentősen javult a ketokonazol (KCZ) [136] és az IPU [137] eltávolítás hatékonysága.

Bár a mediátorok használatával az eltávolítás hatékonysága növekszik, ezek az anyagok az elfolyóval együtt távoznak, amely ökológiai kockázatot hordoz. Szulfonamid antibiotikumok különböző mediátorokkal (VLA, HBA, SA, ABTS) történő lebontása során teljes eltávolítást érhető el, azonban az elfolyó toxicitása nagyon változó a használt mediátortól függően [138]. Ilyen szempontból a természetes mediátorok használata előnyösebb [133]. Lloret és mtsi. [139] számos gyógyszerhatóanyag (DCF, naproxén (NPX), E1, E2, EE2) lebontását vizsgálták különböző mediátorokkal és a szintetikus mediátorokhoz hasonlóan jó eltávolítási hatékonyságot értek el.

A szakirodalomban megjelent toxicitásra vonatkozó vizsgálatokkal kiegészített kutatások alapján elmondható, hogy bár a mediátorok javítják az eltávolítás hatékonyságát, az elfolyó toxicitását is növelik, ezért használatukat célszerű mellőzni szennyvíztisztításban való alkalmazás esetén. Ennek részletes, a toxicitásra vonatkozó eredmények alapján történő alátámasztását, egy publikációban fejtettem ki [5].

2. táblázat Mikroszennyezők eltávolításának hatékonysága szabad enzimmel végzett kísérletekben

Komponens	Enzim	Mediátor	Közeg	Reakció-idő	Eltávolítási hatékonyság	Forrás
Mikroszennyezők erős elektron donor csoporttal						
NP	L _{TV} (nyers)	-	szintetikus	12 h	60%	[140]
	L _{TV} (nyers)	HBT	szintetikus	6 h	80%	[140]
BPA	L _{TV}	-	szintetikus	1,5 h	100%	[89]
	L _{Cg}	HBT	szintetikus	4 h	100%	[141]
E1	L _{TV}	-	szennyvíz	1 h	~67%	[126]
E2	L _{TV}	-	szintetikus	2 h	~90%	[127]
EE2	L _{TV}	-	szennyvíz	1 h	~73%	[126]
CIPRO	L _{TV}	-	szintetikus	2,8 h	0%	[142]
	L _{TV}	SA	szintetikus	3 h	40%	[142]
Mikroszennyezők erős elektron akceptor csoporttal						
CBZ	L _{Ao}	-	szintetikus	24 h	10%	[128]
	L _{TV}	COUM	szintetikus	96 h	60%	[143]
Mikroszennyezők, amelyek elektron akceptor és donor csoporttal is rendelkeznek						
TCS	L _{TV}	-	szintetikus	6 h	100%	[144]
SMZ	L _{Ao}	-	szintetikus	24 h	9%	[128]
DCF	L _{TV}	-	szintetikus	4 h	100%	[145]
IBU	L _{TV} (nyers)	-	szintetikus	24 h	1,4%	[146]
	L _{TV} (nyers)	SA	szintetikus	24 h	11,7%	[146]
NPX	L _{TV}	-	szintetikus	24 h	95%	[147]
AMX	L _{TV}	-	szintetikus	72 h	~60%	[142]
	L _{TV}	SA	szintetikus	2,8 h	~50%	[142]

Bár szakirodalomban számos információ található az egyes termékek átalakítása során keletkező reakciótermékekre vonatkozóan, azok mechanizmusa a kezelendő reakcióközegben eltérő lehet. A szintetikus szennyvízben végzett kísérletek elsősorban pufferoldatokban lettek elvégezve, azonban a tisztítandó szennyvízben számos olyan komponens található, amelyek befolyásolják az eltávolítás hatékonyságát, a reakció mechanizmusát és az enzim stabilitását.

A szakirodalomban csak „natural organic matter”-ként (NOM) nevezett anyag, olyan természetes eredetű szerves komponenseket takar, amelyek a lakkáz által katalizált reakcióban részt vehetnek vagy inhibitorként [129] vagy akár mediátorként [137] is. A reakcióközegben lévő szervesanyagok jelentős inhibíciót okozhatnak, amennyiben olyan komponensek vannak jelen, amelyekhez nagyobb az affinitása a lakkáznak, mint az eltávolítani kívánt mikroszennyezőkhöz. Erre vonatkozóan az N,N-dietil-meta-

toluamid (DEET) esetén jelent meg publikáció, ahol a szennyvízben található fenolok csökkentették az eltávolítás hatékonyságát [129]. Valós szennyvízben való IPU lebontása esetén a kutatók pont ennek ellenkezőjéről számoltak be [137]. Összehasonlítva a citrát-pufferben végzett kísérleteket a valós szennyvízben végzettekkel, azt tapasztalták, hogy az utóbbiban nagyobb volt a reakció sebessége, amelynek oka valószínűleg, hogy ezek a szerves anyagok, mint természetes mediátorok vesznek részt a reakcióban.

Bár a lakkázzal végzett átalakítás mechanizmusa általában gyökös polimerizáció (lásd 2.2.3. fejezet), az oligomerek előállítása mesterséges körülmények között, szintetikus oldatokban érhető el [148], a valós szennyvízben lévő szerves anyagokkal való összekapcsolódás ezt a folyamatot azonban gátolja [149], és számos más reakciótermék keletkezik. Az E2 felszíni vizekben végzett átalakításának vizsgálata során, a NOM jelenléte részben gátolta az E2 molekulák összekapcsolódásából létrejövő termékek képződését [150]. Hasonlóan a huminsav jelenléte gátolta triklozán (TCS) átalakítás esetén az eltávolítani kívánt komponensek összekapcsolódását, ezáltal módosítva a reakció mechanizmusát [151]. Ez is azonban eltérő lehet az egyes mikroszennyezőknél. Az APAP szennyvíztisztító elfolyójából vett mintákban való lebontásának vizsgálata alapján elsősorban oligomerek képződéséről számoltak be [87].

2.3.4.2 Mikroszennyezők eltávolítása immobilizált enzimmel

Mint ahogy azt a 2.2.3 fejezetben már bemutattam, az immobilizálási módszerek elsődleges célja, hogy javítsa a lakkáz élettartamát, stabilitását, elősegítse a reaktorban való visszatartását, esetleg regenerálását. A mikroszennyezők lebontására történő felhasználás esetén ezeknek kiemelten nagy szerepe van a gazdaságos megvalósítás érdekében [152].

Lakkáz enzim immobilizálására és annak mikroszennyezők lebontására való felbontására számos cikk jelent meg a szakirodalomban. Ezek a 2.2.3 fejezetben említett immobilizációs módszerek jelentős részét felölelik (3. táblázat).

3. táblázat Immobilizált enzimmel végzett lebontások eredményei

Immobilizációs módszer	Hordozó	Mikro-szennyező	Reakcióidő	Eltávolítási hatékonyság	Forrás
Adszorpció	nanoszén	CBZ	24 h	83-86%	[74]
	szilícium nanorészecskék	BPA	24 h	~100%	[153]
Fizikai rögzítés	alginátban	APAP	4 h	94 %	[86]
	mágneses alginát	TC	8 h	89,6%	[94]
	szivacsos biopolimer	BPA	24 h	~100%	[154]
Kémia rögzítés	aktivált poliamid/kitozán nanoszálak	BPA, EE2	6 h	BPA: 8%, EE2: 4%	[155]
	poliakrilnitril gyöngyök	NP, OP	1,5 h	100%	[156]
	Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ -DTPA nanokompozit	APAP, DCF	18h	APAP: 95%, DCF: 85%	[157]
Keresztkötés	mágneses nanorészecskék	CPS	12 h	99%	[75]
	szilanizált nanorészecskék	BPA	2 h	~75%	[95]
	mágneses CLEA	TC, OTC, AMP, SMZ, ERYC, TMP, CHL	48 h	TC: ~65%, OTC: ~60%, AMP ~35%, SMZ: ~27% ERYC ~29%. CHL: ~5% TMP: ~1%	[93]
	zselatin bevonatú membrán	TC	24 h	30%	[77]
	mikroszűrő membrán	BPA	24 h	~100%	[119]

Az adszorpción alapuló módszerek esetén népszerűek a különböző hulladékból pl. mezőgazdasági hulladékból előállított hordozók, amellyel nem csak nagy hatékonysággal távolíthatóak el a mikroszennyezők, hanem csökkenthetőek is a kezelés költségei. Naghdi és mtsi. [74] pirolízissel és őrléssel fenyőfa hulladékból állítottak elő nanoszén, amelyet funkcionálisítottak, majd azon lakkázt kötöttek meg. Az előállított katalizátorral hatékonyan távolítottak el CBZ-t vizes mintákból és kezelt szennyvízből egyaránt. Ebben az esetben a nanoszén adszorpció hatása is jelentősen hozzájárult az eltávolításhoz. BPA eltávolítása során Gassara és mtsi. [158] ehhez hasonlóan nagyobb hatékonyságot értek el, mint szabad enzimek használata esetén lignolitikus enzimek kapszulázással végzett immobilizációját követően.

A nanorészecskék hordozóként való használata elősegítheti az enzim diszperzióját a kezelendő oldatban, amely növelheti a hatékonyságot. BPA lebontására szilícium-dioxid alapú nanorészecskéken immobilizáltak lakkázt, amellyel megfelelő dózis mellett akár 8,7-es pH értékű közegben is közel teljes eltávolítást tudtak elérni [153].

A nanorészecskék használatával szembeni legfőbb kritika, hogy a szennyvíztisztítóból való kikerülésük esetén ökológiai problémákat okozhatnak [159]. Ennek elkerülése érdekében mágneses leválasztásra alkalmas, ún. mágneses nanorészecskéken való lakkáz rögzítés is lehetséges. Sikeresen alkalmaztak ilyen mágneses részecskéket például klórpírifosz (CPS) eltávolítására [75]. A mágneses részecskék kombinálhatóak más módszerekkel is, pl. CLEA létrehozásával [93] vagy csapdázással [94].

A kémiai kötésekben alapuló immobilizálási módszerek számos előnyös tulajdonságú hordozón való rögzítést tesznek lehetővé. Kiváló eredményeket értek el poliakrilnitril gyöngyökön való rögzítéssel nonil-fenol (NP) és oktilfenol (OP) lebontása során [156]. Különböző kompozit anyagokból létrehozott hordozók szintén előnyös tulajdonságokkal ruházhatják fel a lakkázt. Például poliamidból és kitozánból készített kompoziton rögzíthető lakkáz, amely BPA és EE2 lebontására való használata során a szabad enzimmél nagyobb eltávolítást értek el [155]. A zselatin bevonat készítése kerámia membránon lehetővé teszi a membrán bioreaktorban történő folyamatos használatát [77].

Az alginát mátrixban való csapdázással előállított katalizátor egyik legfőbb előnye, hogy az enzimes átalakítás mellett lehetővé teszi a lebontani kívánt komponensek adszorpcióját is [160]. Az alginátban csapdázott lakkázt sikeresen tesztelték textilipari színezékek [161] és BPA [162] átalakítására.

Bárium-alginátban csapdázással immobilizált lakkázzal, 94%-os APAP eltávolítást értek el vizes oldatban, valamint az immobilizálás hatására magasabb aktivitást mértek semleges körüli pH értéken [86]. Továbbá az enzimkinetikai vizsgálatok során kapott eredmények a szubsztráthoz való affinitás növekedésére utaltak.

Lakkáz alginátban való csapdázása mágneses részecskékkel együtt nemcsak lehetővé tette a mágneses tér segítségével történő visszanyerést és növelte a katalizátor stabilitását szennyvízben, hanem hatékonyan bizonyult TC eltávolítására is valós szennyvízben [94].

A membránon való immobilizálás lehetővé teszi az enzimkatalitikus reakciók és az enzim elválasztásának integrálását. Az így kialakított rendszereket enzimatikus

membránreaktoroknak (EMR) nevezzük, amelyekben az enzim stabilitásának növekedése mellett hosszabb ideig valósítható meg a tisztítás folyamatos üzemben.

A lakkáz által katalizált reakciók membránszeparációval való integrálásával, egy lakkáz visszatartására alkalmas 10 kDa-os vágási értékű poliéter-szulfon (PES) membránnal, szennyvíz elfolyóban mindössze 80 U/l aktivitás fenntartásával, 100 óra alatt folyamatos üzemben hatékonyan tudtak különböző ösztrogéneket eltávolítani (80-92%) [163]. Hasonló rendszerrel végzett kísérletben, 30 különböző mikroszennyező lebontása során egy gél réteg kialakulását írták le, amelyben enzimkatalitikus átalakítás nélkül is megkötődnek a mikroszennyezők [164].

A membránon való immobilizálás esetén kombinálható a lakkázzal végzett lebontás adszorpcióval is. Poliakrilnitril membránon elektro-szálképzés (angolul: electrospinning) segítségével bioszenet csapdáztak [165]. Az így előállított membránon az enzimkatalitikus eltávolítást kiegészítette az aktív szénen való adszorpció, amellyel diklofenákot 72,7%-os, CTC-t 63,3%-os, CBZ-t 48,6%-os hatékonysággal tudtak eltávolítani 8 óra alatt. A kutatók az aktív szén kötőhelyeinek regenerálódását tapasztalták, amelynek okát a megkötött komponensek lakkázzal való lebontásával magyarázták.

Hasonlóan jó eredményeket értek el egy olyan rendszerben, ahol kereszt kötött karbon-nanocsövekből készítették bevonatot egy polimer membránon [166]. Az így előállított EMR nem csak nagy hatékonysággal volt képes átalakítani a vizsgált 5 különböző mikroszennyezőt, de a reverzibilis fizikai adszorpciós rögzítésnek köszönhetően könnyen regenerálható volt a bevonat a lakkáz inaktiválódását követően.

Az enzim stabilitásának növekedését jól példázza, hogy kerámia membránon létrehozott zselatin rétegben rögzített lakkázzal 10 napon át 56%-os TC eltávolítási hatékonyságot értek el [77]. Az így kapott eredmények alapján matematikai modell is készült, amely segítségével megállapították, hogy az így kidolgozott eljárással kaszkád membrán reaktor rendszerrel lehet elfogadható tisztítást elérni a különböző lakossági, kórházi vagy előkezelt ipari szennyvizek kezelése során [118].

A membránon való immobilizáláskor fontos paraméter a megkötött enzim mennyisége, amelyet fajlagos enzim aktivitással, U/cm²-ban szoktak kifejezni. Az enzim aktivitásának egységét (U) cikkenként sokféle módon definiálták, mivel számos szubsztráttal (ABTS, katekol, gvajakol) és körülmény között történik a meghatározása, ami megnehezíti a különböző eljárások összehasonlítását [5]. A definíciótól függetlenül ennek a fajlagos értéknek maximalizálására célszerű törekedni [119], mivel ez

közvetlen kapcsolatban van a membránon való átáramlás közben lejátszódó reakció sebességére [118]. Barrios-Estrada és mtsi. [119] különböző forrásból származó lakkázok kerámia membránon való rögzítését követően vizsgálták a BPA lebontását. Megállapították, hogy a ~620 U/l lakkáz immobilizálásával, optimális körülmények között 79-204 $\mu\text{mol}/\text{min}$ lebontási sebesség érhető el, a használt lakkáz forrásától függően. Mikroszűrő membránon (pórusátmérő 1,4 μm) való lakkáz rögzítéssel sikeresen távolítottak el BPA-t [165] és TC-t [118].

Az átalakítás sebességének növelésére, ahogy a szabad enzimek használata esetén is, lehetőség van mediátorok alkalmazására. Guo és mtsi. [167] SA hozzáadásával vizsgálták folyamatos üzemű enzimes membrán reaktorban 31 különböző mikroszennyező lebontását. Megállapították, hogy kis mennyiségű mediátor hatására nő az eltávolítás sebessége, de bizonyos érték felett ez számottevő toxicitás növekedést is eredményez, hasonlóan a szabad enzimek mediátorokkal való használathoz.

A különböző immobilizálási módszerek nagyban növelni tudták az enzim stabilitását, és megfelelő mennyiségben alkalmazva hatékonyan tudták átalakítani a vizsgálat mikroszennyezőket, azonban nyitott kérdés marad a keletkező reakciótermékek eltávolítása. Ezen termékek eltávolítására célszerű lenne olyan immobilizálási módszereket kidolgozni, amelyek képesek ezen probléma megoldására is. Ennek egyik megoldása lehetne az adszorpción alapuló termék eltávolítás. Az alginátban való csapdázáskor például a keletkező reakciótermékek eltérő diffúziós sebességgel tudnak távozni a gyöngyből, mint ahogy a kiindulási komponens bejutott, így a termékek is csapdázódhatnak az alginátban. Ebből a hipotézisből kiindulva vizsgáltam az alginát gyöngyökben immobilizált lakkázzal végzett átalakításokat. Hasonlóan jól alkalmazhatóak a reakciótermékek eltávolítására a membránszeparációs eljárások, ezért a második immobilizálási módszer egy membrános rendszerben használható katalizátor létrehozása céljából történt.

3 Kísérleti rész

A laboratóriumi kísérletek a célkitűzésnek megfelelő két részre oszthatóak. Ezek módszertanának bemutatása a Felhasznált anyagokra vonatkozó alfejezetet követően három szakaszra bontva olvashatók. Az első szakaszban az általánosan használt módszerek, majd a második két szakaszban az alginát és a membránon való immobilizációra vonatkozó kísérletek leírása található elkülönítve.

3.1 Felhasznált anyagok

3.1.1 Enzim

A kísérleteimet egy kereskedelmi forgalomban kapható oxidoreduktáz enzimmel, a lakkázzal végeztem. A felhasznált lakkázt *Trametes versicolor* gombából nyerték ki. A kiválasztás során fontos szempont volt, hogy különböző forrásból származó lakkázok közül az enzim rendelkezik a legnagyobb redox potenciállal, ami a többi lakkázhoz képest több szubsztrát oxidációját teszi lehetővé. A vizsgálatokhoz használt lakkáz enzimet a Sigma-Aldrich-től szereztem be. A gyártó által megadott fajlagos (katekol) aktivitása: >0,5 U/mg. A kísérletekhez használt enzim aktivitása az adott csomagra vonatkozóan kiállított tanúsítvány alapján változó, azonban a kutatás különálló részeiben végig azonos fajlagos aktivitású enzimmel dolgoztam. Az algináttal végzett kísérletek során használt lakkáz tanúsítvány szerinti aktivitása 0,9 U/mg, míg a membránon való immobilizációhoz használt csomag 0,84 U/mg aktivitású lakkázt tartalmazott.

3.1.2 Membrán

Az enzim rögzítéséhez 0,1 µm-es névleges pórusátmérőjű hidrophil poliéter-szulfon (PES) és CA mikroszűrő síklap membránt használtam. A membránok gyártó által megadott specifikációi a 4. táblázatban láthatóak.

4. táblázat A kísérletekhez használt membrán tulajdonságai [168]

Anyaga	Hidrofil CA	Hidrofil PES
Gyártó	Hawach	Hawach
Névleges pórus méret	0,1 μm	0,1 μm
Térfogatáram:	>10 ml/min/cm ² (1 bar, 0,22 μm , 23°C)	>15 ml/min/cm ² (1 bar, 0,22 μm , 23°C)
Fehérje megkötő kapacitás	0,15 mg/cm ²	(nincs adat)
Vastagság	90 – 110 μm	110 – 140 μm
pH tartomány	3,5 – 8	1 - 14
Maximális nyomás	4,2 bar (23°C), 1,5 bar (85°C)	4,2 bar (23°C), 1,5 bar (85°C)

3.1.3 További vegyszerek

Az aktivitás méréshez és a lebontási kísérletekhez a reakcióközeg McIlvain pufferoldat volt, amelynek az elkészítéséhez analitikai minőségű nátrium-foszfátot és citromsavat használtam. Ezen vegyszerek a VWR Internationaltól lettek beszerezve.

Az analitikai vizsgálatok során és a lakkáz által katalizált reakció megállításához HPLC tisztaságú metanolt használtam, amely a Sigma-Aldrichtől került beszerzésre.

Az immobilizálási kísérletekhez használt vegyszerek mind analitikai tisztaságúak voltak, kivéve a nátrium-alginát, amely élelmiszeripari minőségű. Ezen vegyszerek a Sigma-Aldrichtől (ABTS, acetonitril, Bradford reagens), a Molar Chemicalstól (etil-acetát, nátrium-hidroxid), illetve a VWR Internataltól (glutáraldehid, sósav) kerültek beszerzésre.

A lebontási kísérletekhez használt mikroszennyező, a diklofenák analitikai tisztaságúak. Az analitikai vizsgálatokhoz a kalibrálók oldatok elkészítéséhez standard minőségű vegyszert használtam, amely szintén a Sigma-Aldrichtől származik.

3.2 Vizsgálati módszerek

3.2.1 Enzim aktivitás mérése

Az enzim aktivitásának meghatározásához egy, a szakirodalomban elterjedten használt szubsztrátot, az ABTS-t használtam. A kutatás során használt lakkáz aktivitás egységét az alábbiak szerint definiáltam: egy egység (U) aktivitásnak felel meg az a mennyiségű enzim, amely 1 μM ABTS szubsztrát átalakítására képes percnként (pH=5) pufferoldatban, szobahőmérsékleten (22 °C).

Oldott enzim aktivitásának meghatározásához egy küvettába 1,2 ml (pH=5) puffer oldathoz adtam 0,15 ml 0,5 mg/ml-es koncentrációjú ABTS oldatot, majd 0,15 ml lakkáz tartalmú oldatot. Ezt követően szobahőmérsékleten rögzítettem az abszorbancia változását 420 nm-en 10 másodpercenként Macherey Nagel Nanocolor UV-Vis spektrofotométer segítségével. A küvettába pipettázott minta mennyiségét úgy választottam meg, hogy az aktivitás mérés során a reakciósebességet ne a szubsztrát mennyisége, hanem az enzim koncentrációja határozza meg.

A rögzített adatokból meghatároztam a kezdeti reakciósebességet. Ehhez a mérés kezdetén kapott lineárisan növekvő abszorbanciát mutató tartományra illeszttem egy egyenest, majd annak meredekségéből számoltam az aktivitást a reakciótermék extinkciós koefficiensének (36000 $1/\text{M}\cdot\text{cm}$ [169]) felhasználásával (5). Az illesztéshez csak azon adatok kerültek felhasználásra, amelyeket a fotométer 1,000 abszorbancia érték alatt rögzített, mivel efelett a készülék pontossága lényegesen kisebb. Ennek megfelelő az aktivitás mérésének időtartama 0,5 – 15 perc között változott.

$$A \text{ (U/l)} = \frac{\Delta E \cdot V_t}{\varepsilon \cdot b \cdot V_m} \quad (5)$$

Ahol:

- A: lakkáz aktivitása [U/l]
- ΔE : abszorbancia változása 420 nm-en 1 perc alatt
- V_t és V_m : a teljes és az enzimtartalmú minta térfogata [l]
- ε : moláris extinkciós koefficiens [$1/\text{M}\cdot\text{cm}$]
- b: használt küvettában a fény úthossza [cm]

3.2.2 Diklofenák koncentrációjának meghatározása

A vizsgálatok során a diklofenák koncentrációjának meghatározásához nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás módszert (HPLC) használtam. A mérendő komponensek vizes oldata a koncentrációtól függően a mérést megelőzően szilárd-fázisú extrakciós dúsításon esett át.

A szilárd fázisú extrakcióval való mintaelőkészítést a JRC jelentésben [170] ajánlottaknak megfelelően végeztem el. Ehhez Oasis HLB (200 mg / 6 cm²) cartridge-eken elsőként 5 ml etil-acetátot, 5 ml metanolt, majd háromszor 5 ml ultratiszta vizet engedtem át ~1 ml/perc-es térfogatárammal. Ezt követően 25 ml DCF tartalmú mintát engedtem át 5 ml/perces térfogatárammal. A minta feladását követően az 5 percig szűrt levegőt szívattam át, ezzel eltávolítva a maradék folyadékot a töltetről. A szárítást követően a megkötött komponenseket 10 ml etil-acetáttal eluáltam, majd szűrt levegő segítségével szobahőmérsékleten bepároltam. A bepárlást követően a kémcső alján összegyűlő sókat 2,5 ml metanolban oldottam vissza a HPLC mérés előtt.

A mikroszennyező tartalmú mintákat UV-Vis detektorral ellátott HPLC rendszer segítségével vizsgáltam meg (YL9000 és Hitachi D-7000). A vizsgálatokhoz fordított fázisú C18-as kolonnát használtam (Zorbax SB-Aq, 4,6 x 150 mm, 5 µm). A mérésekhez 10 µl mintát injektáltam 30°C-on. A vizsgálatához gradiens elúciót alkalmaztam, az eluens metanol és 0,1 % trifluor-ecetsavat (TFA) elegye volt. A vizsgálatokhoz az alábbi program szerint történt az elúció 1 ml/perc térfogatárammal:

0-1 perc: 60:40 TFA:metanol,

1-5 perc: 0:100: TFA:metanol, fokozatos beállítással

5-8 perc: 100% metanol

8-10 perc: 60:40 TFA:metanol fokozatos beállítással

10-15 perc: 60:40 TFA:metanol

A vizsgálati módszer validálása, valamint a kalibráló egyenes felvétele metanolban feloldott HPLC tisztaságú standard vegyszerekkel történt [171].

3.2.3 Fehérjék koncentrációjának meghatározása

Az immobilizációt követően a megkötött enzim mennyiségét fehérje koncentrációban is megadtam. Ehhez a lakkáz tartalmú mintából 800 µl-hez adtam 200

µl Bradford reagenst, majd 5 perc várakozás után mértem az oldat abszorbanciáját 595 nm-en. Az enzim koncentrációjának meghatározásához a kalibráló oldatsorozatot lakkáz enzimmel készítettem.

3.3 Lakkáz immobilizálása alginát mátrixban

3.3.1 Lakkáz rögzítésének menete

Az alginát mátrixban való rögzítés alapját a Daasi és mtsi. [110] által 2014-ben publikált módszer adta, azonban ezen néhány módosítást hajtottam végre. Az immobilizálás során 4,5 ml 2 m/m %-os nátrium-alginátot kevertem össze 0,5 ml 1 mg/ml lakkáz oldattal. A keveréket bürettából adtam cseppenként 20 mM koncentrációjú CaCl₂ oldathoz. A gyöngyök az oldattal érintkezve azonnal elkezdtek megszilárdulni. A gyöngyöket 1 órán át hagytam a kalcium tartalmú oldatban, majd leszűrtem szűrőpapírral, átmostam 20 ml ultratiszta vízzel és lemértem a nedves tömegét. Az immobilizálási hatékonyság meghatározása érdekében a gyöngyök aktivitása mellett mértem a CaCl₂ oldat (A_{CaCl_2}) és a mosáshoz használt ultratiszta víz aktivitását ($A_{mosóvíz}$) is.

Az immobilizálás hatékonyságát a mért aktivitás értékekből a 6. egyenlettel számoltam.

$$\eta (\%) = \frac{A_{kezdeti} - A_{CaCl_2} - A_{mosóvíz}}{A_{kezdeti}} \cdot 100 \quad (6)$$

3.3.2 Előállított alginát gyöngyök karakterizációja

A gyöngyök tömegének meghatározása analitikai mérlegen történt. A szárazanyag tartalom meghatározásához a gyöngyöket exsikkátorban, 24 óra alatt szárítottam ki. A szárítás szobahőmérsékleten végeztem, elkerülendő az alginát magasabb hőmérsékleten bekövetkező termikus bomlását [177].

3.3.2.1 Alginátban rögzített lakkáz aktivitásának mérése

Az alginátban történő immobilizálást követően a lakkáz aktivitásának mérése a 3.2.1 fejezetben leírtak szerint történt ABTS szubsztrát felhasználásával. Azzal a különbséggel, hogy szabad enzimmel ellentétben az előállított gyöngyök aktivitásának meghatározásához egy 10 ml-es küvettába helyeztem adott mennyiségű gyöngyöt, majd

lemértem azok tömegét. Ezt követően került hozzáadásra a puffer (4 ml) és a szubsztrát (1 ml).

Az aktivitás mérés során 5-15 perc alapján számított reakciósebességekből és a mért darabszámból és tömegből a fajlagos aktivitást U/mg és U/db mértékegységben adtam meg, három ismétlés átlagként.

3.3.2.2 A pH függés meghatározása

Az alginát mátrixban immobilizált lakkáz aktivitása függ a reakcióközeg pH értékétől. Ennek meghatározása érdekében különböző pH értékű pufferoldatokban mértem az enzim aktivitását a 3.3.2.1 fejezetben leírtak szerint.

A szabad enzimmel meghatározott reakciósebesség értékeket összevettem az alginátban immobilizált lakkázra meghatározott értékekkel. Az aktivitások abszolút számértéke nagyságrendileg eltér, ezért a pH hatásának vizsgálata során az összehasonlítás alapját a relatív aktivitás adta.

3.3.2.3 Hőmérsékletfüggés meghatározása

A szabad lakkáz aktivitása növekszik a vizsgált tartományban a hőmérséklet emelésével [173]. Az alginátban való immobilizálás hatására azonban nem csak az enzim határozza meg a szubsztrát átalakításának sebességét, hanem közrejátszik a mátrixban lejátszódó transzport folyamatok sebessége is.

Ennek vizsgálata érdekében a szennyvíztisztításban előforduló 20 – 35°C közötti hőmérséklet tartományon végeztem méréseket. Ehhez az aktivitás mérése alatt a gyöngyöket és az oldatot temperáltam, termosztát szekrény segítségével. Az összehasonlítás során a relatív aktivitás értékeket használtam.

3.3.2.4 Tárolási stabilitás meghatározása

Az immobilizált lakkáz enzim tárolás közben történő aktivitás csökkenésének meghatározásához a gyöngyöket 20°C-os ultratiszta vízben tároltam. 24 óránként az aktivitás méréshez szükséges mennyiséget eltávolítottam az oldatból, majd megmértem az aktivitását a 3.3.2.1 fejezetben leírtak szerint.

A vizsgálatok során a kiindulási ($A_{kezdeti}$) és az adott idő (t) után mért aktivitás értékek (A_t) alapján exponenciális csökkenési egyenletet (7) illesztettem és meghatároztam a csökkenési állandó (k_d) értékét.

$$A_t = A_{\text{kezdeti}} \cdot e^{-k_d t} \quad (7)$$

3.3.3 Alginátban immobilizált enzim újrahazsnálatának vizsgálata

A lakkáz tartalmú alginát gyöngyök aktivitásának meghatározása után (5 perc), a gyöngyök szűréssel elválasztásra kerültek az oldatból, majd 5 ml desztillált vízzel mostam azokat. A kísérletet 7 további ilyen ciklusban ismételt meg. A szűrést és mosást követően a gyöngyökről fényképes dokumentáció készült, amely alapján meghatároztam a gyöngyök méretének változását. Ezt összevettem az aktivitásban tapasztalt változásokkal.

3.3.4 Kinetikai paraméterek meghatározása ABTS szubsztráttal

A szubsztrát koncentrációjának hatását a különböző koncentrációjú (23, 46, 91, 228, 456, 911 μM) ABTS oldat átalakításával vizsgáltam. Ehhez a gyöngyökből 10-10 darabot pH=5 pufferoldatba raktam, majd mértem az oldatok abszorbanciájának változását. Ez alapján a keletkező reakciótermék extinkciós koefficiensének segítségével, meghatároztam a koncentráció változását és a kezdeti reakció sebességét. A kapott reakciósebesség értékek alapján és a szubsztrát koncentrációjának függvényében lineáris regresszióval meghatároztam a Michaelis-Menten (K_M) állandó és maximális sebesség (v_{max}) értékeit a 8. számú egyenletből.

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Ahol:

[P]: reakcióban keletkező ABTS gyök koncentrációja [μM]

[S]: méréshez felhasznált kiindulási ABTS koncentrációja

t: időegység [perc]

v_{max} : maximális reakciósebesség [$\mu\text{M}/\text{perc}$]

K_M : Michaelis-Menten állandó [μM]

3.3.5 Diklofenák lebontása alginátban immobilizált lakkáz enzimmel

Az előállított gyöngyökkel 50 ml-es térfogatban pH=5 pufferoldatban végeztem lebontási kísérleteket 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kezdeti diklofenák koncentráció beállítás mellett. Ehhez az oldat hőmérsékletét 20°C-on tartottam, enyhe keverés mellett. A szabad és

rögzített lakkáz hatékonyságának összehasonlítása érdekében a 2,5 g lakkáz tartalmú alginát gyöngyöt használtam a kísérletben, amely enzim tartalma megfelel 0,5 ml 1,0 mg/ml lakkáz oldatnak. Az adszorpciós hatás meghatározása érdekében a kísérletet azonos mennyiségű, lakkáz nem tartalmazó alginát gyönggyel is elvégeztem.

A reakcióelegyből adott időközönként mintát vettem. Az így vett minták diklofenák koncentrációját HPLC-UV használatával a 3.2.2 fejezetben leírtak szerint határoztam meg, majd összehasonlítottam a kontroll kísérlet és szabad enzimmel végzett kísérletek eredményeivel.

3.4 Lakkáz immobilizálása membránon

3.4.1 Membrán kiválasztása

A membrán anyagának kiválasztásához két különböző anyagú mikroszűrő membránon végeztem adszorpciós kísérletet. A kísérletekhez poliéter-szulfon (PES) és cellulóz-acetát (CA) membránt használtam.

A lakkáz megkötődését az oldatból egy protein adszorpcióra kifejlesztett módszerrel vizsgáltam [174], amely alapja az enzim oldatban mért aktivitásának változása. Ehhez a membránokat parafilmmel lezárt üvegedényzetben, lakkáz oldatba merítettem, majd rázópad segítségével enyhén (100 RPM) kevertetem. A vizsgálat során 15 ml pH=5 pufferben készített 1 mg/ml koncentrációjú lakkáz oldatba helyeztem 1-1 db 47 mm-es átmérőjű membránt (PES, CA), majd rázópadon való kevertetés mellett, adott időközönként (0, 30, 60, 120, 180 perc) mintát vettem az oldatból és mértem a lakkáz aktivitásának változását.

3.4.2 Lakkáz rögzítésének menete

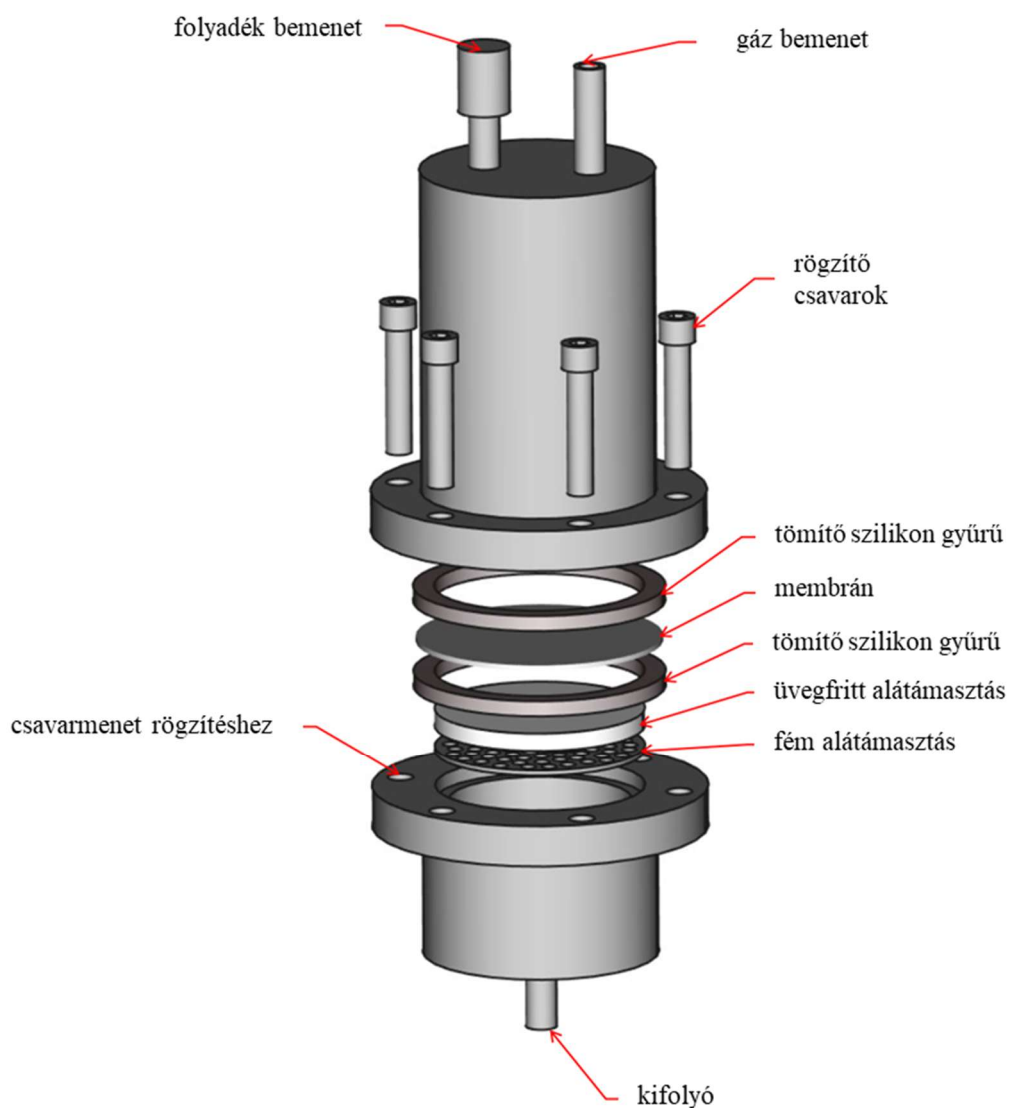
A 3.4.1. fejezetben leírtak alapján kiválasztott cellulóz-acetát síklap membránon végeztem el a lakkáz rögzítését egy két lépéses módszerrel.

Első lépésben a lakkáz enzimet adszorbeáltattam a membránon lakkáz oldatba történő bemerítéssel. Ehhez a kísérleti tervben megadottak szerint (lásd. 3.3.4. fejezet) 47 mm-es átmérőjű membrán lapokat különböző lakkáz koncentrációjú és pH értékű 10 ml lakkáz oldatba merítettem, majd meghatározott ideig kevertetem (100 RPM) beállított hőmérsékletű rázóinkubátorban parafilmmel lezárt üvegedényzetben.

Ezt követően glutáraldehid felhasználásával keresztkötéseket hoztam létre. Ehhez az adszorpciót követően a nedves membránokat a kísérleti tervben meghatározott

koncentrációjú glutáraldehid oldatba merítettem és az adszorpciós lépéshez hasonlóan rázóinkubátorban kevertetem különböző hőfokon.

A keresztkötést követően, a membránok egy rozsdamentes acél, dead-end üzemmódban használható szűrőmodulba (4. ábra) kerültek. A membránokat ultratiszta vízzel mostam és mértem a szűrlet aktivitását. A mosáshoz legalább kilencszer 10 ml vizet használtam, attól függően, hogy volt-e még aktivitása az utolsó mosás során gyűjtött permeátumnak. Amennyiben a mosást követően a membránok nem kerültek azonnal felhasználásra, úgy ultratiszta vízben tároltam maximum 24 órán át.



4. ábra Kísérletekhez használt kis méretű membrán tartó modul

3.4.3 Immobilizált aktivitás és immobilizálási hatékonyság meghatározása

Az immobilizált aktivitás ($A_{\text{immobilizált}}$) meghatározása a kezdeti minta (A_0) és az adott idő után mért aktivitás (A_t) különbségéből történt. Ehhez figyelembe vettem a membrán nélkül, azonos lakkáz mennyiséggel végzett kísérlet során meghatározott aktivitás (A_{vak}) változását is az 9. egyenlet segítségével.

$$A_{\text{immobilizált}} (U/l) = A_0 - A_t - (A_{\text{vak},0} - A_{\text{vak},t}) \quad (9)$$

Az így meghatározott aktivitás értékekből számoltam a 10. egyenlet segítségével az immobilizálás hatékonyságát.

$$\eta_{\text{immobilizált}} (\%) = \frac{A_{\text{immobilizált}}}{A_0} \quad (10)$$

3.4.4 Immobilizációs protokoll optimalizálása

Annak érdekében, hogy meghatározásra kerüljön az adszorpcióval és keresztkötéssel elérhető maximális immobilizációs hatékonysághoz tartozó pH, adszorpciós idő és hőmérséklet értéke nagyságrendileg, előkísérleteket végeztem, amelyet a válaszfelületek módszerével értékeltem ki.

A pH hatását az adszorpciós folyamatra McIlvaine pufferoldatban vizsgáltam. Ehhez a lakkázt (1 mg/ml) különböző pH értékű (4 – 6) pufferoldatban oldottam fel. Mivel az előkísérletek során azt tapasztaltam, hogy a lakkáz oldódása a vizsgált koncentrációban lassú, ezért a teljes feloldás érdekében a kimért szilárd lakkázt 1 órán át kevertettem rázópadon a kísérleteket megelőzően. A vizsgált pH tartományának megválasztásánál figyelembe vettem a használt puffer lehetséges tartományát (pH 3 – 6) és a cellulóz acetát membránokhoz ajánlott tartományt: pH = 3,5 – 8 (lásd. 4. táblázat).

A pH hatásának vizsgálatát követően a kísérleteket a korábbi mérések során legnagyobb hatékonyságot elért pH értékű puffer oldatban végeztem el 3 mg/ml-es lakkáz koncentrációjú oldatokkal különböző hőmérsékleteken (15 – 40 °C). A hőmérséklet hatásának meghatározásához 9 órás kísérletek segítségével vizsgáltam az oldatok aktivitását. A vizsgálatokat membrán nélkül is elvégezve, és időszakosan mintát véve az oldatból, információt kaptam a lakkáz termikus bomlásának sebességéről különböző hőmérsékleten, illetve meghatároztam az egyes hőmérsékletekhez tartozó bomlási állandókat.

Az előkísérletek eredményeként kapott információk alapján kiválasztottam az egyes paraméterek tartományait az optimalizáláshoz: lakkáz koncentráció: 1 – 3 mg/ml, adszorpció ideje: 3 – 9 óra, hőmérséklet: 15 – 35 °C. Az optimalizáláshoz válaszfelületek módszerét használtam, amelyhez a középpontos kompozíciós kísérleti séma alapján készítettem kísérleti tervet. Mivel a vizsgálatok során az egyes ismétlések közötti eltérés befolyásolhatja az optimumot, ezért a kísérleti tervben szereplő minden kísérleti ponton három ismétlést végeztem el, amellet, hogy a középpontban a kísérleti hibának meghatározásához 5 ismétlés szerepel a kísérlettervben.

A mért eredményeket felhasználva egy négyzetes polinomot illeszttem (11), amely tartalmazza az egyes paraméterek hatásai mellett azok kombinációjának hatását is. Ezen hatások minden paraméter esetén egy-egy konstanssal (b_i) kerültek számszerűsítésre. A faktorok jelölését a következő szerint választottam meg:

- A: koncentráció,
- B: adszorpció ideje,
- C: hőmérséklet.

Az illesztéshez lineáris regressziót használtam a Matlab Optimisation Toolbox segítségével, majd meghatároztam az illesztett polinom maximumához tartozó értékeket.

$$Y=b_0+b_1A+b_2B+b_3C+ b_{12}AB+b_{13}AC+b_{23}C+b_{11}A^2+b_{22}B^2+b_{33}C^2 \quad (11)$$

A keresztkötés hatásának vizsgálata céljából az adszorpcióval előállított membránból kisebb méretű membrán lapokat vágtam ki (átmérő: 5 mm), amelyeket különböző koncentrációjú (50 – 500 mM) ultratiszta vízzel hígított glutáraldehid oldatba helyeztem 2 órára. A vizsgálatokat 20°C-on és 4°C-on temperált rázóinkubátorban végeztem el. A reakcióidő leteltét követően a membránokat ultratiszta vízzel mostam, majd küvettában, folyamatos keverés mellett mértem az abszorbancia változását. Az abszorbancia változásából kiszámoltam a membrán aktivitását.

3.4.5 Membrán felületének vizsgálata

Az immobilizálási protokoll optimalizálását követően a membránon való rögzítésről pásztázó elektronmikroszkópos elemzés készült ThermoFischer Apero S készülék segítségével. A mérést megelőzően a membránok exsikkátorban való kiszáritása volt

szükséges, illetve mivel a cellulóz-acetát membrán az elektronsugár hatására roncsolódik és erősen töltődik, a vizsgált felületen aranyból egy bevonat készült.

3.4.6 Térfogatáram hatásának vizsgálata

Szabad enzimmel végzett átalakítás esetén elérhető hatékonyságot befolyásolhatja az enzim aktivitása mellett a reakcióidő is. A membránnal végzett lebontás során az átalakítás ideje az enzim és a szubsztrát közötti kapcsolat idejére korlátozódik. Azaz a membrán pórusain keresztül történő áramlás sebessége határozza meg azt az időt, ami alatt a konverzió lejátszódik. Ennek az összefüggésnek a vizsgálata érdekében az előállított membránt egy dead-end szűrőmodulba (4. ábra) helyeztem, majd arra nagynyomású szintetikus levegőt tartalmazó palackból reduktoron keresztül különböző nyomást kapcsoltam. A transzmembrán nyomás változtatásával szabályoztam térfogatáramot, majd összehasonlítottam az immobilizáláshoz használt, kezeletlen cellulóz-acetát membrán és az enzim tartalmú membrán ultratiszta vízzel mért térfogatáramát (Q).

Ehhez a permeátum térfogatáramát, annak tömege alapján (m) határoztam meg analitikai mérleggel. A mérlegen másodpercenként került regisztrálásra a tömeg változása (Δm), amelyből a víz sűrűségének (ρ) felhasználásával határoztam meg az adott idő (t) alatt átáramlott ultratiszta víz mennyiségét (Q) az 12. számú képlet segítségével.

$$Q = \frac{(\Delta m \cdot \rho)}{t} \quad (12)$$

A térfogatáram hatását a konverzióra úgy határoztam meg, hogy 0,05 mg/ml koncentrációjú pH=5 pufferoldatban készített ABTS oldatot szűrtem át a lakkáz tartalmú membránon. A konverziót a permeátumban fotometriásan meghatározott ABTS reakciótermékek koncentrációjának változásából határoztam meg.

A reakciósebesség (r) meghatározásához a reakció idejének a folyadék membrán pórusaiban való tartózkodási idejét (τ) vettem alapul, amelyet a membrán porozitásából (ϕ), geometriájából (V_m) és a térfogatáramból határoztam meg. A reakciósebesség számolása az 13. egyenlettel történt.

$$r = \frac{(C_{\text{permeátum}} - C_{\text{betáp}}) \cdot Q}{V_m \cdot \phi} \quad (13)$$

Az említett adatok közül a membrán porozitásának mérése az ún. nedves-száraz módszerrel történt [175], membrán vízbe merítése alapján.

3.4.7 Tárolási stabilitás vizsgálata

A tárolási vizsgálatok során az immobilizációt követően a membránokat 20 ml ultratiszta vízben 4 °C-on tartottam egy héten át. A membrán aktivitását 1, 4, 5, 7 nap után mértem ABTS oldat átszűrésével, majd az alábbi elsőrendű bomlási egyenlettel (14) meghatároztam a csökkenésből a bomlási állandót. A vizsgálatokat 3 párhuzamos mérésel végeztem el. A membránokat a vizsgálat után ultratiszta vízzel átöblítettem, majd visszahelyeztem a tároló oldatba.

$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-kt} \quad (14)$$

3.4.8 Szubsztrát koncentráció hatásának vizsgálata

Az immobilizálás során változhat az enzim által katalizált reakciók sebessége pl. a diffúziós gátlás hatására [176] vagy a keresztkötések által okozott szerkezeti változások eredményeként [177]. Ennek vizsgálata érdekében az aktivitás méréshez is használt szubsztráttal végeztem kinetikai vizsgálatokat.

Az aktivitás mérés során használt szubsztrátot, ABTS-t szűrtem át különböző koncentrációkban (23, 46, 91, 228, 456, 911 µM). A membránnal végzett átalakítás során, ellentétben az aktivitás mérésel, a membránon átszűrtem a citrát-foszfát pufferben (pH=5) feloldott szubsztrátot.

A membránt egy dead-end üzemmódban használható rozsdamentes acél modulba (4. ábra) helyeztem, majd a szubsztrát oldatot a modulba pipettáztam. Egy sűrített levegő palack segítségével 1 bar nyomást kapcsoltam a membrán bemeneti oldalára, amely hatására a membrán két oldala közötti nyomáskülönbség alakult ki és átáramlott a szubsztrát oldat. A mérés során a nyomás értékét egy reduktor segítségével mérési sorozat elején állítottam be, majd a beállítást nem változtattam, így a mérés során a transzmembrán nyomás állandónak tekinthető. A permeátum oldalon kilépő folyadék tömegét egy analitikai mérleg segítségével másodpercenként rögzítettem, majd ezek alapján számítottam a permeátum oldali tömegáramot (Q). A kis térfogatból adódóan, minden mérésnél volt egy rövid felfutási és lefutási szakasz, ahol alacsonyabb volt a térfogatáram. A számításhoz a két szakasz közötti stabil állapotot vettem figyelembe.

A konverzió meghatározásához mértem ABTS-ből keletkező reakciótermék koncentrációjának változását ($c_{\text{betáp.}}$ és $c_{\text{permeátum}}$) a szűrés során. Ezt az aktivitás mérésnél leírtak szerint UV-Vis spektroszkópiával végeztem el, majd a 13. egyenletnek megfelelő meghatároztam a reakció sebességét.

A kapott reakciósebesség és a kísérletben használt szubsztrát koncentráció alapján, az értékekre kinetikai egyenletet illesztettem és meghatároztam a Michaelis-Menten kinetikai állandót és a maximális reakciósebesség értékét a 3.4.4. fejezetben leírtak szerint.

3.4.9 Membrán többszöri felhasználásának vizsgálata

A meghatározott immobilizálási protokoll alapján előállított 47 mm-es átmérőjű membránt dead-end üzemmódban használható modulba helyeztem. A membránt a protokoll szerint legalább kilencszer átmostam, majd 0,05 mg/ml koncentrációjú pH=5 pufferoldatban készített ABTS oldatot szűrtem át 1 bar nyomás rákapcsolása mellett. A permeátumban UV-Vis spektrofotometriásan meghatároztam a keletkező reakciótermékek koncentrációját, majd ismét átszűrtem a membránon. Összesen 5 ciklust végeztem, majd meghatároztam az ABTS konverzióját és a membrán aktivitásának csökkenését.

3.4.10 Diklofenák átalakítása enzimkatalitikus membránnal

Az optimalizált immobilizálási módszerrel előállított membránokat DCF lebontására használtam. A vizsgálatok során három paraméter hatását vizsgálatam: pH, térfogatáram, permeátum visszaforgatása. A vizsgálatokhoz 1 mg/l kiindulási koncentrációjú diklofenák oldatot használtam, amelyet metanolban készített törzsoldatból különböző kémhatású pufferoldatokban állítottam elő (metanol tartalom 1%). A vizsgálatok során a fluxust nem túlnyomás rákapcsolásával, hanem perisztaltikus pumpával szabályoztam, ami lehetővé tette az egyenletes térfogatárammal történő vizsgálatokat. A térfogatáram hatásának vizsgálata érdekében a kísérletek három különböző szivattyúbeállítással (10, 20, 30 RPM) végeztem el pH=5 pufferoldatban készített diklofenák oldattal. A térfogatáram pontos meghatározása a 3.4.6. fejezetben leírtak szerint analitikai mérleggel történt. A pH hatásának vizsgálata során a közbelső szivattyúbeállítással (20 RPM) különböző pH értékű (pH=2, 4, 5, 6, 7) diklofenák

oldatot szűrtem át az enzimkatalitikus membránokon. A kísérletek során minden beállításhoz új membránt használtam.

A lebontási kísérletet folyamatos üzem használatának vizsgálata érdekében megismételtem egy nagyobb méretű laboratóriumi EMBR rendszerben is. Ebben egy Sterlitech gyártmányú CF042D membrán modul van beépítve (5. ábra), amelyben a membrán hasznos felülete 42 cm^2 . A nagyobb rendszerben való kísérlet elvégzéséhez a membrán méretnövelése volt szükséges, ezért a használt membránt az optimalizált protokoll szerint, a felülettel arányosan megnövelt térfogatban végzett immobilizációval állítottam elő (30 ml lakkáz oldat). A vizsgálatokhoz 500 ml térfogatú 1 mg/l kiindulási koncentrációjú diklofenák oldatot használtam, amelyet metanolban készített törzsoldatból pH=5 pufferoldatban állítottam elő (metanol tartalom 1%). A kísérlet során a rendszert dead-end üzemmódban üzemeltettem állandó térfogatáram mellett. A kísérlet során adott időközönként (0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h) külön gyűjtöttem mintavétel céljából a permeátumot. Az így begyűjtött mintákat a 3.2.2. fejezetben leírt módon szilárd-fázisú extrakcióval dúsítottam, majd HPLC-UV segítségével meghatároztam a diklofenák koncentrációjának változását.



5. ábra Sterlitech CF042D membrán modul [178]

4 Eredmények

4.1 Lakkáz immobilizálása alginát mátrixban

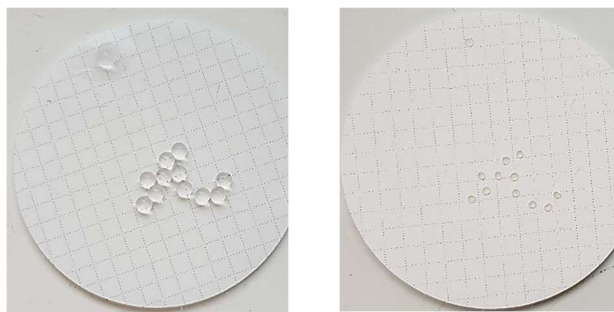
A lakkáz immobilizálása érdekében két módszert vizsgáltam meg. Elsőként az alginát-mátrixban való csapdázást, amely segítségével a lakkáz tartalmú alginát gyöngyöket hoztam létre. Mivel az alginátban történő enzim rögzítés nagy múltra tekint vissza (2.2.3.1. fejezet), ezért elsődleges célként a lakkáz rögzítésre és a mikroszennyezők eltávolításával való kombinált használatának vizsgálatát tűztem ki.

4.1.1 Előállított gyöngyök karakterizációja

Az immobilizációt követően az alginát gyöngyök tulajdonságait részletesen megvizsgáltam, amelyek a következő fejezetekben olvashatóak.

4.1.1.1 Morfológia

A bürettából történő adagolásnak köszönhetően az előállított alginát gyöngyök szemcsemérete 2-3 mm (6. ábra), nedves tömege átlagosan 19,2 mg/db (SD=0,7 mg, n=60).



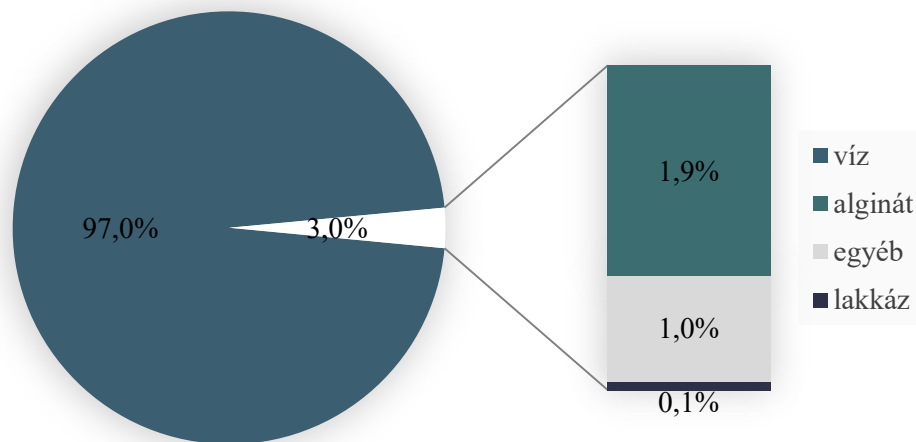
6. ábra Alginát gyöngyök méretének változása szárítás során

Frissen előállított (bal) és szárítás utáni (jobb) gyöngyök, rács mérete: 3 mm

4.1.1.2 Előállított gyöngyök összetétele

A gyöngyök összetétele gravimetriásan került meghatározásra (7. ábra). Exsikkátorban való 24 órás szárítást követően mért tömege alapján, az előállított nedves gyöngyök nedvességtartalma: 97% (SD=0,53%, n=60). A gyöngyök előállítása során felhasznált lakkáz mennyisége alapján a gyöngyök tömegének 0,10%-át adja az enzim. A gyöngyök szilárdanyagának nagy részét az immobilizáláshoz használt alginát

teszi ki (1,97%, SD=0,01%, n=4). A fennmaradó ~1%-ot az immobilizálás során lejátszódó ioncsere után a mátrixban csapódzott kalcium- és nátrium-klorid oldat adja.



7. ábra Lakkáz tartalmú alginát összetétele

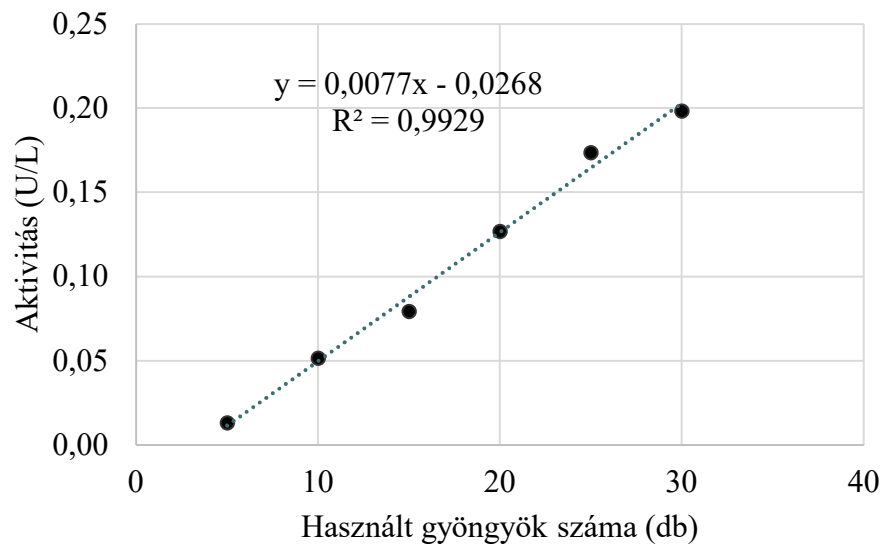
4.1.1.3 Immobilizálási módszer hatékonysága és veszteségek

A mérés során a kiindulási oldat aktivitása: 228,5 U/l (SD=24 U/l, n=3). Ebből a gyöngyök mosásához használt 15 ml ultratiszta vízben mért aktivitás 2,6 U/l (SD=0,5 U/l, n=3), és a rögzítéshez használt CaCl₂ oldatban a rögzítés során mért 1,4 U/l (SD=0,14 U/l, n=3) veszteségként jelentkezett. Ezek alapján a módszer immobilizálási hatékonysága: 98,2% (SD=0,1%, n=3).

4.1.1.4 Lakkáz tartalmú alginát gyöngyök fajlagos aktivitása

Az alginátban rögzített lakkáz aktivitásának meghatározásához 10 db gyöngyöt használtam fel, amely lakkáz tartalma megfelel 0,2 mg/ml lakkáz oldat enzim tartalmának. Az összehasonlítás érdekében azonos körülmények (lakkáz mennyiség, pH, ABTS koncentráció, hőmérséklet, idő) között meghatározásra került a szabad és az alginátban rögzített lakkáz aktivitása. A szabad lakkáz esetén meghatározott aktivitás: 34,03 U/l (SD=2,6 U/l, n=3), míg azonos mennyiségű lakkázot tartalmazó alginát gyöngy esetén a mért aktivitás csak 0,0541 U/l (SD=0,006 U/l, n=3). Ez 1 db gyöngyre vonatkoztatva 0,005 U/db. Tömegre vonatkoztatva ez az érték 0,00026 U/mg.

Különböző mennyiségű alginát gyönggyel elvégezve az ABTS átalakítását, azt az eredményt kaptam, hogy a gyöngyök darabszáma és a reakcióelegy aktivitása között lineáris összefüggés van ($R^2=0,9929$), ahogy az a 8. ábrán is látható.

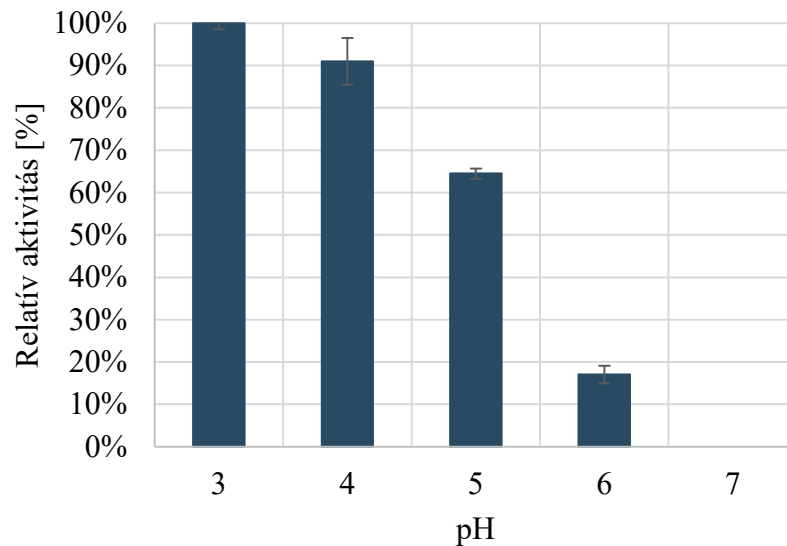


8. ábra Aktivitás a gyöngyök darabszámának függvényében

A vizsgálat körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,05 mg/ml, pufferoldat pH=5, szobahőmérséklet ($T \sim 22^\circ\text{C}$), reakcióidő: 6 perc, kuvetta térfogat: 4 ml

4.1.1.5 A lakkáz tartalmú alginát gyöngyök aktivitásának pH függése

A különböző pH értékű pufferoldatban mért ABTS átalakítás sebessége, azaz az aktivitás alapján kijelenthető, hogy az alginátban immobilizált lakkáz aktivitása a pH csökkenésével emelkedik (9. ábra). Az alginát semleges pH értéken nem mutat mérhető aktivitást.

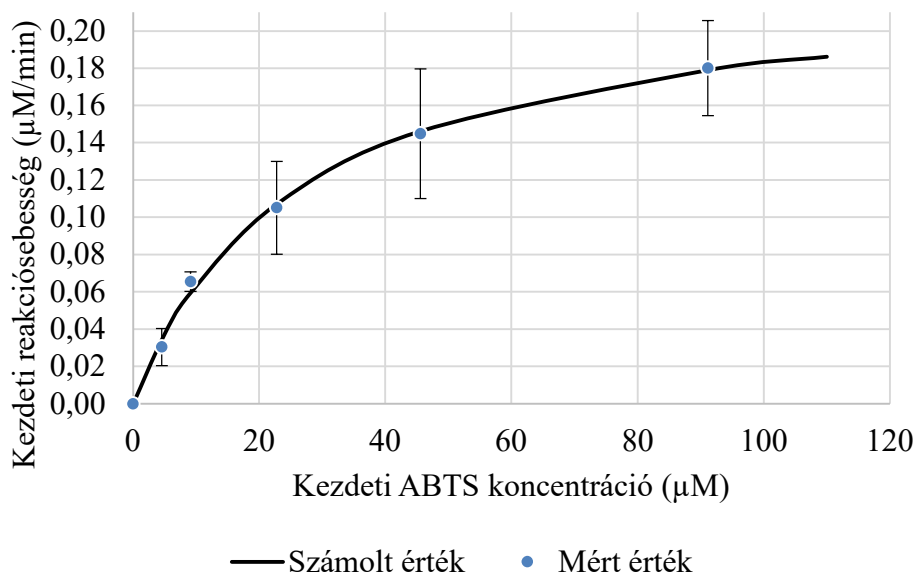


9. ábra Alginát aktivitásának pH függése

A vizsgálat körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,05 mg/ml, használt alginát gyöngyök mennyisége: 20 db, szobahőmérséklet ($T \sim 22^\circ\text{C}$), reakcióidő: 6 perc, kuvetta térfogat: 4 ml

4.1.1.6 Enzimkinetikai vizsgálatok alginátban immobilizált lakkázzal

A szubsztrát koncentráció hatásának meghatározása érdekében enzimkinetikai vizsgálatokat végeztem. Ezek során felvételre került a szubsztrát koncentráció és reakciósebesség közötti összefüggés (10. ábra), amelyre lineáris regresszióval illesztettem a Michaelis-Menten kinetikai egyenletet. Az illesztés alapján meghatározott Michaelis-állandó (K_M) értéke $26,43 \mu\text{M}$, míg a maximális reakciósebesség (v_{max}): $0,23 \mu\text{M}/\text{min}$.

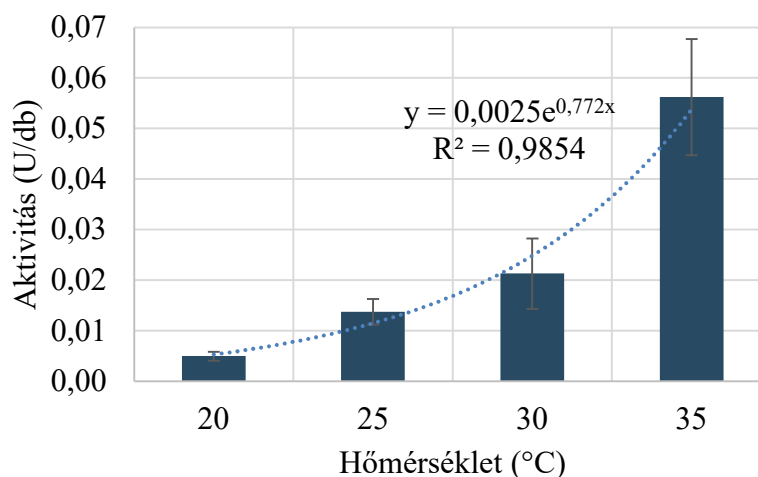


10. ábra Michaelis-Menten kinetika alginátban rögzített lakkázra

A vizsgálat körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,025 – 0,050 mg/ml, használt alginát gyöngyök mennyisége: 20 db, szobahőmérséklet (T~22°C), reakcióidő: 6 perc, küvetta térfogat: 4 ml

4.1.1.7 Aktivitás hőmérsékletfüggése

Az alginátban történő rögzítést követően vizsgáltam a hőmérséklet növekedésének hatását az ABTS átalakítására. Ennek érdekében 20 és 35°C közötti hőmérsékleten végeztem aktivitás mérést (11. ábra). A mérések alapján a hőmérséklet és az aktivitás között exponenciális összefüggés határozható meg ($R^2=0,9854$)

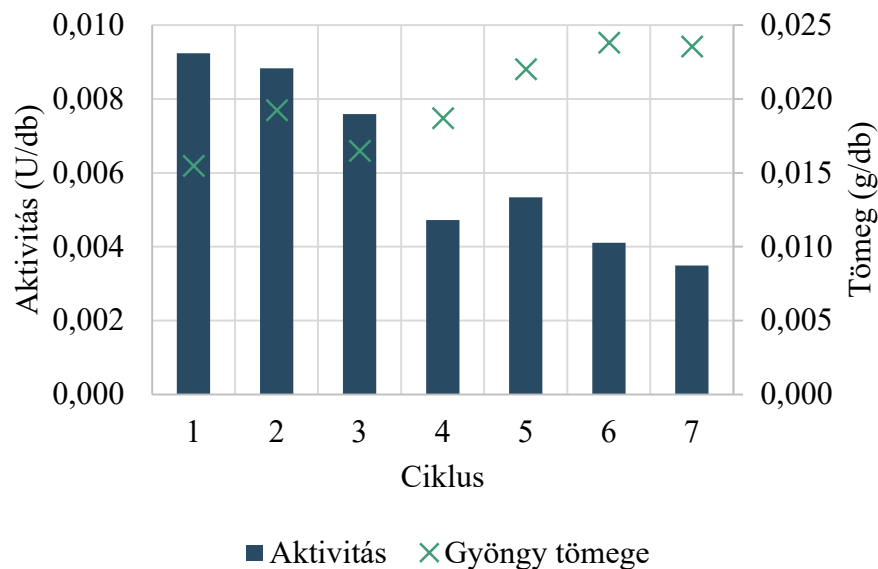


11. ábra Alginát aktivitásának hőmérsékletfüggése

A vizsgálat körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,05 mg/ml, használt alginát gyöngyök mennyisége: 20 db, hőmérséklet: 20 – 35°C, reakcióidő: 6 perc, küvetta térfogat: 4 ml

4.1.1.8 Ismételt felhasználás vizsgálata

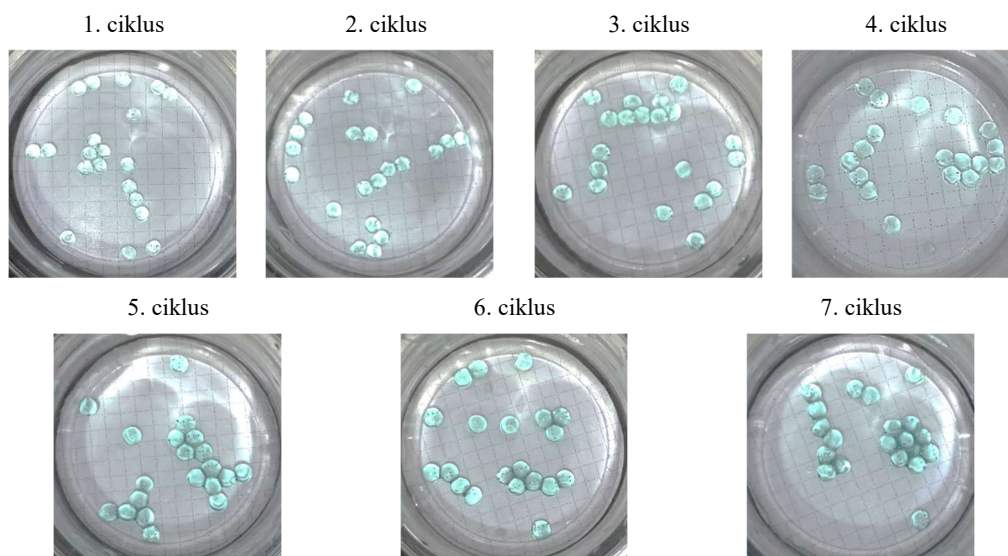
A gyöngyökben való immobilizálást követően megvizsgáltam, hogy a gyöngyöket lehet-e többször használni. A vizsgálat során azt tapasztaltam, hogy a gyöngyök aktivitása fokozatosan csökkent, míg tömegük és méretük ciklusonként növekedett (12. ábra). A ciklusok során az alginát gyöngyök aktivitásuk mintegy 62%-át elvesztették, míg a tömegük 52%-kal növekedett, ami jelentős vízfelvételekre utal. Ahogy az a 15. ábrán is látható ezzel párhuzamosan a térfogatuk is növekedett.



12. ábra Immobilizált lakkáz aktivitásának és tömegének változása újrahasználat során

A vizsgálat körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,05 mg/ml, használt alginát gyöngyök mennyisége: 20 db, szobahőmérséklet: ~22 °C, reakcióidő: 6 perc, küvetta térfogat: 4 ml

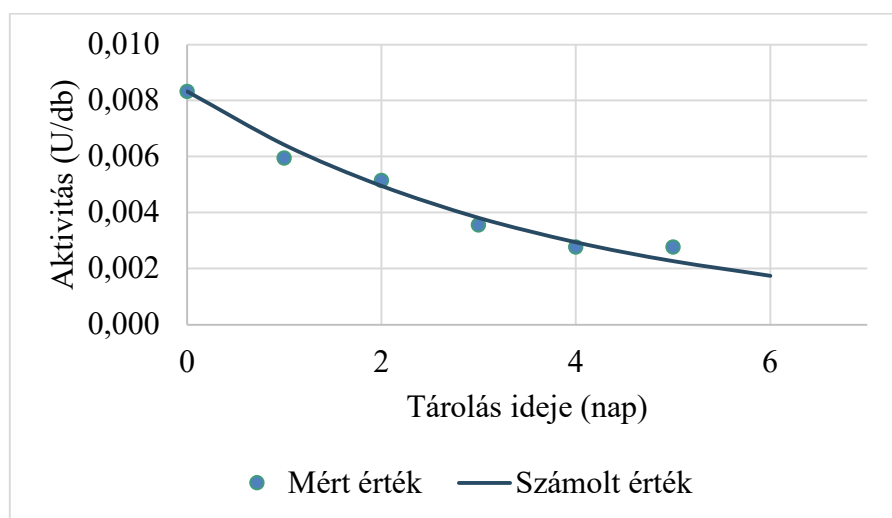
Az ABTS-sel végzett ismételt mérések során azt tapasztaltam, hogy az ABTS-ből keletkező reakciótermékek jellemző színét felvették az alginát gyöngyök, ahogy az a 13. ábrán is látható. Emellett a gyöngyök egyre puhábbak lettek a kísérlet során, így a 7. ciklus után már nem sikerült épségben visszanyerni mind a 20 db gyöngyöt.



13. ábra Alginát gyöngyök változása ismételt felhasználás során

4.1.1.9 Tárolási stabilitás

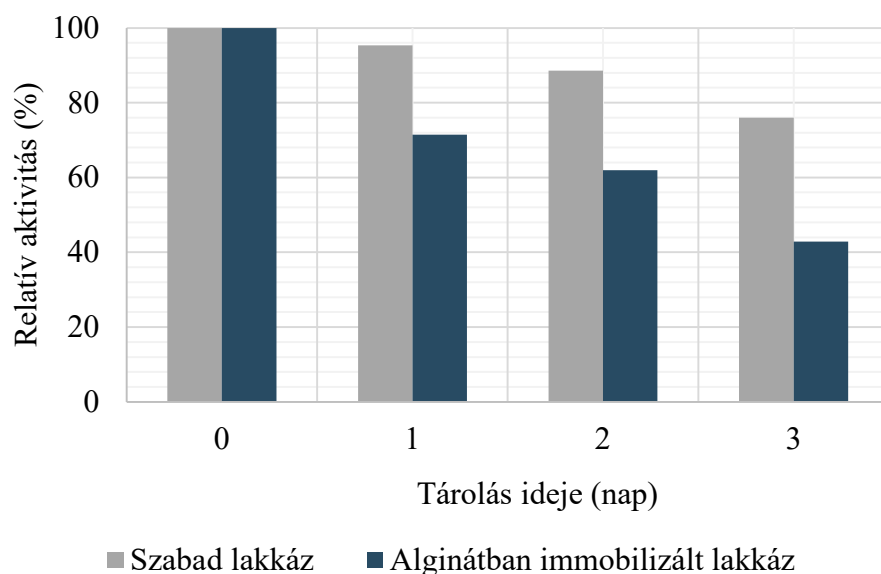
A vizsgálatok során felvettem a tárolási idő és fajlagos aktivitás közötti összefüggést, ami a deaktiválódott és szivárgó lakkáz mennyiségére utalhat. Az alginát gyöngyök tárolási stabilitásának meghatározása során a gyöngyök aktivitásának csökkenését figyeltem meg (14. ábra). A gyöngyök kezdeti 0,008 U/db aktivitása 5 napos tárolást követően 0,003 U/db-ra csökkent. Ez az aktivitás 75%-os csökkenését jelenti. A csökkenés exponenciális jellegűt mutat. Az exponenciális bomlási egyenlet (14) illesztésével meghatározott bomlási állandó értéke: 0,26 1/nap.



14. ábra Lakkáz tartalmú alginát gyöngyök aktivitásának csökkenése tárolás során

A vizsgálat körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,05 mg/ml, használt alginát gyöngyök mennyisége: 10 db, szobahőmérséklet: ~22 °C, reakcióidő: 6 perc, küvetta térfogat: 4 ml, tárolás 20°C-on

Összehasonlítva az alginátban immobilizált lakkáz tárolása és a szabad enzim tárolása során mért aktivitás értékeket azt kaptam, hogy a szabad enzim aktivitása kevésbé csökken, mint az alginátban immobilizált lakkáz (15. ábra).

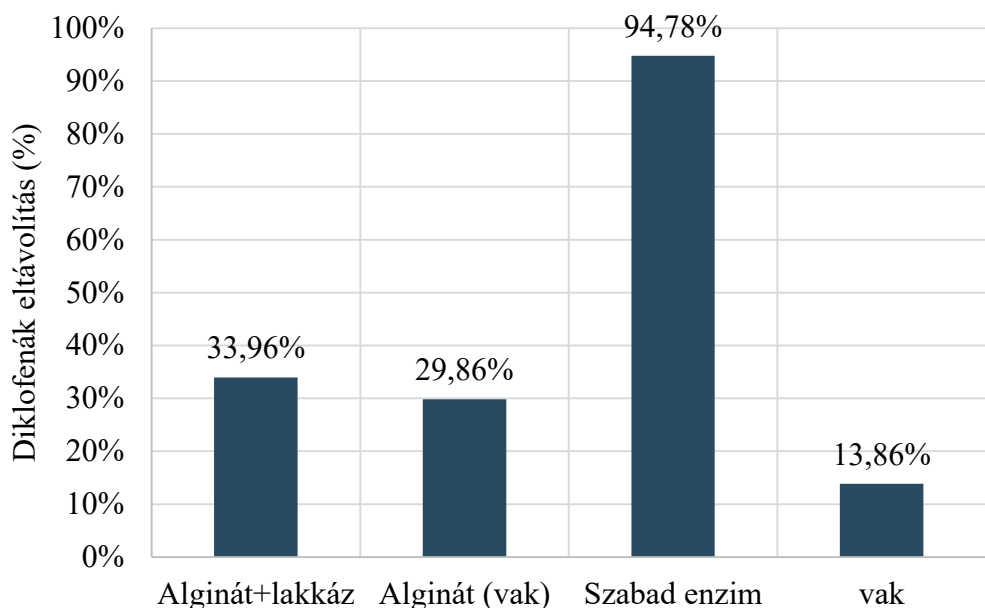


15. ábra Szabad és alginátban immobilizált lakkáz aktivitásának változása tárolás során

A vizsgálat körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,05 mg/ml, használt alginát gyöngyök mennyisége: 10 db, használt szabad enzim koncentrációja: 1 mg/ml, szobahőmérséklet: ~22 °C, reakcióidő: 6 perc, küvetta térfogat: 4 ml, tárolás 20°C-on

4.1.2 Diklofenák eltávolítása

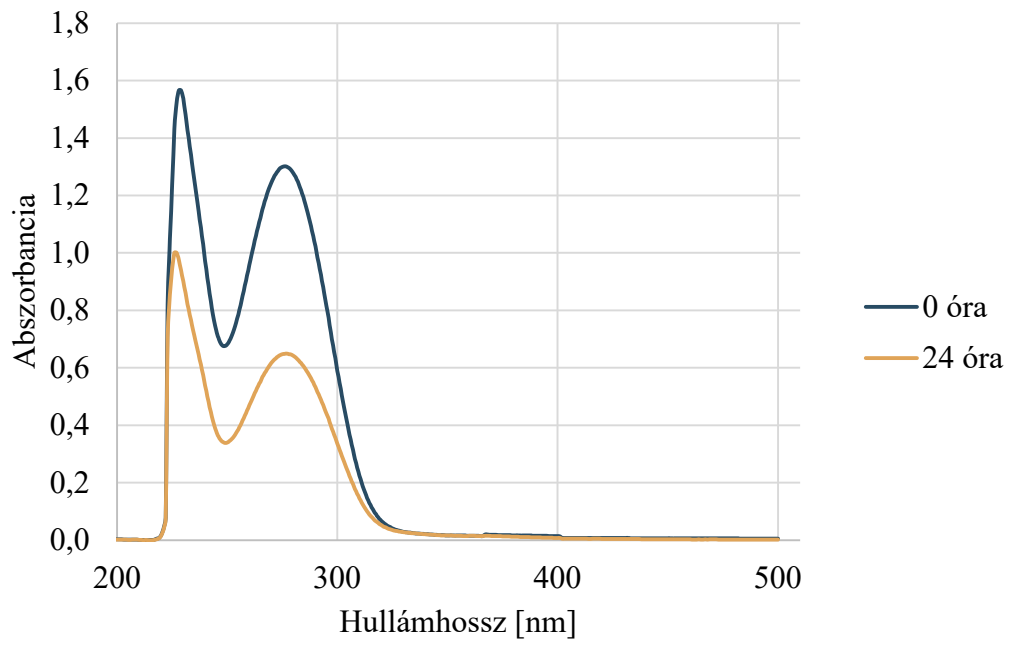
Az előállított alginát gyöngyöket diklofenák lebontása céljából teszteltem. A vizsgálat során 24 órát követően mind a négy esetben a diklofenák koncentrációjának csökkenését mértem (16. ábra). A DCF oldatot 24 órán át kevertetve enzim és alginát nélkül 13,86%-kal csökkent, míg lakkáz nélkül előállított alginát gyöngyök jelenlétében 29,86%-ot. Szabad enzim használata esetén csaknem teljes eltávolítást értem el (94,78%), míg az alginátban rögzített lakkázzal végzett kísérletben csak 33,96%-ot. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az algináton történő adszorpció hozzájárul a diklofenák eltávolításához, mivel az alginátos vak és az enzim alginát eltávolítási hatékonysága között csak 4,1% van. A kísérlet során az alginát gyöngyök idővel megduzzadtak, majd szétestek a keverés hatására, azaz a gyöngyök mechanikai stabilitása idővel csökkent a használt pufferoldatban.



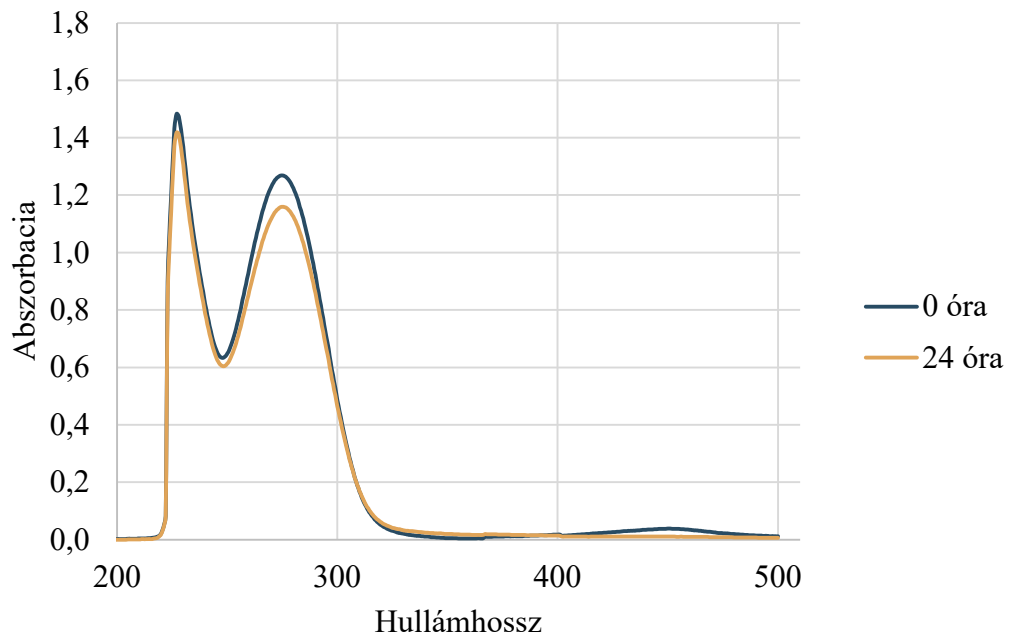
16. ábra Diklofenák eltávolítása alginátban immobilizált és szabad lakkázzal

A vizsgálatok körülményei: kezdeti DCF koncentráció: 40 µg/ml, pH=5, reakcióidő: 24 óra, hőmérséklet: 20°C, reakcióterfogat: 50 ml

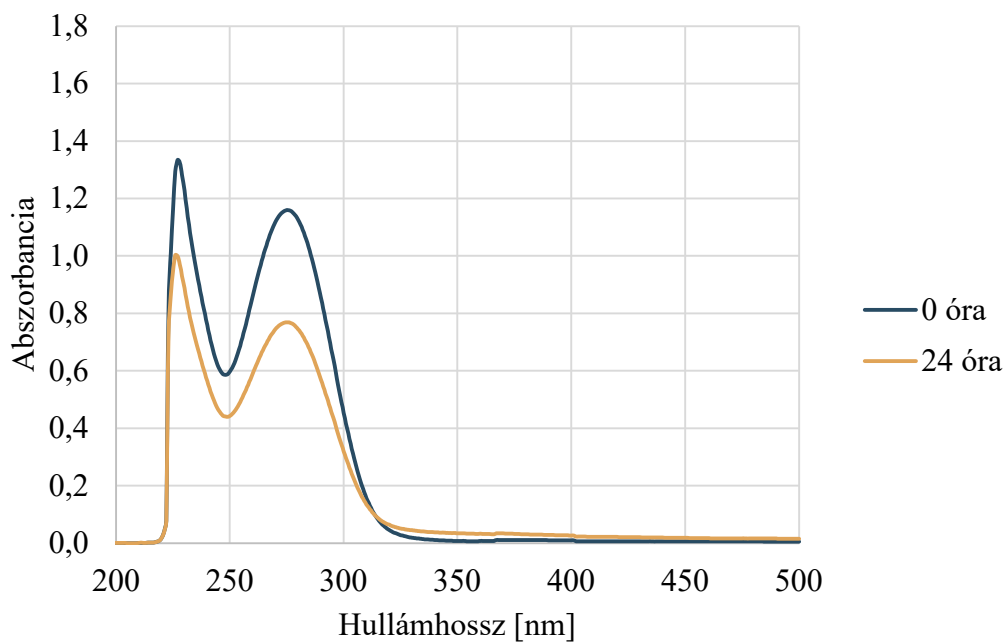
A kísérlet során vett kezdeti és a 24 órás minták UV-Vis spektrumán változás látható mind a szabad, mind az alginátban rögzített lakkáz esetén. Mindkét kísérlet során kis mértékű csökkenés figyelhető meg az UV tartományban, a DCF jellemző 278 nm körüli csúcson (18. ábra és 20. ábra). Az alacsonyabb hullámhosszon mért csúcson a változás elhanyagolható a lakkázzal végzett kísérletek esetén. Ezzel szemben a vak kísérletek során mind a két csúcs esetén csökkenést mértem, ami a DCF adszorpciójára utal (17. ábra és 19. ábra).



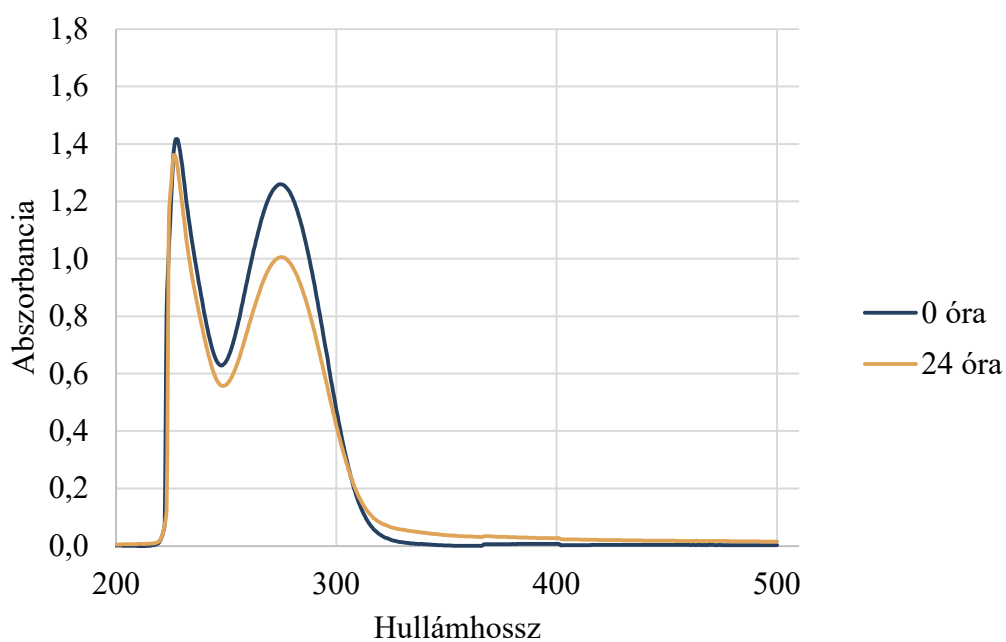
17. ábra Enzim nélkül végzett vak kísérlet során mért UV-Vis spektrum



18. ábra Szabad enzimmel végzett diklofenák átalakítása



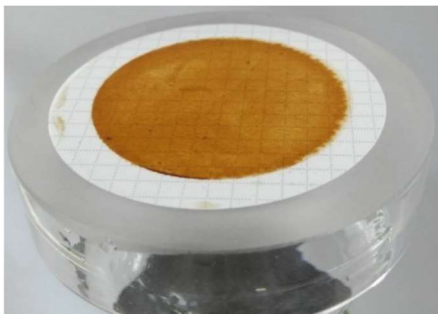
19. ábra Enzim nélkül készített alginát jelenlétében mért UV-Vis spektrum változás



20. ábra Alginátban immobilizált lakkázzal végzett diklofenák lebontás során mért UV-Vis spektrum

Mind az alginátban immobilizált lakkázzal, mind a szabad enzimmel végzett kísérlet során a reakcióelegy sárgás elszíneződését tapasztaltam. Emellett egy vízben rosszul oldódó csapadék keletkezését figyeltem meg. Az analitikai készülékek megóvása érdekében, a mintákat 0,45 μm -es szűrővel szűrtem meg a mérések előtt. Erre

elsősorban azért volt szükség, mert a kromatográfiás mérések során ezek a kolonna eltömődését okozhatják. Azt tapasztaltam, hogy a csapadék és a sárga elszíneződés jól eltávolítható a választott mikroszűrővel, ahogy az a 21. ábra jól látható.



21. ábra Diklofenák szabad enzimmel történő átalakítása során keletkező termékek

Kísérlet körülményei: diklofenák koncentráció: 40 $\mu\text{g/ml}$, lakkáz koncentráció: 0,1 m/ml,
hőmérséklet: 20°C, reakcióidő: 24 óra

A diklofenák átalakításának eredményeként a reakciótermékek egyértelmű elszíneződést okoztak, azonban ezek azonosítására nem volt lehetőségem a vizsgálatok elvégzésének idején. Erre vonatkozóan a szakirodalomban azóta jelent már meg részletes tanulmány más kutatóktól [179], így ennek részletes vizsgálatával nem foglalkoztam a disszertációmban.

A keletkező reakciótermékek mikroszűrővel tapasztalt hatékony eltávolítása motiválta elsősorban a kutatás második szakaszában kifejlesztett membrános immobilizálási módszer kidolgozását.

4.2 Lakkáz immobilizálása membránon

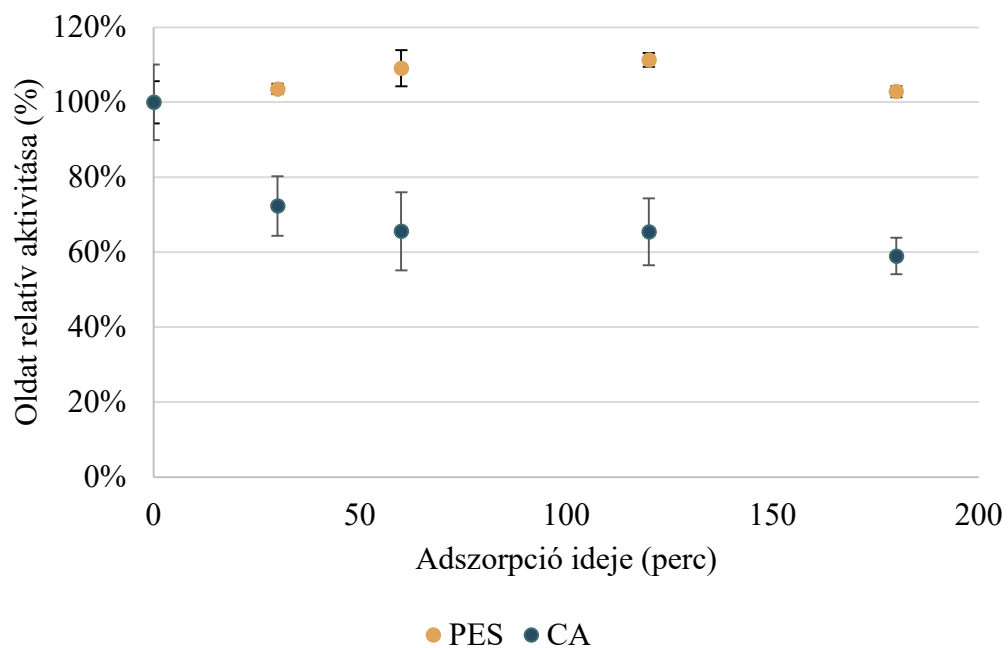
A lakkáz membránon való rögzítésének vizsgálata érdekében kidolgoztam és optimalizáltam egy immobilizálási módszert, majd az így előállított membránt karakterizáltam a felhasználás szempontjából fontos jellemzőinek meghatározásával.

Ezt követően DCF eltávolítása során összehasonlítottam a membránon immobilizált lakkáz és a szabad enzim használatát.

4.2.1 Membrán anyagának kiválasztása

A membrán anyagának kiválasztása során fontos szempont volt, hogy biológiailag lebontható anyagot használjak, azonban az elterjedt használata miatt megvizsgáltam a PES membrán alkalmazhatóságát is.

Ahogy az a 22. ábrán is átható, a vizsgálat során a CA membrán esetén jelentős csökkenést mértem. A CA membránon 41% (SD=5%, n=3)-os megkötést értem el, míg a PES membrán esetén a lakkáz oldat aktivitása nem csökkent. A kísérlet alapján a cellulóz alapú membránokat célszerű adszorpción alapuló felületmódosítás nélküli rögzítési módszerhez használni.



22. ábra Lakkáz aktivitásának változása különböző membránokon való rögzítés során

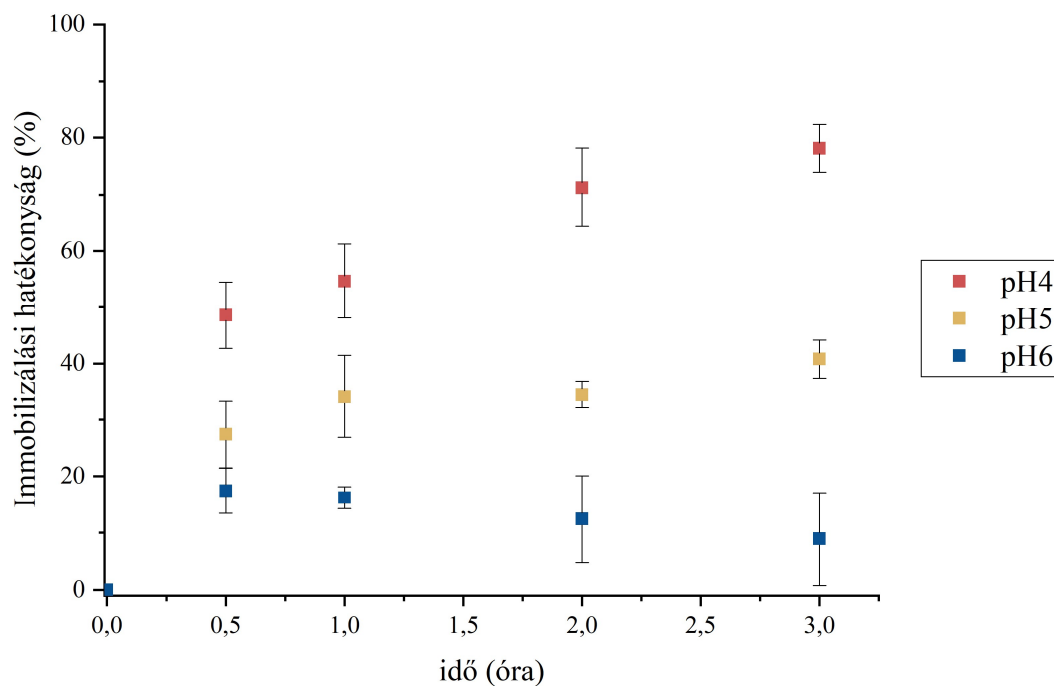
A kísérlet körülményei: lakkáz koncentráció: 1 mg/ml, pH=5, adszorpció ideje: 3 óra, hőmérséklet: 20°C, membránok átmérője: 47 mm

4.2.2 Immobilizálás optimalizálása

A nagyobb mennyiségű lakkáz megkötésére alkalmas CA membránon való immobilizációra végeztem el a módszer optimalizálását. Növelni kívántam az adszorpció hatékonyságát, a megkötött enzim mennyiségét, illetve az adszorpcióval megkötött enzimet stabilizálni kívántam a keresztkötések létrehozásával, az enzimkárosító hatások minimalizálása mellett.

4.2.2.1 Adszorpció pH függése

Első lépésként vizsgáltam a lakkáz oldat pH értékének hatását a cellulóz-acetát membránon való adszorpcióra (23. ábra). A vizsgálatok eredményeként azt kaptam, hogy a növekvő pH érték csökkenti az adszorpció hatékonyságát. A legalacsonyabb vizsgált pH értékű oldatból (pH=4) kötődött meg a legnagyobb mennyiségű enzim. Az így megkötött aktivitás: 416 U/l (SD=39,7 U/l), az immobilizálási hatások: 78%-os (SD=4%). Ezzel szemben magas pH érték esetén a rögzítés hatékonysága csupán 7% (SD=12%). Ezek alapján az adszorpció vizsgálatokat a továbbiakban pH=4 pufferoldatban feloldott lakkázal végeztem el.



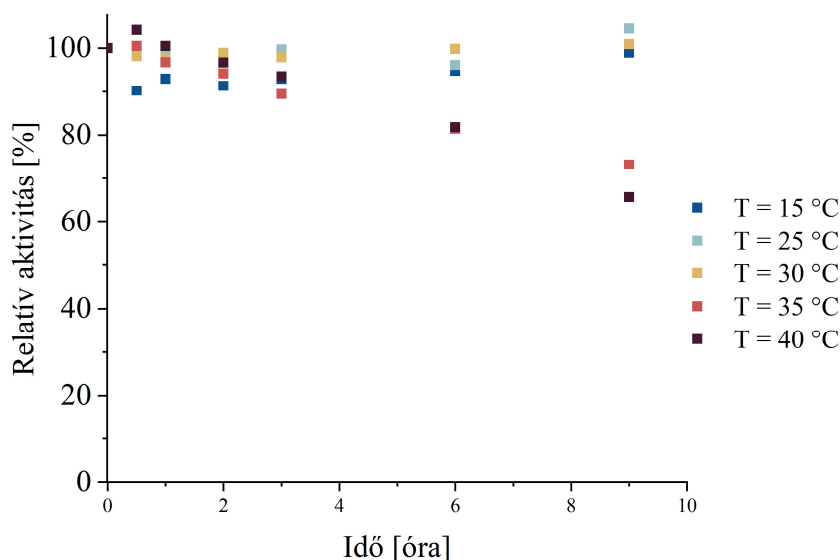
23. ábra Lakkáz adszorpció pH függése

A kísérlet körülményei: lakkáz koncentráció: 1 mg/ml, adszorpció ideje: 3 óra, hőmérséklet: 20°C, membrán átmérő: 47 mm

4.2.2.2 Termikus denaturáció

A lakkáz enzim aktivitása a hosszabb ideig végzett adszorpció során a hőmérséklet hatására megváltozhat, ezért fontos vizsgálni a enzim termikus stabilitását is. Ennek meghatározása érdekében 15 – 40°C közötti hőmérsékleten végeztem vizsgálatokat (24. ábra). Nagy aktivitás csökkenést tapasztaltam 30°C felett már 6 óra után. A

meghatározott bomlási állandó értéke 35 és 40°C esetén 0,0358 1/óra és 0,0463 1/óra. Ezek alapján a lakkáz felezési ideje 35°C-on 19,4 óra, míg 40°C-on 14,9 óra. Ez azt jelenti, hogy egy 9 órás kísérlet során hozzávetőlegesen 28% és 34%-kal csökkenne az enzim aktivitás a termikus denaturáció következtében, míg a 30°C alatt végzett kísérletek során nem volt mérhető aktivitás csökkenés.



24. ábra Lakkáz termikus denaturációja 15 - 40°C között

A kísérlet körülményei: lakkáz koncentráció: 3 mg/ml, pH=4. A viszonyítás alapja a kezdeti aktivitás.

4.2.2.3 Adszorpció optimalálása

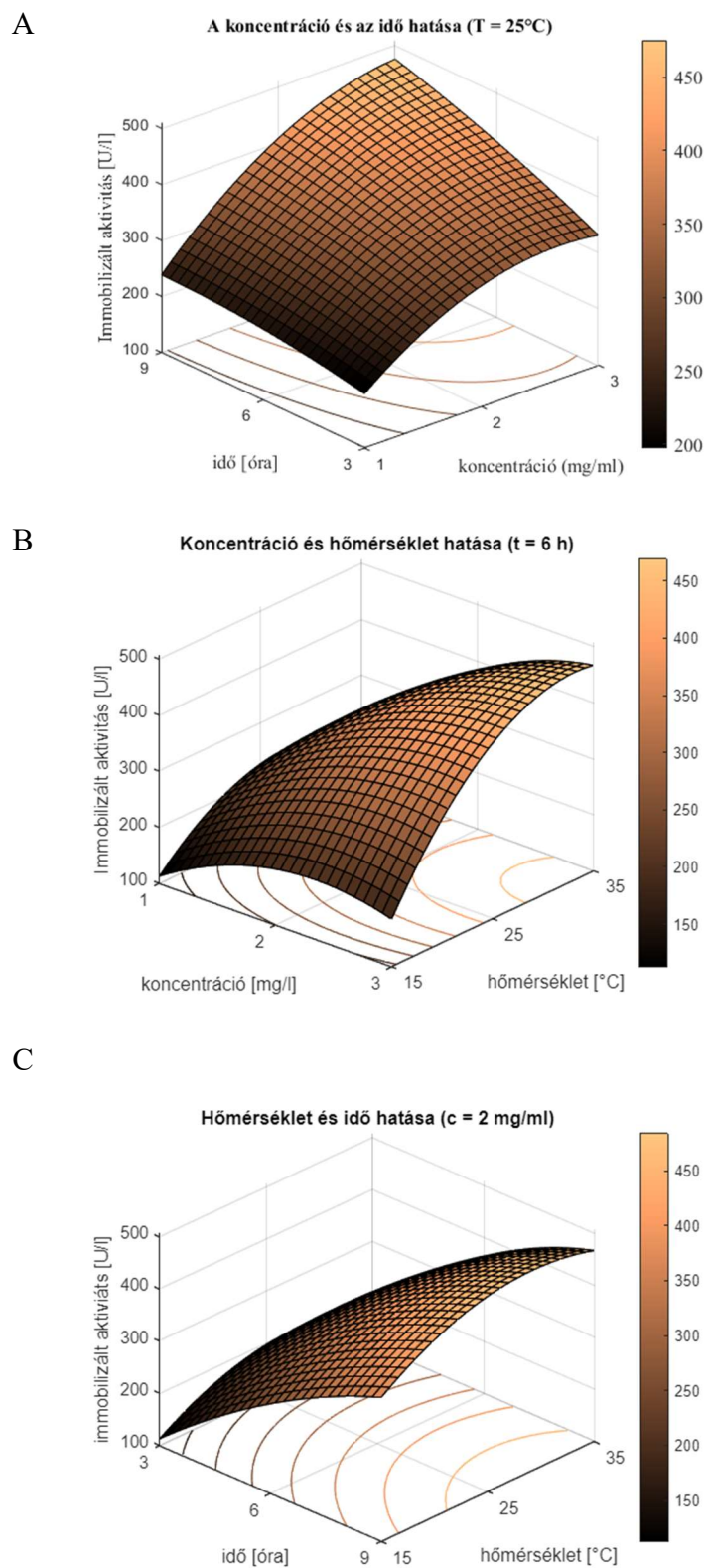
A maximális enzim megkötés érdekében figyelembe véve a pH és a hőmérséklet hatásának vizsgálata során kapott eredményeket egy kísérleti tervet állítottam össze a (5. táblázat). A válaszfüggvényt úgy választottam meg, hogy az figyelembe vegye a lakkáz termikus deaktiválódását is. A központi beállításokkal 5 kísérleti pont került felvételre. Ezek a vizsgálatok alapján a meghatározott standard szórás hatékonyságra: 2%, míg megkötött aktivitásra 12 U/l, ami elfogadható kísérleti hibának tekinthető. A kísérleti tervben szereplő minden pont meghatározása során a minták aktivitását három mérés átlagából határoztam meg.

A kapott adatokra lineáris regresszióval illeszttem a (7) számú egyenletet, amelynek regressziós koefficiense 0,966 lett. A regressziós táblában (1. melléklet) látható P-értékek alapján a modell egyenlet minden fő hatása szignifikáns ($\alpha < 0,05$), míg a kvadratikus hatások nem szignifikánsok, kivéve az adszorpció idejét. Ennek

ellenére a modellből nem vettem ki ezeket a faktorokat, mivel az korrigált R^2 értéke 0,923 és az ANOVA teszt eredménye alapján a modell szignifikáns ($p = 0,0001$). A középpontban a mért és a számított aktivitás különbsége 13 U/l, ami közel van a kísérleti hibához. Ezek alapján a modellt megfelelőnek tartom az optimálás elvégzéséhez. Az illesztett koefficiensek behelyettesítésével és 1-1 paraméter állandónak vételével a modell eredményét felületek formájában ábrázoltam (25. ábra).

5. táblázat Lakkáz adszorpciójának optimalizálása cellulóz-acetát membránon

Sorszám	Lakkáz koncentráció [mg/ml]	Adszorpció ideje [óra]	Hőmérséklet [°C]	Immobilizáció hatékonyság [%]	Immobilizált aktivitás [U/l]
1	1	3	15	38	108
2	3	3	15	20	172
3	1	9	15	57	162
4	3	9	15	42	358
5	1	3	35	65	185
6	3	3	35	44	374
7	1	9	35	71	201
8	3	9	35	54	463
9	1	6	25	81	229
10	3	6	25	52	446
11	2	3	25	57	321
12	2	9	25	77	437
13	2	6	15	56	319
14	2	6	35	62	351
15	2	6	25	66	375
16	2	6	25	64	364
17	2	6	25	61	346
18	2	6	25	62	350
19	2	6	25	62	352



25. ábra Az egyes faktorok hatása az enzim adszorpciójára.

Vizuális megjelenítés az illesztett polinom alapján. (a) lakkáz koncentráció és idő hatása, állandó hőmérséklet (25°C) mellett, (b) hőmérséklet és idő hatása, állandó lakkáz koncentráció (2 mg/ml) mellett, (c) lakkáz koncentráció és hőmérséklet hatása állandó adszorpciós idő (6 óra) esetén.

A meghatározott modell egyenlet maximumának megkeresésével meghatároztam azt a kísérleti beállítást, amelyen a termikus denaturáció csak olyan mértékű, ami még kedvez az adszorpciónak. Ezek a következők: 3 mg/ml lakkáz koncentráció, 9 óra adszorpciós idő, 29°C adszorpciós hőmérséklet.

Ez a beállítás a modell alapján 485 U/l aktivitás megkötését teszi lehetővé. Ezzel a beállítással elvégzett 5 ismétlés során 538 U/l (SD=55, n=5) került megkötésre, 76%-os (SD=7%, n=5) hatékonysággal. Mivel a mért értékek magasabbak, mint bármelyik korábban meghatározott érték, ezért az adszorpció optimalizálását sikeresnek tekintem.

Az optimális beállításokkal mért adszorpciót követően meghatározásra került az immobilizált aktivitás mellett a megkötött fehérje mennyisége is a 3.2.3 fejezetben leírtak alapján. Ennek értéke a membrán felületére vonatkoztatva 1,58 mg/cm². A membrán száraz tömege alapján a fajlagos aktivitás értéke tömegre és felületre is meghatározható. Ezek értéke: 44,4 U/mg és 42,8 U/cm².

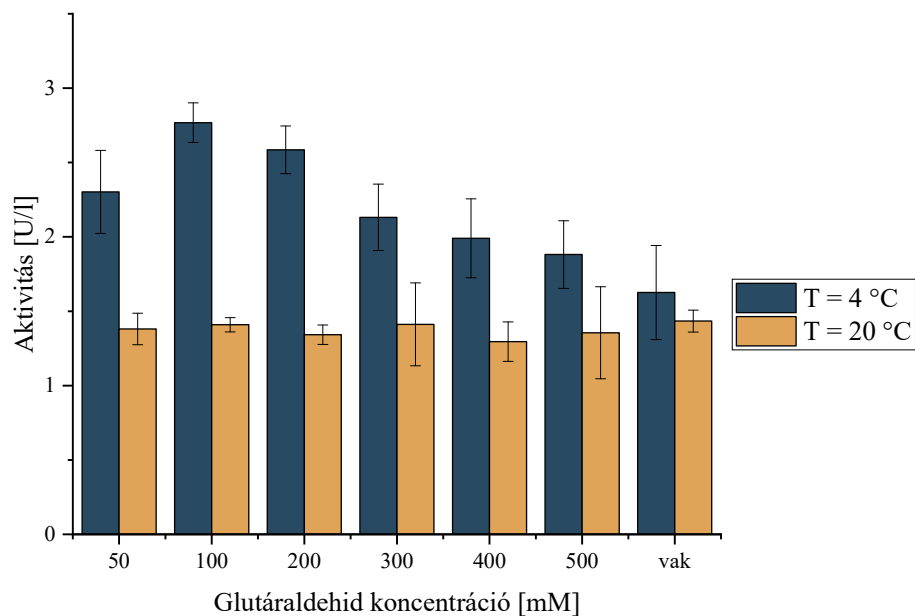
4.2.2.4 Keresztkötés optimalizálása

Az immobilizálási módszer optimalizálásának következő lépéseként meghatároztam a keresztkötési lépés optimális beállításait. Ehhez 50 – 500 mM közötti glutáraldehid koncentrációval végeztem kísérleteket 4 és 20°C-on (6. táblázat).

6. táblázat Keresztkötés optimalizálása

Sorsz.	Hőmérséklet [°C]	GA koncentráció [mM]	Mért Aktivitás [U/l]	Szórás
1	4	50	2,30	0,28
2	4	100	2,77	0,13
3	4	200	2,59	0,16
4	4	300	2,13	0,22
5	4	400	1,99	0,27
6	4	500	1,88	0,23
7	4	0	1,63	0,32
8	20	50	1,38	0,11
9	20	100	1,41	0,05
10	20	200	1,34	0,07
11	20	300	1,41	0,28
12	20	400	1,30	0,13
13	20	500	1,36	0,31
14	20	0	1,43	0,07

Az eredmények alapján kijelenthető (26. ábra), hogy a hőmérséklettől jelentősen függ a membrán aktivitása. A 20°C-on végzett kísérletek során nem volt szignifikáns különbség a különböző koncentrációk esetén, míg a 4°C-on mértek esetén megállapítható egy maximum, 100 mM GA koncentráció használata esetén. Ebben az esetben a membrán aktivitása 2,77 U/l (SD=0,13 n=3), amely közel duplája az azonos koncentrációval 20°C-on végzett kísérletben elért aktivitásnak: 1,41 U/l (SD=0,28 U/l, n=3). Fontos megjegyezni, hogy az itt mért aktivitás értékek, nem a nagy, 12,34 cm² méretű membránra, hanem egy lényegesen kisebb felületű membránra vonatkoznak (lásd. 3.4.4 fejezet).



26. ábra Glutáraldehid és hőmérséklet hatása a membrán aktivitására

A vizsgálat során 3 mg/ml pH4 pufferoldatban feloldott lakkáz 9 óra alatt 29°C-on került adszorbeáltatásra cellulóz-acetát membránra, majd 2 órán át került keresztkötésre 50-500 mM koncentrációjú glutáraldehiddel 4°C-on (kék), illetve 20°C-on (sárga).

Az optimalizálás során meghatározott maximális megkötéshez tartozó körülmények a következők:

- Az adszorpcióval történő lakkáz megkötés 9 óra alatt, 29°C-on 3 mg/ml pH=4 pufferoldatban feloldott lakkázzal érhető el.
- A keresztkötés során a legnagyobb membrán aktivitás 4°C-on, 100 mM GA koncentrációval végzett 2 órás reakció esetén érhető el.

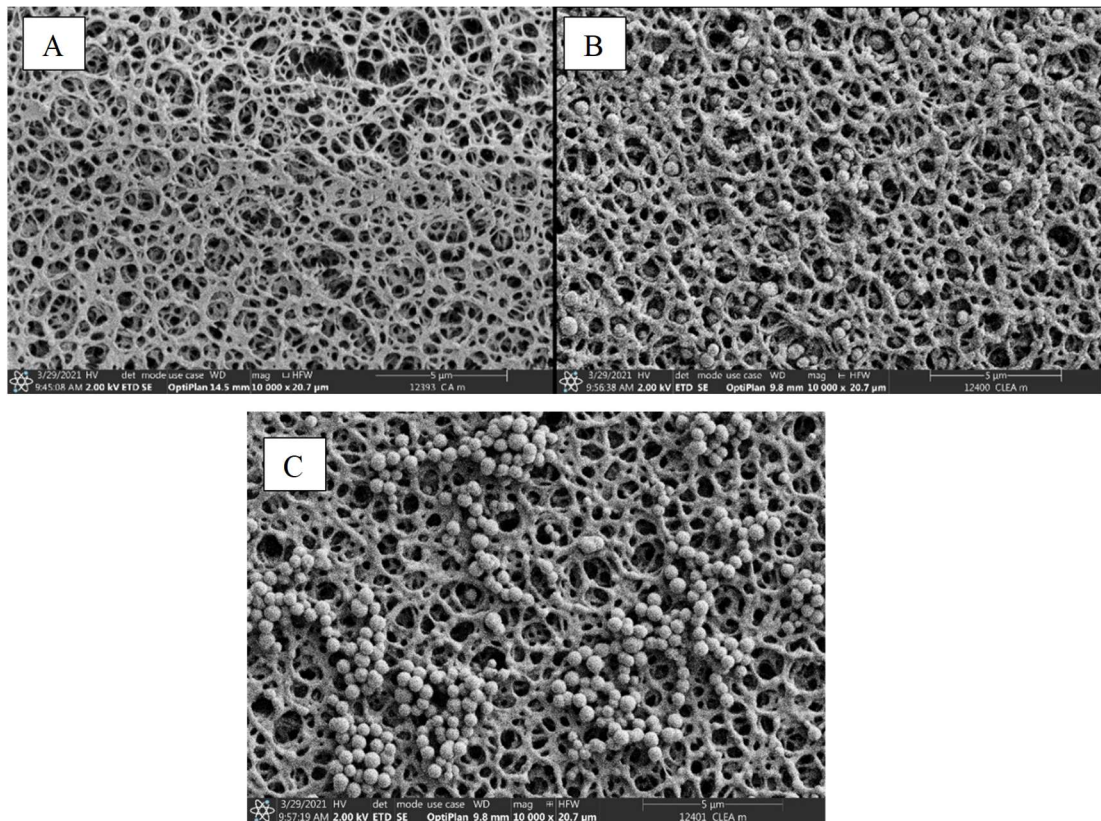
4.2.3 Membrán karakterizációja

A rögzítési módszer optimalizálását követően az előállított membránokat különböző, elsősorban a felhasználás szempontjából hasznos paraméterekkel jellemeztem. Ezek olvashatóak a következő fejezetekben.

4.2.3.1 Elektronmikroszkópos felvételek

Az előállított membránokról készült elektronmikroszkópos felvételek (27. ábra) alapján meghatároztam a membrán immobilizálás előtti és utáni pórusméretét. A képek elemzése alapján a kiindulási pórusméret: $0,19 \mu\text{m}$ ($SD=0,1 \mu\text{m}$, $n=176$), amely a kezelés hatására $0,24 \mu\text{m}$ -re ($SD=0,1 \mu\text{m}$, $n=477$) nőtt.

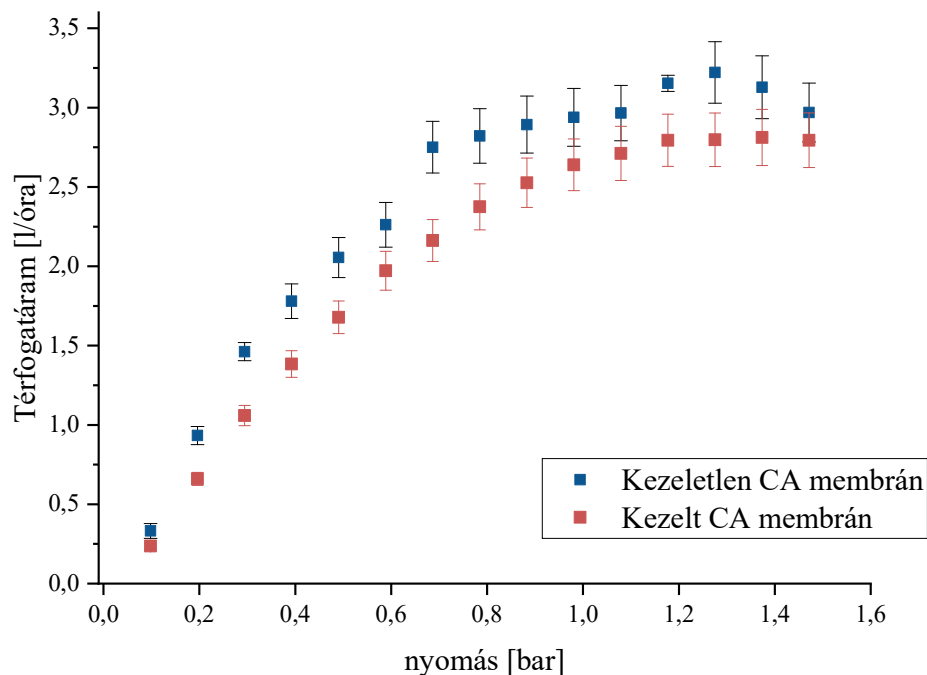
Az elektronmikroszkópos felvételeken (27. ábra) látszik, hogy a membrán felületén és annak pórusaiban gömbszerű képződmények alakultak ki. Ezek átmérője $0,39 \mu\text{m}$ ($SD=0,09 \mu\text{m}$, $n=82$).



27. ábra Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek a cellulóz-acetát membránról a kezelés előtt (A) és után (B, C)

4.2.3.2 Membrán fluxus változása

Az immobilizálást követően megvizsgáltam a membrán desztillált vízzel mért fluxusát az aggregátumok által okozott eltömődés hatásának vizsgálata érdekében. Bár a csökkenés mértéke kis mértékben függ a nyomástól, de elmondható, hogy minden vizsgált nyomás esetén eltérés jelentkezett a kezelt és a kezeletlen membrán között. A csökkenés mértéke átlagosan 21% (SD=12%, n=15) A különböző nyomások esetén mért térfogatáram, ahogy az a 28. ábra is látható.

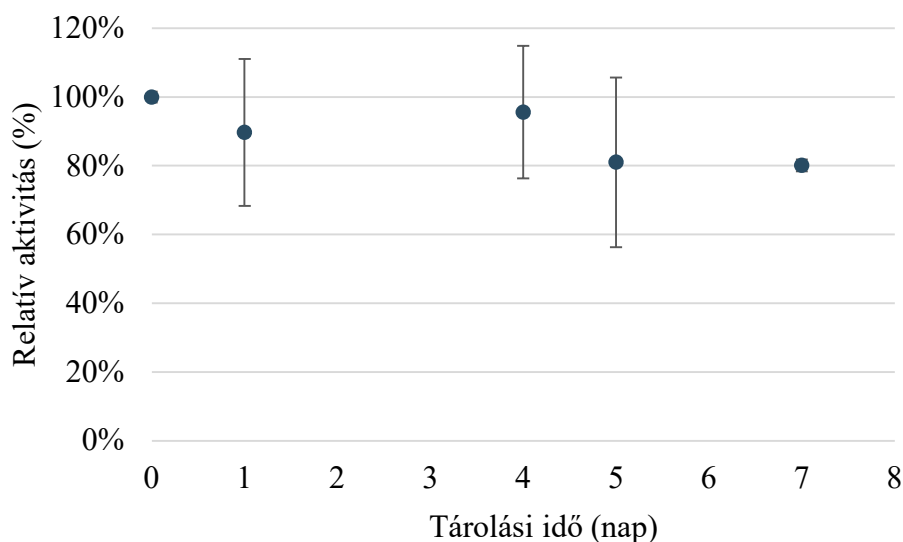


28. ábra Lakkáz tartalmú és kezeletlen membrán térfogatárama különböző nyomásokon

A kezeletlen cellulóz-acetát membrán a vizsgálat előtt desztillált vízzel történő öblítésen kívül nem esett át kezelésem. A kezelt membrán előállítása az optimalizált lakkáz immobilizálási protokollal történt.

4.2.3.3 Tárolási stabilitás

A membrán aktivitásának fokozatos csökkenését tapasztaltam a 4°C-on történő 7 napos tárolás során (29. ábra). A csökkenés lineáris jelleget mutat, mértéke hozzávetőlegesen 2,4%/nap.

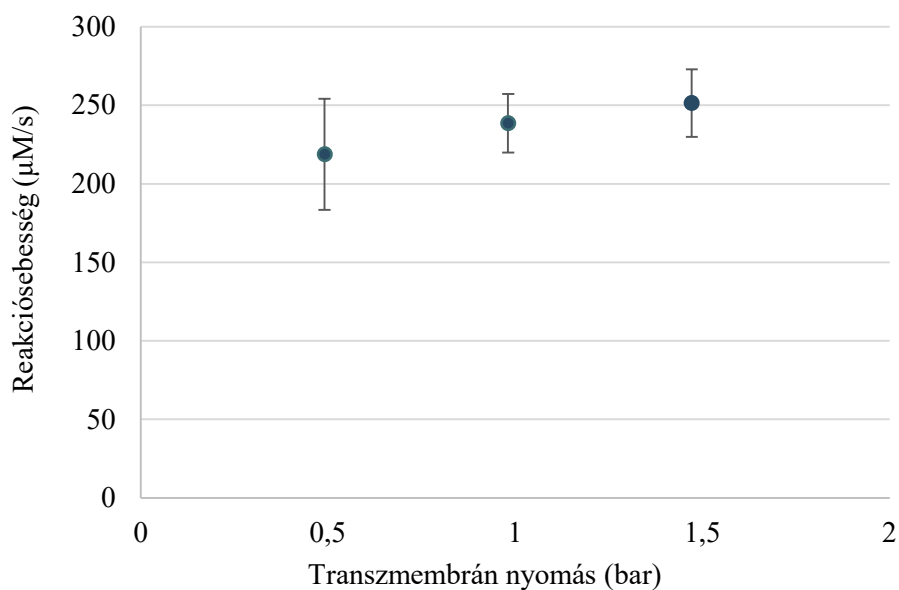


29. ábra Enzimátikus membrán tárolási stabilitásának vizsgálata

A vizsgálat elvégzéséhez az lakkáz tartalmú membránok az optimalizált protokollal kerültek előállításra. Az aktivitás méréséhez 0,5 mg/ml koncentrációjú pH=5 pufferoldatban feloldott ABTS került átszűrésre. A viszonyítás alapja az a kísérlet indításának napján mért aktivitás.

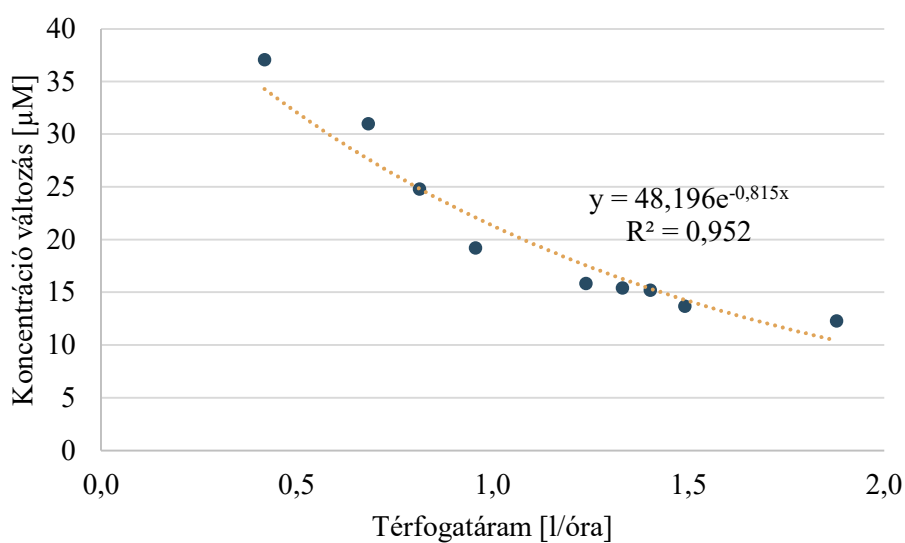
4.2.3.4 Konverzió-térfogatáram függése

Megvizsgáltam a lakkáz enzim aggregátumokat tartalmazó membránnal az ABTS átalakítás és a térfogatáram kapcsolatát. A különböző reduktor beállítások esetén mért reakciótermékek koncentrációjának változásából meghatároztam a reakció sebességét a (9) egyenlet alapján. A kísérleteket 3 különböző nyomásbeállítás (0,5, 1 és 1,5 bar) mellett végeztem el (30. ábra). Mivel a nyomás szabályozása reduktorral történt, az ismétlések során nem volt teljesen azonos a nyomás, azonban a reduktor jellegéből adódóan nem volt lehetőség az eltérések regisztrálására. A térfogatáramot azonban pontosan meg tudtam határozni a permeátum tömegének rögzítésével minden kísérletben, a 12. egyenlet alapján. Ezeket ábrázolva (31. ábra) a koncentráció változások függvényében egyértelmű exponenciális kapcsolat állapítható meg a rögzített lakkáz által katalizált reakció sebessége és a membránon átáramló szubsztrát tartózkodási ideje között.



30. ábra Nyomás és reakciósebesség közötti összefüggés

A kísérlet körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,5 mg/ml, pH=5, hőmérséklet: 22°C, membrán felülete: 12,34 cm², a membrán előállítsa az optimalizált immobilizációs protokollal történt.



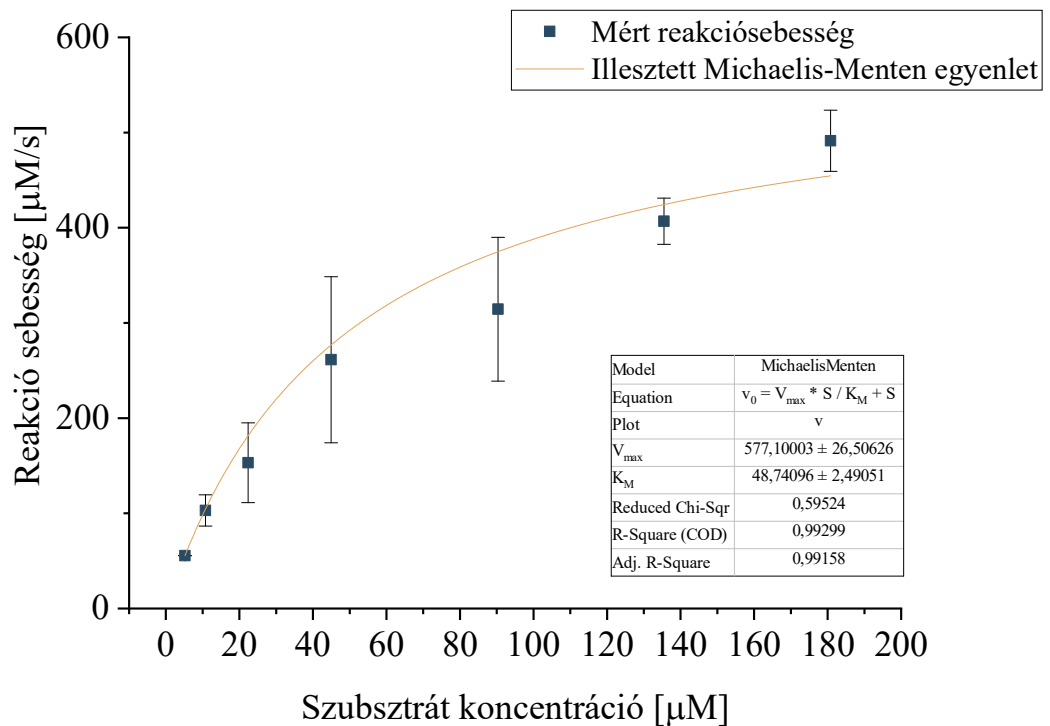
31. ábra Különböző térfogatáram esetén mért koncentráció változás

A kísérlet körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,5 mg/ml, pH=5, hőmérséklet: 22°C, membrán felülete: 12,34 cm², a membrán előállítsa az optimalizált immobilizációs protokollal történt.

4.2.3.5 Enzim kinetikai vizsgálatok membránon immobilizált lakkázzal

Az immobilizáció eredményeként az enzim szerkezetében bekövetkező változások hatásának vizsgálata céljából enzim kinetikai vizsgálatokat végeztem. A membránon átszűrt különböző koncentrációjú ABTS oldattal meghatároztam a reakciósebesség és a

szubsztrát közötti összefüggést. Az azonos nyomás rákapcsolásával végzett kísérletek során kapott reakciósebességekre illeszttem Michaelis-Menten kinetikai egyenletet (32. ábra). A kinetika jól illeszthető, a regressziós együttható értéke 0,99299-nak adódott. Ez alapján kijelenthető, hogy az enzimkatalitikus membránnal végzett átalakítás esetén a reakciósebesség és szubsztrát koncentráció közötti összefüggés jól jellemezhető a Michaelis-Menten kinetikai egyenlettel, és nem lép fel inhibíció a vizsgált koncentrációtartományon. A mérések alapján meghatározott V_{\max} értéke 577,1 $\mu\text{M/s}$, K_M értéke 48,74 μM .



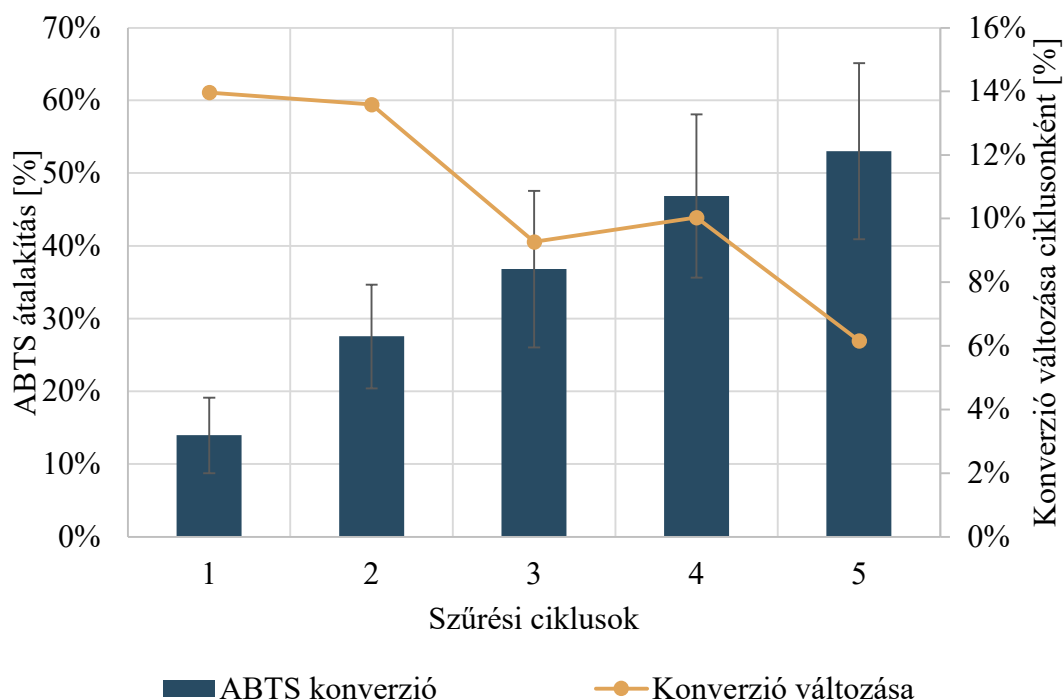
32. ábra Membránon immobilizált lakkáz enzimkinetikai vizsgálata

A kísérlet körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,006 – 0,750 mg/ml, pH=5, hőmérséklet: 22°C, membrán felülete: 12,34 cm², a membrán előállítsa az optimalizált immobilizációs protokollal történt.

4.2.3.6 Újrahasználat

Az enzimkatalitikus membrán ismételt felhasználásának vizsgálata elsőként ABTS szubsztráttal történt. Az ABTS oldatot több ciklusban szűrtem át a membránon és meghatároztam annak konverzióját (33. ábra). Az egyes szűrési ciklusokat követően mértem az oldat abszorbanciáját, majd abból meghatároztam a keletkező reakciótermékek mennyiségét. A vizsgálat alapján elmondható, hogy a membrán

visszaforgatással történő alkalmazásra alkalmas, mivel a konverziót növeli az ismételt feladás, azonban a ciklusok során elérhető konverzió növekedés mértéke fokozatosan csökkent.



33. ábra ABTS átalakítása enzimmkatalitikus membránnal több ciklusban

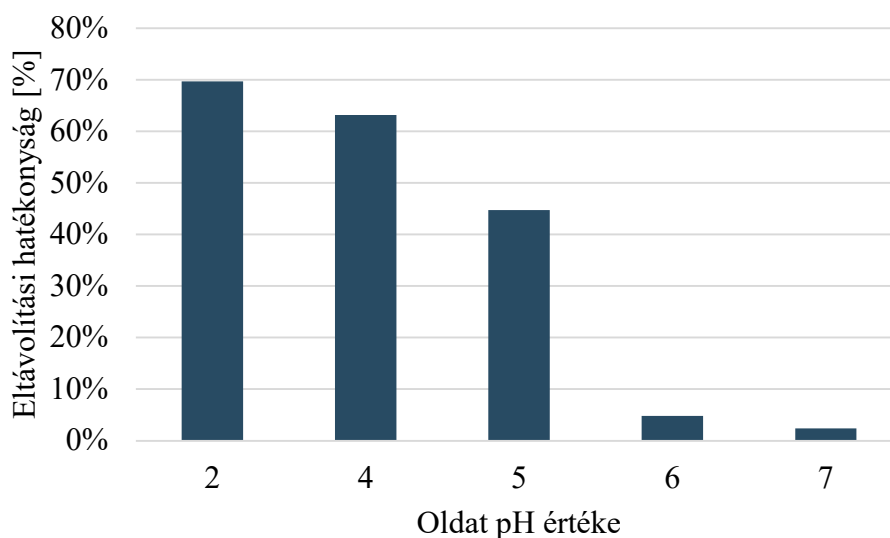
A vizsgálat során az enzimmkatalitikus membrán az optimalizált protokollal került előállításra. A vizsgálat körülményei: szubsztrát (ABTS) koncentráció: 0,5 mg/ml, pH=5, hőmérséklet: 20°C, használt membrán aktív felülete: 12,34 cm².

4.2.4 Diklofenák lebontása immobilizált lakkázzal

4.2.4.1 Lebontás egyszeri átszűréssel

Az optimalizált immobilizálási módszerrel előállított enzimmkatalitikus membránt diklofenák eltávolítására használtam. Ehhez a membránra feladott DCF oldatot elsőként nyomás rákapcsolása nélkül, gravitációs átszűréssel végeztem el. Az ismétlések során átlagosan 57,9 % (SD=0,6%, n=3) eltávolítási hatásfokot értem el egyszeri átszűréssel.

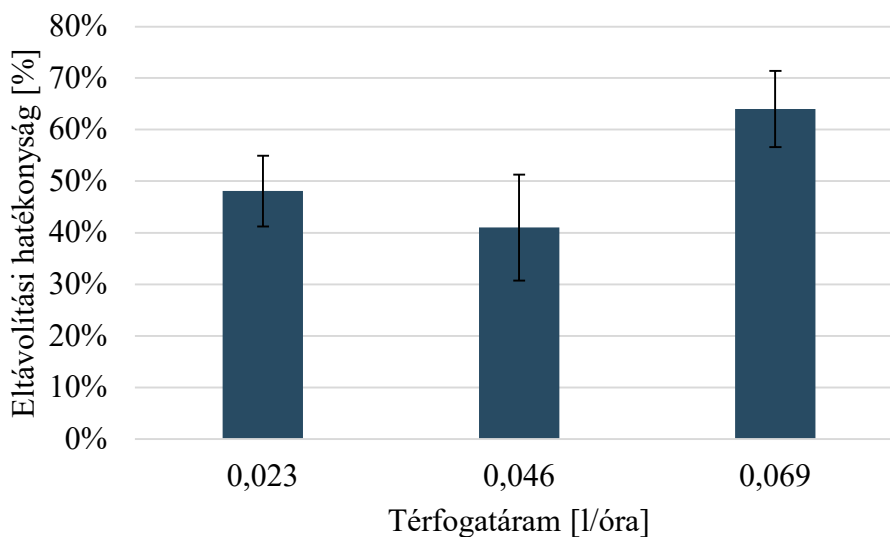
A pH hatásának vizsgálata érdekében rögzített (0,046 l/óra) térfogatárammal szűrtem át különböző pH értékű pufferoldatban feloldott DCF oldatot (34. ábra). Az erre vonatkozó kísérletek alapján kijelenthető, hogy az enzim aktivitásához hasonlóan, a savas közegben magasabb hatékonyság érhető el. Semleges pH értéken gyakorlatilag nem volt mérhető eltávolítás a membránnal végzett kísérletben.



34. ábra pH hatása a diklofenák eltávolítására enzimkatalitikus membránon

A kísérlet körülményei: DCF koncentráció: 1 mg/l, pH beállítás pufferoldattal, hőmérséklet: 20°C, térfogat: 50 ml, térfogatáram: 0,046 l/óra, dead-end szűrési üzemmód, membrán felület: 12,34 cm²

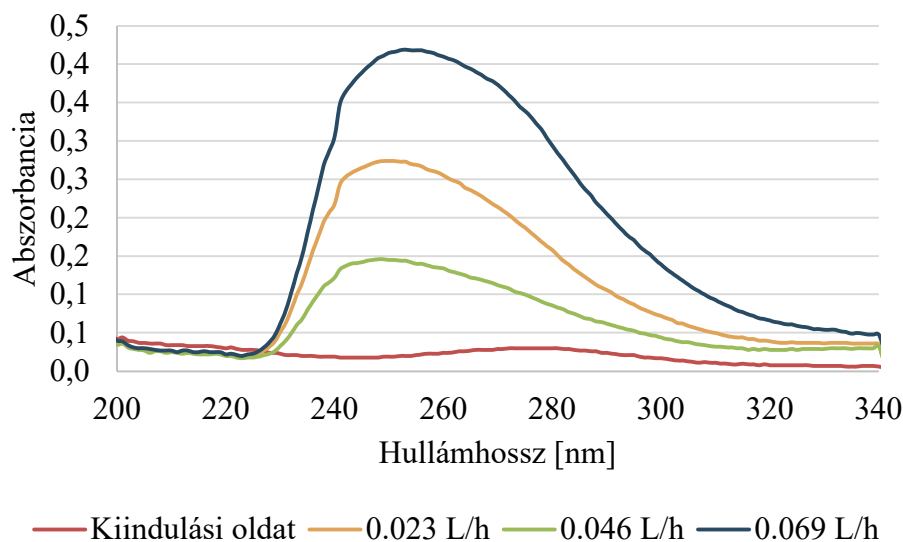
A DCF átalakítási kísérletet elvégeztem perisztaltikus szivattyúval szabályozott különböző térfogatáramok mellett is. Azt az eredményt kaptam, hogy a térfogatáram befolyásolja az elérhető eltávolítás hatékonyságát, ahogy az a 35. ábra is látható.



35. ábra Különböző térfogatárammal mért diklofenák eltávolítási hatékonyságok

A kísérlet körülményei: DCF koncentráció: 1 mg/l, pH=5, hőmérséklet: 20°C, térfogat: 50 ml, dead-end szűrési üzemmód, membrán felület: 12,34 cm²

A kísérletek során a permeátum UV abszorbanca spektruma növekvő elnyelést mutatott 220 – 340 nm közötti tartományon (36. ábra). A spektrum maximuma a kezelendő oldatban 278 nm körül van, míg a permeátumban 249 nm körül, azaz a csúcs maximuma eltolódott a lakkázzal végzett kezelés hatására. A különböző térfogatáramokkal elvégzett kísérlet során, ahogy a kromatográfiás módszerrel mért eltávolítási hatékonyságnál is, a legnagyobb abszorbanca növekedést a legnagyobb térfogatáram esetén mértem, míg a legkisebbet a 0,046 L/h térfogatáram esetén.



36. ábra Diklofenák UV-Vis spektrumának változása enzimatikus membránnal való kezelés során

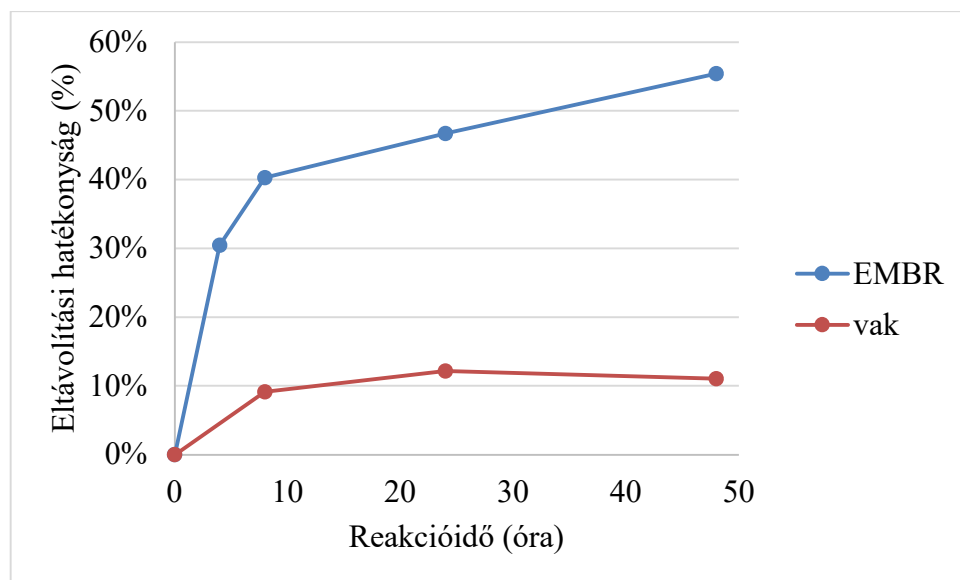
A kísérlet körülményei: DCF koncentráció: 1 mg/l, pH=5, hőmérséklet: 20°C, térfogat: 50 ml, dead-end szűrési üzemmód, membrán felület: 12,34 cm²

4.2.4.2 Lebontás folyamatos visszaforgatással

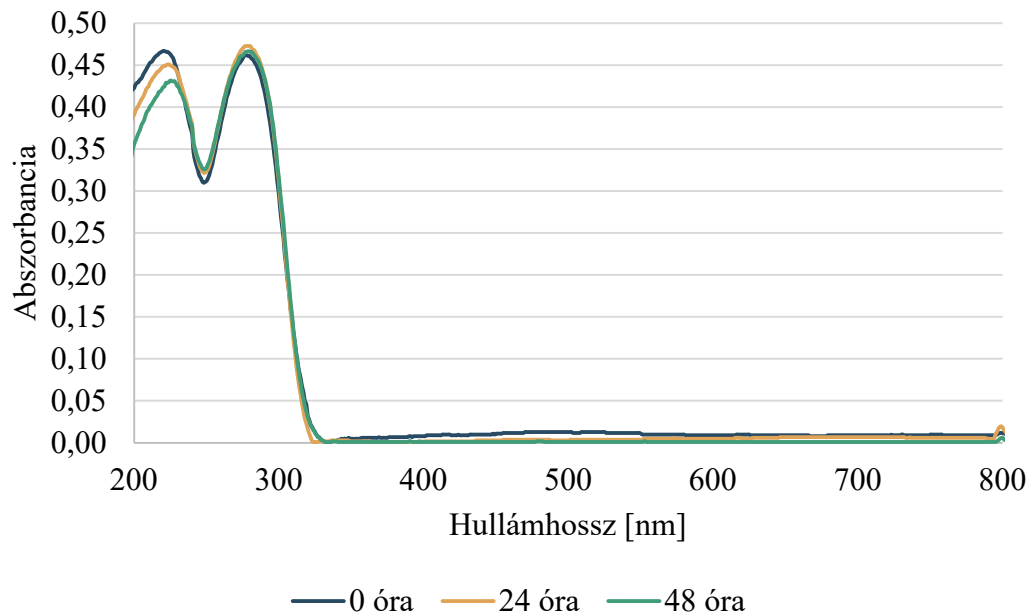
Az 1 mg/l DCF kezdeti koncentrációjú oldat kezelését folyamatos visszaforgatással is elvégeztem, nagyobb méretű membránnal egy EMBR rendszerben. A kísérlet során a DCF eltávolítási hatékonyságának fokozatos növekedését tapasztaltam (37. ábra). A 48 óra alatt elért eltávolítási hatékonyság 55%. Ez alacsonyabb, mint a kis méretű rendszerrel elért hatékonyság, azonban ennek oka részben a két kísérleti berendezés közötti különbségekből adódik. Egyrészt a nagy rendszerben nagyobb térfogattal kellett dolgozni, így az egységnyi enzimre eső átalakítandó szubsztrát aránya kis mértékben eltérő. Azaz hiába nagy az átalakítás az átszűrés során, ha a permeátum a teljes térfogatban a hígulás miatt csak kis koncentráció változást okoz. Másrészt a nagy rendszerben a feladás nem perisztaltikus, hanem centrifugál szivattyúval történik, így a

térfogatáram pontos szabályozására nincs lehetőség. Mivel a térfogatáram és a szivattyút vezérlő frekvenciaváltó között nincs visszacsatolás, eltömődés esetén nem a nyomás növekszik meg, mint a perisztaltikus szivattyú esetén, hanem a térfogatáram csökkent le. Ennek meghatározására azonban csak a kísérletet követően lenne lehetőség, az adatok letöltését követően. A vizsgálatok során azonban a permeátum folyamatos recirkuláltatása nem tette lehetővé a térfogatáram analitikai mérleggel történő folyamatos monitorozását, annak beállítása a kísérlet kezdetén történt meg. Az időszakosan elvégzett szemrevételezés alapján azonban egyértelműen csökkent a térfogatáram a kísérletek alatt. Ennek részletes vizsgálata más rendszer használatát igényelné.

A 24 és 48 óra után vett minták UV-Vis spektrumán nem látható az egyszeri átszűrés során tapasztalt abszorbancia növekedés és csúcs eltolódása, azonban a kezdeti 450 nm körüli csúcs eltűnése figyelhető meg (38. ábra). Bár ezen a hullámhosszon a használt készülék már kevésbé érzékeny, az abszorbancia csökkenés mértéke hozzávetőlegesen 90%. Az enzimkatalitikus membránnal végzett kísérletet követően a membránról készült fényképen azonban jól láthatóan eltávolításra került a sárga színt adó reakciótermékek egy része (39. ábra).



37. ábra Diklofenák eltávolítása enzimkatalitikus membránnal nagyméretű EMBR rendszerben



38. ábra UV spektrum változása EMBR rendszerből gyűjtött permeátumban

A kísérlet körülményei: DCF koncentráció: 1 mg/l, pH=5, hőmérséklet: 20°C, térfogat: 500 ml, dead-end szűrési üzemmód folyamatos recirkuláltatás, membrán felület: 42 cm²



39. ábra Enzimakatalitikus membrán EMBR-ben végzett diklofenák átalakítás után.

A folyamatos üzemi rendszerrel végzett kísérletek alapján elmondható, hogy a kifejlesztett membrán akár 48 óráig képes működni és a folyamatos üzem során a reakciótermékek egy része eltávolításra került.

5 Diszkusszió

5.1 Alginátban végzett lakkáz immobilizáció értékelése

A disszertációhoz kapcsolódó kutatás első lépéseként az alginátban történő enzim immobilizálási módszer használatát vizsgáltam meg.

A rögzítés során kapott immobilizálási hatékonyság alapján (98,2%), a felhasznált lakkáz nagy része az alginát gyöngyökbe került. Ennek ellenére a szabad és a gyöngyökben rögzített lakkáz látszólagos aktivitásának összehasonlítása során nagyságrendbeli különbséget állapítottam meg. Ez az immobilizáció során gyakori jelenség. A kevert reaktoros rendszerben való használat esetén, nagyobb mennyiségű immobilizált lakkáz adagolásával elérhető az aktivitás csökkenés kompenzációja (8. ábra). Ennek meghatározásához használható a fajlagos aktivitás tömegre, vagy a Daâssi és mtsi. [110] által is publikált, alginát gyöngyök darabszámára történő megadása. Ez a használt módszerrel 0,005 U/db-nak, illetve 0,000266 U/mg-nak adódott. Ez alapján a kiindulási 34 U/l aktivitás eléréséhez ~6800 db gyöngyöt, vagyis 127 g immobilizált lakkázt kell adagolni 1 liter térfogathoz. Figyelembe véve, hogy a szakirodalomban publikált kísérletek során 1000-2000 U/l aktivitást is használnak, aminek eléréséhez nagy mennyiségű katalizátor hozzáadására lenne szükség, az alginát gyöngyöket töltetes oszlopban célszerű alkalmazni.

Az alginát mátrixban rögzített lakkáz esetén mért látszólagos reakciókülönbség-csökkenés oka valószínűleg az, hogy a polimer befolyásolja az enzim hozzáférését a szubsztráthoz. Ahogy azt Tanaka és mtsi. [180]. is megállapították, a polimerben történő átalakítás során a szubsztrát diffúzió lehet a sebességmeghatározó lépés alginátban történő immobilizáció esetén. Ebből adódóan az aktivitásméréseket az is befolyásolta, hogy az ABTS és a belőle keletkező reakcióterméke feldúsultak az alginát gyöngyökben, így azok egy része nem volt mérhető spektrofotometriás módszerrel. Ez más komponensek esetén is fennáll, mivel a lakkáz által végzett átalakítás során a mikroszennyezőkből keletkező reakciótermékek általában összekapcsolódott szerves molekulák, megnövekedett molekulamérettel [5]. A nagyobb molekulák diffúziója az alginát polimerben eltér a kisebb méretű szubsztrátok diffúziós sebességétől [181], így azok valószínűleg feldúsulnak az enzimkatalitikus átalakítást követően.

Az előállított lakkáz-tartalmú alginát gyöngyök karakterizációja alapján megállapítható, hogy a rögzített lakkáz aktivitásának pH függése nem változott. A hőmérséklet hatásának vizsgálata során tapasztalt exponenciális növekedés hasonló a réz-alginátban immobilizált lakkáz esetén mért növekedéshez [172]. A szakirodalomban erre vonatkozó információk alapján az alginátban a lakkáz 40°C körül veszi fel a maximum értékét, azonban ezen a hőmérsékleten az alginát polimer is bomlik [172]. Mivel a szennyvíztisztításban ritkán fordul elő hasonlóan magas hőmérséklet, így a vizsgálatokat is csak 35°C-ig végeztem el.

A tárolásra vonatkozó vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az alginátban való csapdázást követően a lakkáz folyamatosan szivárog a gyöngyökből. A tárolás során jelentős mennyiségű lakkáz aktivitás csökkenés volt mérhető (bomlási állandó értéke: 0,26 1/nap). Ratanapongleka és mtsi. [86] hasonlóan az enzim szivárásáról számoltak be bárium-alginátban való rögzítés esetén. Kalcium-alginátban rögzített maltáz esetén pedig az általam meghatározott gyors aktivitás csökkenésnél kisebbet mértek, bár abban az esetben lényegesen hosszabb kereszt kötési idővel került rögzítésre az enzim [112]. Az enzim szivárgásának oka valószínűleg az alginát szerkezetére vezethető vissza. Amennyiben a létrehozott kalcium-alginát olyan közegbe kerül, amely nagy koncentrációban tartalmaz monovalens, Na^+ -ionokat, mint a vizsgálatokhoz használt puffer, az előállítás során lejátszódó ioncsere a fordított irányba tolódik el. A bivalens Ca^{2+} ionok által az α -L-glükuronsav és β -D-mannuronsav láncok között kialakított ionos kereszt kötések felbomlanak, ebből adódóan a polimer szerkezete szétesik, és az alginát feloldódik. A kezelendő közegekben valószínűleg nagy hatással van a biokatalizátor stabilitása is, így a vizsgálatokat célszerűnek tartom mindig a kezelendő közegben elvégezni.

5.2 Alginátban immobilizált diklofenák átalakításának értékelése

A diklofenák eltávolítása céljából végzett vizsgálatok alapján (16. ábra), egyértelműen megállapítható, hogy az alginát jelentős adszorpciós képességével hozzájárulhat a mikroszennyezők eltávolításához. Összehasonlítva azonban a lakkázal és lakkáz nélkül végzett kísérletek eredményét (4.1.2 fejezet) elmondható, hogy a lakkáz csak kis mértékben (~4%) járul hozzá a diklofenák eltávolításhoz. Ennek oka, valószínűleg az, hogy a lakkáz aktivitása jelentősen csökken az alginátban való rögzítés hatására, illetve hogy az előállított katalizátor csak kis mennyiségben áll enzimből (0,1%). Figyelembe véve az alginát és lakkáz nélkül végzett kísérletben tapasztalat

csökkenést, adszorpcióval történő eltávolítás hatékonysága 16%. Ezzel szemben az azonos mennyiségű szabad enzimmel 94,8%-os eltávolítást értem el azonos idő alatt.

Ahogy az ABTS esetén a gyöngyök színének változásából is látszik (13. ábra), az alginát képes megkötni bizonyos termékeket. Az UV-Vis spektrumok ezt alátámasztják diklofenák átalakítás esetén is (4.1.2 fejezet). A vak kísérletekben a spektrumon látható mindkét csúcs intenzitása csökken (17. ábra), míg a szabad lakkázzal való átalakítás során csak minimálisan változik (18. ábra), annak ellenére, hogy a vizsgált komponens koncentrációja a HPLC-vel végzett mérések alapján jelentősen csökken (eltávolítási hatásfok 94,8%). A lakkázzal végzett diklofenák átalakítására jellemző, hogy a keletkező reakciótermékek szerkezete hasonlít a kiindulási anyagéhoz [5], így annak UV-Vis spektruma is hasonlít a kiindulási komponenséhez. Diklofenák esetén a keletkező reakciótermékek az abszorbancia növekedését okozzák, ahogy az a szabad enzimmel különböző közegekben, membránon immobilizált lakkázzal végzett kísérletek esetén is tapasztalható volt (36. ábra). A keletkező reakciótermékek mivel a diklofenák molekulák összekapcsolódásából is létrejöhetnek, ezért a pufferoldatban jellemzően egy sárga színű termék is megjelenik [5], ami az elvégzett kísérletek során 450 nm környékén okozott kis mértékű elnyelést (18. ábra). Ezek reakciótermékek okozták valószínűleg a membrán elszíneződését a membránon immobilizált enzimmel végzett kísérletben is (39. ábra). Diklofenák esetén a szakirodalomban sárga [182] és barna [183] reakciótermékek megjelenésére vonatkozóan vannak információk. Ezeket hidroxiszármazékokként, illetve 4-(2,6-diklorofenilamino)-1,3-benzodimetanolként azonosították [183], de a vizsgált reakcióban a keletkező gyökök számos más reakcióterméket is képezhetnek [5].

Összehasonlítva az azonos mennyiségű szabad enzimmel elvégzett eltávolítás hatékonyságát az alginátban immobilizált enzimmel elért eltávolítással, kijelenthető, hogy az alginát használata kevésbé hatékony, azonban a reakciótermékek a gyöngyökben való megkötése miatt kedvező lehet bizonyos felhasználások esetén.

5.3 Membránon való immobilizáció értékelése

A membránon való immobilizáció első lépéseként, két különböző anyagú membrán összehasonlítását végeztem el. Ezek alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a cellulóz-acetát nagyobb mennyiségű lakkáz megkötésére alkalmas. Figyelembe véve, hogy a hidrofil PES membránok alkalmazásának egyik fő előnye, hogy a kis fehérje megkötő képességük [168] miatt nehezebben tömődnek el, a kísérlet a várakozásnak megfelelő

eredményt adta. Bár ez nem zárja ki a rögzítés lehetőségét a pórusok lakkáz oldattal való telítésével, az adszorpciónak köszönhető többlet enzim megkötés miatt a cellulóz-acetát membrán használatát részesítettem előnyben.

A lakkáz adszorpciója során a pH hatására vonatkozó eredményeket a szakirodalomban megjelent információk részben alátámasztották. Ahogy azt Saarinen és mtsi. [184] is megállapították, a pH érték csökkentésével nagyobb mennyiségű fehérje, stabilabban köthető meg a cellulóz felületen. Az erre vonatkozó vizsgálataim azt mutatták ki, hogy a megkötés azon a pH értéken a leghatékonyabb, amelyik a legtávolabb van a *Trametes versicolor* által termelt lakkáz izoelektromos pontjától ($pI = 5,8 - 6,1$ [185]). Ez az eredmény alátámasztja azt a felvetést, miszerint a fehérjék hidrofíli felületeken való adszorpciójának kedvez a fehérje izoelektromos pontjától távoli pH értéken kialakuló enyhe negatív töltése [186]. A szakirodalom szerint [187] a cellulóz-acetát töltése az enzimmel szemben csak kis mértékben változik a pH változásával. Ebből következőik, hogy a lakkáz aminosav csoportjainak protonálódása határozhatja meg az adszorpció hatékonyságának pH függését a vizsgált kísérletben.

Az adszorpció lépésben a lakkáz egy porózus anyagon kötődik meg. Általánosságban igaz, az adszorpció során a sebességmeghatározó lépés a pórusok belsejébe történő diffúzió. A diffúziós folyamatokat és a felületen való adszorpciót befolyásolja a hőmérséklet [188]. A vizsgálatok során azt tapasztaltam, hogy a hőmérséklet növelésével növelhető a megkötött enzim mennyisége. Ennek oka valószínűleg a diffúzió és az adszorpció hőmérséklet függésére vezethető vissza. Az adszorpció folyamat vizsgálatához célszerű adszorpció izotermákat felvenni, azonban a fehérjék adszorpciója során a fehérje szerkezete is dinamikusan változik, így erre nehezen vonhatóak le egyértelmű következtetések. Ehelyett a vizsgálatok során empirikus kísérleteket végeztem. Figyelembe vettem azonban azt, hogy a magasabb hőmérsékleten a lakkáz termikusan deaktiválódhat. Az erre vonatkozó vizsgálatokat a 4.2.2.2 fejezetben fejtettem ki. A kontroll vizsgálatok alapján egyértelmű, a magas hőmérsékleten történő denaturáció, így az optimalizálás során ezt a célfüggvényt megválasztásánál figyelembe vettem.

Mivel az adszorpció folyamatot a vizsgált rendszerben számos körülmény befolyásolja, ezért célszerű volt az optimalizáláshoz egy kísérleti tervet készíteni. Ebben olyan faktorokat vettem számításba, amelyek egyértelműen hatással vannak a vizsgált folyamatra, azonban azok blokkosított vizsgálata nem szolgáltatott volna megfelelő információt. A kísérleti tervben, számos előkísérletet követően, a lakkáz koncentrációja,

a hőmérséklet és az adszorpciós idő szerepelt. Előbbi elsősorban azért, mert maximalizálni kívántam a membrán fajlagos aktivitását, utóbbiak pedig a termikus denaturáció miatt kerültek felvételre.

Az elvégzett vizsgálatok során az aktivitás mérések szórása jelentősen megnehezítette a modellhez felhasználható adatok pontosságát. Ebből kifolyólag a kísérleti tervben szereplő beállításokon (5. táblázat) nem egy, hanem három ismétlést végeztem, amelyeknél minden aktivitás mérést is háromszor ismételt meg. Ezek átlagértékei kerültek felhasználásra a modell állandóinak illesztéséhez.

A modellben használt válaszfüggvény meghatározása során figyelembe vettem a termikus denaturáció következtében jelentkező aktivitás veszteséget is az 9. számú egyenlettel. Ezek alapján nem meglepő, hogy az illesztett polinom maximuma 30°C alatt van, mivel efelett nagyobb veszteség jelentkezik (4.2.2.2. fejezet). Az erre vonatkozó kísérletekből szintén jól látszik, hogy 30°C alatti a csökkenés elhanyagolható, így akár az adszorpciós egyensúly beállásáig van lehetőség végezni az immobilizációs folyamat adszorpciós lépését. Ennek megfelelően a polinom a maximumát a vizsgált tartomány szélsőértékében vette fel mind az idő, mind a lakkáz koncentrációja tekintetében.

Az adszorpciós lépéssel rögzíthető lakkáz aktivitásának maximalizálását követően, a cél a keresztkötéssel történő enzim stabilizálás volt, anélkül, hogy az enzim aktivitása a kémiai kötések hatására jelentősen csökkenjen. Ebből adódóan a keresztkötés optimalizációjánál teljes faktoriális kísérleti terv alapján végeztem el a vizsgálatokat. Az adszorpcióval rögzített lakkáz mennyisége kis mértékben változó, ami befolyásolná a rákövetkező lépés során kapott abszolút aktivitás értékeket. Ezt kiküszöbölendő a keresztkötés vizsgálatához az összes mérést, ami a kísérleti tervben szerepel egy nagy membránból kivágott, kisebb méretű membránlapokkal végeztem el. Így a keresztkötés során a kapott szórások csak a keresztkötési lépés megismételhetőségéből adódtak.

A keresztkötés optimalálása során kapott eredmények váratlan trendet mutattak (26. ábra). A keresztkötő koncentrációja a szobahőmérsékleten végzett kísérlet során nem befolyásolta a membrán aktivitását. Ezzel szemben a 4°C-ra hűtött kísérletben egyértelmű maximum adható meg 100 mM-os GA koncentráció használatakor. Az ennél alacsonyabb koncentráció nem képes elegendő mértékben stabilizálni az aggregátumokat a membránon, így azok valószínűleg a keresztkötést követő mosás során eltávolításra kerültek. A 100 mM feletti koncentráció azonban már túlságosan megváltoztatta a lakkáz szerkezetét, ami így veszített aktivitásából. Ez alátámasztja, azt

a feltételezést, hogy a glutáraldehid kis méretéből adódóan be tud jutni a fehérje belsejébe és ott is alakít ki intramolekuláris kötéseket, amelyek csökkenthetik a lakkáz aktivitását [189]. Az ilyen jellegű kötések számát befolyásolja a hőmérséklet is, így valószínűleg ezért volt jelentős eltérés a 20°C-on és 4°C-on végzett kísérlet után mért aktivitás értékek között.

Figyelembe véve az adszorpció és a keresztkötés vizsgálata során kapott eredményeket megállapítható, hogy a legnagyobb membrán aktivitás eléréséhez eltérő körülményeken célszerű végezni a lakkáz rögzítését cellulóz-acetát membránon.

A meghatározott optimális protokollal előállított enzimkatalitikus membrán karakterizációja során elsősorban olyan jellemzőket vizsgáltam, amelyek a membrán gyakorlati felhasználása szempontjából fontosak lehetnek.

Az első ilyen paraméter a membrán desztillált vizes fluxusának meghatározása. A vizsgálatok alapján elmondható, hogy a rögzítés hatására megváltozott a membrán áteresztő képessége, mivel minden vizsgált nyomásbeállítás mellett csökkenés mérhető (4.2.3.2. fejezet). Ennek oka a pórusok részleges eltömődésében keresendő. Az elektronmikroszkópos felvételek alapján a létrehozott aggregátumok mérete hasonló a membrán pórusainak méretével. Bár a SEM mérések során elsősorban a felületen elhelyezkedő aggregátumok láthatóak, azok már a felületen lerakódva is okozhatnak részleges eltömődést a pórusméret változás ellenére. A kezelés során a membrán pórusmérete kis mértékben megnövekedett, aminek oka valószínűleg az, hogy az adszorpció során a gyártó által megengedett legkisebb pH érték közelében történik az immobilizáció adszorpciós lépése.

Membránon való rögzítés szempontjából fontos paraméter a membrán tárolása és használat közben bekövetkező aktivitás csökkenés mértéke. A tárolás során a membrán aktivitása 2,4%-kal csökken naponta, ami elfogadható. Az újrahasználatra vonatkozó vizsgálat alapján azonban a többszöri 1 bar-os átszűrés hatására a membrán aktivitása idővel jelentősen csökken, így annak deaktiválódásával számolni kell.

A membrán használata szempontjából két fontos üzemeltetési paramétert határoztam meg. Az egyik ilyen a konverzió térfogatáram függése. A dead-end alkalmazás során az enzim és a szubsztrát közötti kontaktus csak addig történik, ameddig a szubsztrát átáramlik a membránon, így a térfogatáram hatását célszerű volt vizsgálni. Az ABTS-sel végzett vizsgálatok egyértelműen rámutattak erre az összefüggésre (4.2.3.4 fejezet). A térfogatáram csökkenésével a konverzió jelentősen növelhető egyszeri átszűrés

esetén. Ennek számszerűsítésére a 3.4.6. számú fejezetben foglaltak szerint határoztam meg a reakció sebességét.

A doktori dolgozatban a két módszer enzimkinetikai tulajdonságainak összehasonlításához az alapot az ABTS szubsztráttal végzett vizsgálatok adták. A membránon immobilizált lakkáz esetén az alginátban immobilizálthoz is a Michaelis-Menten kinetikai egyenlet illesztését végeztem el. Mindkét esetben a klasszikus szubsztrát-reakciósebesség görbét kaptam, amiből két fontos következtetés vonható le. Egyrészt mindkét esetben a mikroszennyezők koncentrációjának csökkenésével lassul az átalakítás, így csökken az adott idő alatt elérhető hatékonyság, másrészt nem tapasztalható inhibíció magasabb ABTS koncentráció esetén.

5.4 Membránon immobilizált lakkázzal végzett diklofenák átalakítás értékelése

Az előállított membránnal végzett kísérletek alapján kijelenthető, hogy az enzimkatalitikus membrán használható a DCF átalakítására, egyszeri átszűréssel és folyamatos visszaforgatással is.

A savas és semleges kémhatású diklofenák oldatokkal végzett lebontás során megállapítottam, hogy a savas közegben végzett kísérletek során nagyobb hatékonyság érhető el. Ennek háttere részben a DCF protonálódásával magyarázható. A DCF semleges közegben elsősorban deprotonált formában van ($pK_a = 4,2$). Ebben az állapotban az elektrosztatikus taszító erők gátolják az enzim-szusztrát komplex kialakulását [190]. Emellett a hatékonyság minden bizonnyal összefüggésben van az enzim aktivitásával is. Ahogy az az algináttal végzett kísérletben is látható volt, a savas kémhatás növeli az immobilizált lakkáz aktivitását.

A különböző térfogatáramokkal végzett kísérletek során az ABTS átalakítására kapott eredménytől eltérően befolyásolta az átalakítás hatékonyságát a térfogatáram változtatása. A térfogaráram a vizsgált tartományon egy minimum értéket vesz fel.

Érdekes eredmény, hogy a membránon való átalakítás során nem csak az abszorbancia növekedése figyelhető meg, mint az alginát esetén, hanem a csúcsok is eltolódtak kis mértékben. Ez valószínűleg a reakció mechanizmusának kis mértékű megváltozására utal. Ami a membrános alkalmazás során abból is adódhat, hogy a keletkező reakciótermékek nagy része, amely nem kötődik a membránhoz, folyamatosan eltávolításra kerül az enzim környezetéből. Ez a recirkuláltatás során nem történik meg, mivel az átszűrés után a reakciótermékeket is tartalmazó oldat

visszavezetésre kerül a membránra. Ebből adódhatott, hogy a folyamatos rendszerben a membrán elszíneződött (39. ábra) és a permeátumban nem változott az abszorbancia spektrum (38. ábra) számottevően UV tartományban, csak 450 nm-nél volt mérhető abszorbancia csökkenés. Azok a termékek azonban, amelyek képesek kötődni a membránhoz vagy csapadékként kiválnak az oldatból, a mikroszűrő membránnal elválasztásra kerültek. Ezek valószínűleg csökkentették is az enzim aktivitását termékgtátlás eredményeként. Erre vonatkozóan azonban, mivel a gátlást okozó reakciótermékek nem ismertek és nagyon sokfélék lehetnek további, modellezésen alapuló enzimkinetikai vizsgálatok elvégzését látom célszerűnek.

Irodalomjegyzék

- [1] C. F. Couto, L. C. Lange, és M. C. S. Amaral, „Occurrence, fate and removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) in water and wastewater treatment plants—A review”, *Journal of Water Process Engineering*, köt. 32, o. 100927, dec. 2019, doi: 10.1016/j.jwpe.2019.100927.
- [2] M. O. Barbosa, N. F. F. Moreira, A. R. Ribeiro, M. F. R. Pereira, és A. M. T. Silva, „Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495”, *Water Research*, köt. 94, o. 257–279, máj. 2016, doi: 10.1016/J.WATRES.2016.02.047.
- [3] D. Becker és mtsai., „Removal of endocrine disrupting chemicals in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccases”, *Organic Process Research & Development*, köt. 21, sz. 4, o. 480–491, ápr. 2017, doi: 10.1021/acs.oprd.6b00361.
- [4] M. Auriol, Y. Filali-Meknassi, C. D. Adams, R. D. Tyagi, T.-N. Noguerol, és B. Piña, „Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*”, *Chemosphere*, köt. 70, sz. 3, o. 445–452, jan. 2008, doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.06.064.
- [5] B. Varga, V. Somogyi, M. Meiczinger, N. Kováts, és E. Domokos, „Enzymatic treatment and subsequent toxicity of organic micropollutants using oxidoreductases - A review”, *Journal of Cleaner Production*, köt. 221, o. 306–322, jún. 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2019.02.135.
- [6] M. Lorenzo, D. Moldes, S. R. Couto, M. Pazos, és A. Sanromán, „Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*.”, *Bioresource Technology*, köt. 82, sz. 2, o. 109–113, ápr. 2002, doi: 10.1016/s0960-8524(01)00176-6.
- [7] J. F. Osma, J. L. Toca-Herrera, és S. Rodríguez-Couto, „Cost analysis in laccase production”, *Journal of Environmental Management*, köt. 92, sz. 11, o. 2907–2912, nov. 2011, doi: 10.1016/j.jenvman.2011.06.052.
- [8] G. Bertrand, „Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons”, *CR Hebd Seances Acad Sci*, köt. 123, o. 463–465, 1896.
- [9] A. Zerva, S. Simić, E. Topakas, és J. Nikodinovic-Runic, „Applications of Microbial Laccases: Patent Review of the Past Decade (2009–2019)”, *Catalysts*, köt. 9, sz. 12, Art. sz. 12, dec. 2019, doi: 10.3390/catal9121023.
- [10] A. S. Maryan és M. Montazer, „A cleaner production of denim garment using one step treatment with amylase/cellulase/laccase”, *Journal of Cleaner Production*, köt. 57, o. 320–326, okt. 2013, doi: 10.1016/j.jclepro.2013.05.041.
- [11] M. Tišma és mtsai., „Production, characterisation and immobilization of laccase for an efficient aniline-based dye decolourization”, *Journal of Water Process Engineering*, köt. 36, o. 101327, aug. 2020, doi: 10.1016/j.jwpe.2020.101327.
- [12] A. Lante, A. Crapisi, G. Pasini, A. Zamorani, és P. Spettoli, „Immobilized Laccase for Must and Wine Processing”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, köt. 672, sz. 1, o. 558–562, nov. 1992, doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb35669.x.
- [13] S. Witayakran és A. J. Ragauskas, „Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry”, *Advanced Synthesis & Catalysis*, köt. 351, sz. 9, o. 1187–1209, jún. 2009, doi: 10.1002/adsc.200800775.
- [14] S. Malinowski, C. Wardak, J. Jaroszyńska-Wolińska, P. A. F. Herbert, és K. Pietrzak, „New electrochemical laccase-based biosensor for dihydroxybenzene

- isomers determination in real water samples”, *Journal of Water Process Engineering*, köt. 34, o. 101150, ápr. 2020, doi: 10.1016/j.jwpe.2020.101150.
- [15] S. K. Moccelini, A. C. Franzoi, I. C. Vieira, J. Dupont, és C. W. Scheeren, „A novel support for laccase immobilization: Cellulose acetate modified with ionic liquid and application in biosensor for methyl dopa detection”, *Biosensors and Bioelectronics*, köt. 26, sz. 8, o. 3549–3554, ápr. 2011, doi: 10.1016/j.bios.2011.01.043.
- [16] Z. Vipotnik, M. Michelin, és T. Tavares, „Development of a packed bed reactor for the removal of aromatic hydrocarbons from soil using laccase/mediator feeding system”, *Microbiological Research*, köt. 245, o. 126687, ápr. 2021, doi: 10.1016/j.micres.2020.126687.
- [17] F. Spina, M. Gea, C. Bicchi, C. Cordero, T. Schilirò, és G. C. Varese, „Ecofriendly laccases treatment to challenge micropollutants issue in municipal wastewaters.” *Environ Pollut*, o. 113579–113589, 2020. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2019.113579.
- [18] J. Virkutyte, R. S. Varma, és V. Jegatheesan, Szerk., *Treatment of micropollutants in water and wastewater*. London: IWA Publishing, 2010.
- [19] S. Sauvé és M. Desrosiers, „A review of what is an emerging contaminant”, *Chemistry Central Journal*, köt. 8, sz. 1, o. 15, dec. 2014, doi: 10.1186/1752-153X-8-15.
- [20] K. Kümmerer, Szerk., *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects, and risks*, 3rd ed. Berlin: Springer, 2008.
- [21] J. P. Nash és mtsai., „Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish”, *Environmental Health Perspectives*, köt. 112, sz. 17, o. 1725–1733, 2004, doi: 10.1289/ehp.7209.
- [22] S. D. Costanzo, J. Murby, és J. Bates, „Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment”, *Marine Pollution Bulletin*, köt. 51, sz. 1, o. 218–223, 2005, doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.10.038.
- [23] K. Fent, A. A. Weston, és D. Caminada, „Ecotoxicology of human pharmaceuticals”, *Aquatic Toxicology*, köt. 76, sz. 2, o. 122–159, 2006, doi: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009.
- [24] A. Ginebreda, I. Muñoz, M. L. de Alda, R. Brix, J. López-Doval, és D. Barceló, „Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain)”, *Environment International*, köt. 36, sz. 2, o. 153–162, febr. 2010, doi: 10.1016/j.envint.2009.10.003.
- [25] M. Galus és mtsai., „Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish”, *Aquatic Toxicology*, köt. 132–133, o. 200–211, máj. 2013, doi: 10.1016/j.aquatox.2012.12.021.
- [26] K. Peschke, J. Geburzi, H.-R. Köhler, K. Wurm, és R. Triebkorn, „Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, köt. 106, o. 115–125, aug. 2014, doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.04.011.
- [27] K. Ślósarczyk, S. Jakóbczyk-Karpierz, J. Rózkowski, és A. J. Witkowski, „Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Water Environment of Poland: A Review”, *Water*, köt. 13, sz. 16, o. 2283, aug. 2021, doi: 10.3390/w13162283.

- [28] Q. Bu, X. Shi, G. Yu, J. Huang, B. Wang, és J. Wang, „Pay attention to non-wastewater emission pathways of pharmaceuticals into environments”, *Chemosphere*, köt. 165, o. 515–518, dec. 2016, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.078.
- [29] P. Verlicchi, M. Al Aukidy, A. Galletti, M. Petrovic, és D. Barceló, „Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment”, *Science of The Total Environment*, köt. 430, o. 109–118, júl. 2012, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.055.
- [30] M. Caniato, T. Tudor, és M. Vaccari, „International governance structures for health-care waste management: A systematic review of scientific literature”, *Journal of Environmental Management*, köt. 153, o. 93–107, ápr. 2015, doi: 10.1016/j.jenvman.2015.01.039.
- [31] N. Sammut Bartolo, L. M. Azzopardi, és A. Serracino-Inglott, „Pharmaceuticals and the environment”, *Early Human Development*, köt. 155, o. 105218, ápr. 2021, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2020.105218.
- [32] C. Vatovec, J. Kolodinsky, P. Callas, C. Hart, és K. Gallagher, „Pharmaceutical pollution sources and solutions: Survey of human and veterinary medication purchasing, use, and disposal”, *Journal of Environmental Management*, köt. 285, o. 112106, máj. 2021, doi: 10.1016/j.jenvman.2021.112106.
- [33] A. Rezaei Adaryani és O. Keen, „Occurrence of pharmaceuticals and plasticizers in leachate from municipal landfills of different age”, *Waste Management*, köt. 141, o. 1–7, márc. 2022, doi: 10.1016/j.wasman.2022.01.023.
- [34] C. Li és mtsai., „Veterinary antibiotics and estrogen hormones in manures from concentrated animal feedlots and their potential ecological risks”, *Environmental Research*, köt. 198, o. 110463, júl. 2021, doi: 10.1016/j.envres.2020.110463.
- [35] L. Wöhler, G. Niebaum, M. Krol, és A. Y. Hoekstra, „The grey water footprint of human and veterinary pharmaceuticals”, *Water Research X*, köt. 7, o. 100044, máj. 2020, doi: 10.1016/j.wroa.2020.100044.
- [36] N. H. Tran, M. Reinhard, és K. Y.-H. Gin, „Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review”, *Water Research*, köt. 133, o. 182–207, ápr. 2018, doi: 10.1016/j.watres.2017.12.029.
- [37] J. O. Eniola, R. Kumar, M. A. Barakat, és J. Rashid, „A review on conventional and advanced hybrid technologies for pharmaceutical wastewater treatment”, *Journal of Cleaner Production*, köt. 356, o. 131826, júl. 2022, doi: 10.1016/j.jclepro.2022.131826.
- [38] N. H. Tran és K. Y.-H. Gin, „Occurrence and removal of pharmaceuticals, hormones, personal care products, and endocrine disrupters in a full-scale water reclamation plant”, *Science of The Total Environment*, köt. 599–600, o. 1503–1516, dec. 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.097.
- [39] Manish Kumar és mtsai., „Critical Review on Negative Emerging Contaminant Removal Efficiency of Wastewater Treatment Systems: Concept, Consistency and Consequences”, *Bioresource Technology*, o. 127054–127054, márc. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2022.127054.
- [40] X.-S. Miao, J.-J. Yang, és C. D. Metcalfe, „Carbamazepine and Its Metabolites in Wastewater and in Biosolids in a Municipal Wastewater Treatment Plant”, *Environmental Science & Technology*, köt. 39, sz. 19, o. 7469–7475, szept. 2005, doi: 10.1021/es050261e.
- [41] B. Ravindran, N. H. Tran, és K. Y.-H. Gin, „Occurrence and removal of pharmaceuticals, hormones, personal care products, and endocrine disrupters in a

- full-scale water reclamation plant.”, *Science of The Total Environment*, köt. 599, o. 1503–1516, dec. 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.097.
- [42] J. Stevens-Garmon, J. E. Drewes, S. J. Khan, J. A. McDonald, Eric R.V. Dickenson, és E. R. V. Dickenson, „Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids.”, *Water Research*, köt. 45, sz. 11, o. 3417–3426, máj. 2011, doi: 10.1016/j.watres.2011.03.056.
- [43] A. S. Stasinakis, „Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion.”, *Bioresource Technology*, köt. 121, o. 432–440, okt. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.074.
- [44] T. G. Poulsen és K. Bester, „Organic Micropollutant Degradation in Sewage Sludge during Composting under Thermophilic Conditions”, *Environmental Science & Technology*, köt. 44, sz. 13, o. 5086–5091, jún. 2010, doi: 10.1021/es9038243.
- [45] K. Khan, E. Benfenati, és K. Roy, „Consensus QSAR modeling of toxicity of pharmaceuticals to different aquatic organisms: Ranking and prioritization of the DrugBank database compounds”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, köt. 168, o. 287–297, jan. 2019, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.10.060.
- [46] F. Spina és mtsai., „Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater: evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity”, *Journal of Cleaner Production*, köt. 100, o. 185–194, aug. 2015, doi: 10.1016/j.jclepro.2015.03.047.
- [47] S. de Boer, J. González-Rodríguez, J. J. Conde, és M. T. Moreira, „Benchmarking tertiary water treatments for the removal of micropollutants and pathogens based on operational and sustainability criteria”, *Journal of Water Process Engineering*, köt. 46, o. 102587, ápr. 2022, doi: 10.1016/j.jwpe.2022.102587.
- [48] A. T. Mathew és M. P. Saravanakumar, „Removal of micropollutants through bio-based materials as a transition to circular bioeconomy: Treatment processes involved, perspectives and bottlenecks”, *Environmental Research*, köt. 214, o. 114150, nov. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.114150.
- [49] Y. Yoon, P. Westerhoff, S. A. Snyder, és E. C. Wert, „Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products”, *Journal of Membrane Science*, köt. 270, sz. 1–2, o. 88–100, febr. 2006, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2005.06.045.
- [50] V. Camel és A. Bermond, „The use of ozone and associated oxidation processes in drinking water treatment”, *Water Research*, köt. 32, sz. 11, o. 3208–3222, nov. 1998, doi: 10.1016/S0043-1354(98)00130-4.
- [51] M. Ekblad, R. Juárez, P. Falås, K. Bester, M. Hagman, és M. Cimbritz, „Influence of operational conditions and wastewater properties on the removal of organic micropollutants through ozonation”, *Journal of Environmental Management*, köt. 286, o. 112205, máj. 2021, doi: 10.1016/j.jenvman.2021.112205.
- [52] R. Y. Krishnan, S. Manikandan, R. Subbaiya, M. Biruntha, M. Govarathanan, és N. Karmegam, „Removal of emerging micropollutants originating from pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water and wastewater by advanced oxidation processes: A review”, *Environmental Technology & Innovation*, köt. 23, o. 101757, aug. 2021, doi: 10.1016/j.eti.2021.101757.
- [53] S. Ziembowicz és M. Kida, „Limitations and future directions of application of the Fenton-like process in micropollutants degradation in water and wastewater treatment: A critical review”, *Chemosphere*, köt. 296, o. 134041, jún. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134041.

- [54] H. Sá, M. Michelin, T. Tavares, és B. Silva, „Current Challenges for Biological Treatment of Pharmaceutical-Based Contaminants with Oxidoreductase Enzymes: Immobilization Processes, Real Aqueous Matrices and Hybrid Techniques”, *Biomolecules*, köt. 12, sz. 10, o. 1489, okt. 2022, doi: 10.3390/biom12101489.
- [55] B. Sharma, A. K. Dangi, és P. Shukla, „Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review”, *Journal of Environmental Management*, köt. 210, o. 10–22, márc. 2018, doi: 10.1016/j.jenvman.2017.12.075.
- [56] S. Rodríguez Couto és J. L. Toca Herrera, „Industrial and biotechnological applications of laccases: A review”, *Biotechnology Advances*, köt. 24, sz. 5, o. 500–513, szept. 2006, doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003.
- [57] A. Pandey, Szerk., *Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products*. Amsterdam: Elsevier, 2017.
- [58] D. Singh Arora és R. Kumar Sharma, „Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications”, *Appl Biochem Biotechnol*, köt. 160, sz. 6, o. 1760–1788, márc. 2010, doi: 10.1007/s12010-009-8676-y.
- [59] F. Spina és mtsai., „Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater: evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity”, *Journal of Cleaner Production*, köt. 100, o. 185–194, aug. 2015, doi: 10.1016/j.jclepro.2015.03.047.
- [60] R. Sahay, „Fungal Laccase as a Green Catalyst”, *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, köt. 6, sz. 3, o. 045–058, jan. 2021, doi: 10.22161/ijeab.63.5.
- [61] K. Piontek, M. Antorini, és T. Choinowski, „Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers.”, *The Journal of biological chemistry*, köt. 277, sz. 40, o. 37663–9, okt. 2002, doi: 10.1074/jbc.M204571200.
- [62] T. Nakamura, „On the mechanism of the reaction of the reduced laccase with oxygen.”, *Biochimica et Biophysica Acta*, köt. 42, o. 499–505, jan. 1960, doi: 10.1016/0006-3002(60)90829-5.
- [63] J. Kujawa, M. Głodek, G. Li, S. Al-Gharabli, K. Knozowska, és W. Kujawski, „Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes.”, *Science of The Total Environment*, köt. 801, o. 149647, aug. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149647.
- [64] C. B. Elias és J. B. Joshi, „Role of hydrodynamic shear on activity and structure of proteins”, in *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*, köt. 59, Springer Berlin Heidelberg, 1998, o. 47–71. doi: 10.1007/BFb0102296.
- [65] K. A. Al-Maqdi és mtsai., „Challenges and Recent Advances in Enzyme-Mediated Wastewater Remediation—A Review”, *Nanomaterials*, köt. 11, sz. 11, o. 3124, nov. 2021, doi: 10.3390/nano11113124.
- [66] I. Pardo és S. Camarero, „Laccase engineering by rational and evolutionary design”, *Cell. Mol. Life Sci.*, köt. 72, sz. 5, o. 897–910, márc. 2015, doi: 10.1007/s00018-014-1824-8.
- [67] Young-Jin Kim, Young-Jin Kim, Y.-J. Kim, és J. A. Nicell, „Laccase-catalysed oxidation of aqueous triclosan”, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, köt. 81, sz. 8, o. 1344–1352, aug. 2006, doi: 10.1002/jctb.1507.
- [68] Z. A. Sinirlioglu, D. Sinirlioglu, és F. Akbas, „Preparation and characterization of stable cross-linked enzyme aggregates of novel laccase enzyme from *Shewanella putrefaciens* and using malachite green decolorization”, *Bioresource Technology*, köt. 146, o. 807–811, okt. 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.08.032.

- [69] A. Arsenault, H. Cabana, és J. P. Jones, „Laccase-Based CLEAs: Chitosan as a Novel Cross-Linking Agent”, *Enzyme Research*, köt. 2011, o. 1–10, júl. 2011, doi: 10.4061/2011/376015.
- [70] B. Thongnuanchan, R. Ninjan, E. Kalkornsurapranee, N. Lopattananon, és C. Nakason, „Glutaraldehyde as Ambient Temperature Crosslinking Agent of Latex Films from Natural Rubber Grafted with Poly(diacetone acrylamide)”, *J Polym Environ*, köt. 26, sz. 7, o. 3069–3085, júl. 2018, doi: 10.1007/s10924-018-1193-8.
- [71] S. D. Minteer, Szerk., *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols*, köt. 1504. New York, NY: Springer New York, 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-6499-4.
- [72] T. Jesionowski, J. Zdarta, és B. Krajewska, „Enzyme immobilization by adsorption: a review”, *Adsorption*, köt. 20, sz. 5–6, o. 801–821, aug. 2014, doi: 10.1007/s10450-014-9623-y.
- [73] S. Velasco-Lozano, F. López-Gallego, J. C. Mateos-Díaz, és E. Favela-Torres, „Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review”, *Biocatalysis*, köt. 1, sz. 1, jan. 2016, doi: 10.1515/boca-2015-0012.
- [74] M. Naghdi, M. Taheran, S. K. Brar, A. Kermanshahi-pour, M. Verma, és R. Y. Surampalli, „Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral acids treatment for removal of carbamazepine”, *Science of The Total Environment*, köt. 584–585, o. 393–401, ápr. 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.021.
- [75] A. Das, J. Singh, és Y. K.N., „Laccase immobilized magnetic iron nanoparticles: Fabrication and its performance evaluation in chlorpyrifos degradation”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, köt. 117, o. 183–189, 2017, doi: 10.1016/j.ibiod.2017.01.007.
- [76] Z. Deng, F. Wang, B. Zhou, J. Li, B. Li, és H. Liang, „Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application”, *Food Hydrocolloids*, köt. 89, o. 691–699, ápr. 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.11.031.
- [77] M. de Cazes és mtsai., „Design and optimization of an enzymatic membrane reactor for tetracycline degradation”, *Catalysis Today*, köt. 236, o. 146–152, nov. 2014, doi: 10.1016/j.cattod.2014.02.051.
- [78] A. S. Şahutoğlu és C. Akgül, „One-phase synthesis of single enzyme nanoparticles (SENs) of *Trametes versicolor* laccase by *in situ* acrylamide polymerisation”, *Biocatalysis and Biotransformation*, köt. 38, sz. 1, o. 64–74, jan. 2020, doi: 10.1080/10242422.2019.1642879.
- [79] T. M. de S. Bezerra, J. C. Bassan, V. T. de O. Santos, A. Ferraz, és R. Monti, „Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice”, *Process Biochemistry*, köt. 50, sz. 3, o. 417–423, márc. 2015, doi: 10.1016/j.procbio.2014.12.009.
- [80] J. George és mtsai., „Insolubilization of *Trametes versicolor* laccase as cross-linked enzyme aggregates for the remediation of trace organic contaminants from municipal wastewater”, *Environmental Research*, köt. 209, o. 112882, jún. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.112882.
- [81] X. S. Zhao, X. Y. Bao, W. Guo, és F. Y. Lee, „Immobilizing catalysts on porous materials”, *Materials Today*, köt. 9, sz. 3, o. 32–39, márc. 2006, doi: 10.1016/S1369-7021(06)71388-8.
- [82] L. T. Nguyen, N. Seow, és K.-L. Yang, „Hollow cross-linked enzyme aggregates (h-CLEA) of laccase with high uniformity and activity”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, köt. 151, o. 88–94, márc. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.12.006.

- [83] D. Becker és mtsai., „Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase - Degradation of compounds does not always eliminate toxicity”, *Bioresource Technology*, köt. 219, o. 500–509, 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2016.08.004.
- [84] M. de Cazes és mtsai., „Design and optimization of an enzymatic membrane reactor for tetracycline degradation”, *Catalysis Today*, köt. 236, sz. PART A, o. 146–152, nov. 2014, doi: 10.1016/j.cattod.2014.02.051.
- [85] C. Barrios-Estrada és mtsai., „Potentialities of active membranes with immobilized laccase for Bisphenol A degradation”, *International Journal of Biological Macromolecules*, köt. 108, o. 837–844, márc. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.177.
- [86] K. Ratanapongleka és S. Punbut, „Removal of acetaminophen in water by laccase immobilized in barium alginate”, *Environmental Technology*, o. 1–10, márc. 2017, doi: 10.1080/09593330.2017.1301563.
- [87] S. Ba és mtsai., „Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters”, *Science of the Total Environment*, 2014, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.004.
- [88] S. Ba, J. P. Jones, és H. Cabana, „Hybrid bioreactor (HBR) of hollow fiber microfilter membrane and cross-linked laccase aggregates eliminate aromatic pharmaceuticals in wastewaters”, *Journal of Hazardous Materials*, köt. 280, o. 662–670, szept. 2014, doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.08.062.
- [89] C. Nicolucci és mtsai., „Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads”, *Biodegradation*, köt. 22, sz. 3, o. 673–683, jún. 2011, doi: 10.1007/s10532-010-9440-2.
- [90] M. Catapane és mtsai., „Enzymatic removal of estrogenic activity of nonylphenol and octylphenol aqueous solutions by immobilized laccase from *Trametes versicolor*”, *Journal of Hazardous Materials*, o. 337–346, márc. 2013, doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.01.031.
- [91] K. Rahmani és mtsai., „Elimination and detoxification of sulfathiazole and sulfamethoxazole assisted by laccase immobilized on porous silica beads”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, köt. 97, o. 107–114, jan. 2015, doi: 10.1016/j.ibiod.2014.10.018.
- [92] V. V. Kumar és H. Cabana, „Towards high potential magnetic biocatalysts for on-demand elimination of pharmaceuticals”, *Bioresource Technology*, köt. 200, o. 81–89, jan. 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2015.09.100.
- [93] J. Yang, Y. Lin, X. Yang, T. B. Ng, X. Ye, és J. Lin, „Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway”, *Journal of Hazardous Materials*, köt. 322, o. 525–531, jan. 2017, doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.10.019.
- [94] T. T. Le, K. Murugesan, C.-S. Lee, C. H. Vu, Y.-S. Chang, és J.-R. Jeon, „Degradation of synthetic pollutants in real wastewater using laccase encapsulated in core-shell magnetic copper alginate beads”, *Bioresource Technology*, köt. 216, o. 203–210, szept. 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2016.05.077.
- [95] G. Hommes és mtsai., „Production of a robust nanobiocatalyst for municipal wastewater treatment”, *Bioresource Technology*, köt. 115, o. 8–15, júl. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.129.
- [96] A. Arca-Ramos és mtsai., „Assessing the use of nanoimmobilized laccases to remove micropollutants from wastewater”, *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, doi: 10.1007/s11356-015-5564-6.

- [97] M. Maryšková és mtsai., „Laccase and horseradish peroxidase for green treatment of phenolic micropollutants in real drinking water and wastewater.”, *Environmental Science and Pollution Research*, köt. 28, sz. 24, o. 31566–31574, 2021, doi: 10.1007/s11356-021-12910-0.
- [98] J. Zhang, X. Liu, Z. Xu, H. Chen, és Y. Yang, „Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, köt. 61, sz. 4, o. 351–356, jún. 2008, doi: 10.1016/j.ibiod.2007.06.015.
- [99] P. Sathishkumar és mtsai., „Laccase-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber: Highly stable, reusable, and efficacious for the transformation of diclofenac”, *Enzyme and Microbial Technology*, köt. 51, sz. 2, o. 113–118, júl. 2012, doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.05.001.
- [100] P. Brandi, A. D’Annibale, C. Galli, P. Gentili, és A. S. N. Pontes, „In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, köt. 41, sz. 1–2, o. 61–69, júl. 2006, doi: 10.1016/j.molcatb.2006.04.012.
- [101] M. Bilal és M. Asgher, „Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase”, *BMC Biotechnology*, köt. 15, sz. 1, o. 111, dec. 2015, doi: 10.1186/s12896-015-0227-8.
- [102] S. Rouhani, A. Rostami, és A. Salimi, „Preparation and characterization of laccases immobilized on magnetic nanoparticles and their application as a recyclable nanobiocatalyst for the aerobic oxidation of alcohols in the presence of TEMPO”, *RSC Adv.*, köt. 6, sz. 32, o. 26709–26718, 2016, doi: 10.1039/C6RA00103C.
- [103] K. N. Niladevi és P. Prema, „Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, köt. 24, sz. 7, o. 1215–1222, 2008, doi: 10.1007/s11274-007-9598-x.
- [104] F. Gao, X. Liu, W. Chen, W. Guo, L. Chen, és D. Li, „Hydroxyl radical pretreatment for low-viscosity sodium alginate production from brown seaweed”, *Algal Research*, köt. 34, o. 191–197, szept. 2018, doi: 10.1016/J.ALGAL.2018.07.017.
- [105] B. Fazekas, V. Pitás, P. Thury, és Á. Kárpáti, „Examination of the Use of Support Materials of Natural Origin in Wastewater Treatment”, *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, köt. 37, sz. 1, o. 5–10–10, 2009, doi: 10.1515/215.
- [106] Q. Li és mtsai., „Filtration and adsorption properties of porous calcium alginate membrane for methylene blue removal from water”, *Chemical Engineering Journal*, köt. 316, o. 623–630, 2017, doi: 10.1016/j.cej.2017.01.098.
- [107] B. Jadach, Weronika Świetlik, és A. Froelich, „Sodium Alginate as a Pharmaceutical Excipient: Novel Applications of a Well-known Polymer.”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, jan. 2022, doi: 10.1016/j.xphs.2021.12.024.
- [108] M. S. A. Aziz és H. E. Salama, „Developing multifunctional edible coatings based on alginate for active food packaging.”, *International Journal of Biological Macromolecules*, köt. 190, o. 837–844, szept. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.031.
- [109] Z. Deng, F. Wang, B. Zhou, J. Li, B. Li, és H. Liang, „Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application”, *Food Hydrocolloids*, köt. 89, sz. June 2018, o. 691–699, 2019, doi: S0268005X18310452.
- [110] D. Daâssi, S. Rodríguez-Couto, M. Nasri, és T. Mechichi, „Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloopsis gallica* into Ca-alginate

- beads”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, köt. 90, o. 71–78, máj. 2014, doi: 10.1016/j.ibiod.2014.02.006.
- [111] K. I. Draget, G. Skjåk-Bræk, és O. Smidsrød, „Alginate based new materials”, *International Journal of Biological Macromolecules*, köt. 21, sz. 1–2, o. 47–55, aug. 1997, doi: 10.1016/S0141-8130(97)00040-8.
- [112] M. A. Nawaz, H. U. Rehman, Z. Bibi, A. Aman, és S. A. Ul Qader, „Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix”, *Biochemistry and Biophysics Reports*, köt. 4, o. 250–256, dec. 2015, doi: 10.1016/j.bbrep.2015.09.025.
- [113] A. S. Bommarius és B. R. Riebel, *Biocatalysis*. Weinheim ; Cambridge: Wiley-VCH, 2004.
- [114] M. Chhabra, S. Mishra, T. R. Sreekrishnan, és T. R. Sreekrishnan, „Laccase/mediator assisted degradation of triarylmethane dyes in a continuous membrane reactor.”, *Journal of Biotechnology*, köt. 143, sz. 1, o. 69–78, aug. 2009, doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.06.011.
- [115] P. Le-Clech, V. Chen, és T. A. G. Fane, „Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment”, *Journal of Membrane Science*, köt. 284, sz. 1–2, o. 17–53, nov. 2006, doi: 10.1016/j.memsci.2006.08.019.
- [116] M. de Cazes, M.-P. Belleville, M. Mougél, M. Mougél, H. Kellner, és J. Sanchez-Marcano, „Characterization of laccase-grafted ceramic membranes for pharmaceuticals degradation”, *Journal of Membrane Science*, köt. 476, o. 384–393, febr. 2015, doi: 10.1016/j.memsci.2014.11.044.
- [117] V. Chea, D. Paolucci-Jeanjean, M.-P. Belleville, és J. Sanchez, „Optimization and characterization of an enzymatic membrane for the degradation of phenolic compounds”, *Catalysis Today*, köt. 193, sz. 1, o. 49–56, okt. 2012, doi: 10.1016/j.cattod.2011.12.033.
- [118] R. Abejón, M. de Cazes, M.-P. Belleville, és J. Sanchez-Marcano, „Large-scale enzymatic membrane reactors for tetracycline degradation in WWTP effluents.”, *Water Research*, köt. 73, o. 118–131, ápr. 2015, doi: 10.1016/j.watres.2015.01.012.
- [119] C. Barrios-Estrada és mtsai., „Potentialities of active membranes with immobilized laccase for Bisphenol A degradation.”, *International Journal of Biological Macromolecules*, köt. 108, o. 837–844, okt. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.177.
- [120] W. Edwards, W. D. Leukes, P. D. Rose, és S. G. Burton, „Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent bioremediation”, *Enzyme and Microbial Technology*, köt. 25, sz. 8, o. 769–773, nov. 1999, doi: 10.1016/S0141-0229(99)00116-7.
- [121] J. Hou, G. Dong, Y. Ye, és V. Chen, „Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes”, *Journal of Membrane Science*, köt. 452, sz. 452, o. 229–240, febr. 2014, doi: 10.1016/j.memsci.2013.10.019.
- [122] J. Hou, G. Dong, Y. Ye, és V. Chen, „Enzymatic degradation of bisphenol-A with immobilized laccase on TiO₂ sol–gel coated PVDF membrane”, *Journal of Membrane Science*, köt. 469, sz. 469, o. 19–30, nov. 2014, doi: 10.1016/j.memsci.2014.06.027.
- [123] J. Zhang, S. Ding, Y. Ge, és Z. Li, „Enhanced removal of crystal violet in water using a facile-fabricated and environmental-friendly laccase immobilized composite membrane”, *Process Biochemistry*, köt. 98, o. 122–130, nov. 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2020.07.021.

- [124] S. Yang és mtsai., „Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review.”, *Bioresource Technology*, köt. 141, o. 97–108, aug. 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.173.
- [125] L. N. Nguyen, F. I. Hai, J. A. McDonald, S. J. Khan, W. E. Price, és L. D. Nghiem, „Continuous transformation of chiral pharmaceuticals in enzymatic membrane bioreactors for advanced wastewater treatment”, *Water Science and Technology*, köt. 76, sz. 7, o. 1816–1826, okt. 2017, doi: 10.2166/wst.2017.331.
- [126] M. Auriol, Y. Filali-Meknassi, R. D. Tyagi, és C. D. Adams, „Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater”, *Water Research*, köt. 41, sz. 15, o. 3281–3288, 2007, doi: 10.1016/j.watres.2007.05.008.
- [127] Q. Xia, D. Kong, G. Liu, Q. Huang, A. Alalewi, és J. Lu, „Removal of 17 β -estradiol in laccase catalyzed treatment processes”, *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, köt. 8, sz. 3, o. 372–378, jún. 2014, doi: 10.1007/s11783-013-0567-3.
- [128] L. N. Nguyen és mtsai., „The effects of mediator and granular activated carbon addition on degradation of trace organic contaminants by an enzymatic membrane reactor”, *Bioresource Technology*, köt. 167, o. 169–177, szept. 2014, doi: 10.1016/j.biortech.2014.05.125.
- [129] N. H. Tran, J. Hu, és T. Urase, „Removal of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) by laccase-mediated systems”, *Bioresource Technology*, köt. 147, o. 667–671, nov. 2013, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2013.08.113.
- [130] K. Li, F. Xu, és K. E. Eriksson, „Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound”, *Appl Environ Microbiol*, köt. 65, sz. 6, o. 2654–2660, jún. 1999, doi: 10.1128/AEM.65.6.2654-2660.1999.
- [131] M. Fabbrini, C. Galli, és P. Gentili, „Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, köt. 16, sz. 5, o. 231–240, 2002, doi: 10.1016/S1381-1177(01)00067-4.
- [132] C. Johannes és A. Majcherczyk, „Laccase activity tests and laccase inhibitors”, *Journal of Biotechnology*, köt. 78, sz. 2, o. 193–199, márc. 2000, doi: 10.1016/S0168-1656(00)00208-X.
- [133] A. I. Cañas és S. Camarero, „Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes”, *Biotechnology Advances*, köt. 28, sz. 6, o. 694–705, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.002.
- [134] Z.-B. Guan, Q. Luo, H.-R. Wang, Y. Chen, és X.-R. Liao, „Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications”, *Cell. Mol. Life Sci.*, köt. 75, sz. 19, o. 3569–3592, okt. 2018, doi: 10.1007/s00018-018-2883-z.
- [135] J. Margot, P.-J. Copin, U. von Gunten, D. A. Barry, és C. Holliger, „Sulfamethoxazole and isoproturon degradation and detoxification by a laccase-mediator system: Influence of treatment conditions and mechanistic aspects”, *Biochemical Engineering Journal*, köt. 103, o. 47–59, 2015, doi: 10.1016/j.bej.2015.06.008.
- [136] A. Yousefi-Ahmadipour, M. Bozorgi-Koshalshahi, M. Mogharabi, M. Amini, M. Ghazi-Khansari, és M. A. Faramarzi, „Laccase-catalyzed treatment of ketoconazole, identification of biotransformed metabolites, determination of kinetic parameters, and evaluation of micro-toxicity”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, köt. 133, o. 77–84, 2016, doi: 10.1016/j.molcatb.2016.07.015.

- [137] S. Zeng, X. Qin, és L. Xia, „Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems”, *Biochemical Engineering Journal*, köt. 119, o. 92–100, 2017, doi: 10.1016/j.bej.2016.12.016.
- [138] S.-S. Weng, S.-M. Liu, és H.-T. Lai, „Application parameters of laccase-mediator systems for treatment of sulfonamide antibiotics”, *Bioresource Technology*, köt. 141, o. 152–159, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.02.093.
- [139] L. Lloret, G. Eibes, T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, G. Feijoo, és J. M. Lema, „Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens”, *Biochemical Engineering Journal*, köt. 51, sz. 3, o. 124–131, 2010, doi: 10.1016/j.bej.2010.06.005.
- [140] Y. Tsutsumi, T. Haneda, és T. Nishida, „Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes”, *Chemosphere*, köt. 42, sz. 3, o. 271–276, febr. 2001, doi: 10.1016/S0045-6535(00)00081-3.
- [141] D. Daâssi, A. Prieto, H. Zouari-Mechichi, M. J. Martínez, M. Nasri, és T. Mechichi, „Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, köt. 110, o. 181–188, 2016, doi: 10.1016/j.ibiod.2016.03.017.
- [142] A. L. Parra Guardado, M.-P. Belleville, M. de J. Rostro Alanis, R. Parra Saldívar, és J. Sanchez-Marcano, „Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: A comparative study”, *Process Biochemistry*, köt. 78, o. 123–131, márc. 2019, doi: 10.1016/j.procbio.2018.12.032.
- [143] C. Ji, J. Hou, K. Wang, Y. Zhang, és V. Chen, „Biocatalytic degradation of carbamazepine with immobilized laccase-mediator membrane hybrid reactor”, *Journal of Membrane Science*, köt. 502, o. 11–20, márc. 2016, doi: 10.1016/j.memsci.2015.12.043.
- [144] Y.-J. Kim és J. A. Nicell, „Laccase-catalysed oxidation of aqueous triclosan”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, köt. 81, sz. 8, o. 1344–1352, aug. 2006, doi: 10.1002/jctb.1507.
- [145] J. Margot, J. Maillard, L. Rossi, D. A. Barry, és C. Holliger, „Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase”, *New Biotechnology*, köt. 30, sz. 6, o. 803–813, szept. 2013, doi: 10.1016/j.nbt.2013.06.004.
- [146] L. N. Nguyen és *mtsai.*, „Enhancement of trace organic contaminant degradation by crude enzyme extract from *Trametes versicolor* culture: Effect of mediator type and concentration”, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, köt. 45, sz. 4, o. 1855–1862, júl. 2014, doi: 10.1016/j.jtice.2014.03.021.
- [147] J. Zdarta és *mtsai.*, „Robust biodegradation of naproxen and diclofenac by laccase immobilized using electrospun nanofibers with enhanced stability and reusability”, *Materials Science and Engineering: C*, köt. 103, o. 109789, okt. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109789.
- [148] S. Nicotra, A. Intra, G. Ottolina, S. Riva, és B. Danieli, „Laccase-mediated oxidation of the steroid hormone 17 β -estradiol in organic solvents”, *Tetrahedron: Asymmetry*, köt. 15, sz. 18, o. 2927–2931, 2004, doi: 10.1016/j.tetasy.2004.06.034.
- [149] X. Li és *mtsai.*, „Bioconversion of non-steroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and naproxen by chloroperoxidase”, *Biochemical Engineering Journal*, köt. 120, o. 7–16, 2017, doi: 10.1016/j.bej.2016.12.018.
- [150] Q. Xia, D. Kong, G. Liu, Q. Huang, A. Alalewi, és J. Lu, „Removal of 17 β -estradiol in laccase catalyzed treatment processes”, *Frontiers of Environmental*

- Science & Engineering*, köt. 8, sz. 3, o. 372–378, jún. 2014, doi: 10.1007/s11783-013-0567-3.
- [151] R.-N. Dou, J.-H. Wang, Y.-C. Chen, és Y.-Y. Hu, „The transformation of triclosan by laccase: Effect of humic acid on the reaction kinetics, products and pathway”, *Environmental Pollution*, köt. 234, o. 88–95, márc. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2017.10.119.
- [152] R. Abejón, M.-P. Belleville, és J. Sanchez-Marcano, „Design, economic evaluation and optimization of enzymatic membrane reactors for antibiotics degradation in wastewaters”, *Separation and Purification Technology*, köt. 156, o. 183–199, dec. 2015, doi: 10.1016/j.seppur.2015.09.072.
- [153] A. Arca-Ramos és mtsai., „Assessing the use of nanoimmobilized laccases to remove micropollutants from wastewater”, *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, doi: 10.1007/s11356-015-5564-6.
- [154] J. Zdarta, K. Antecká, R. Frankowski, A. Zgoła-Grzeškowiak, H. Ehrlich, és T. Jesionowski, „The effect of operational parameters on the biodegradation of bisphenols by *Trametes versicolor* laccase immobilized on *Hippospongia communis* spongin scaffolds”, *Science of The Total Environment*, köt. 615, o. 784–795, febr. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.213.
- [155] M. Maryšková, I. Ardao, C. A. García-González, L. Martinová, J. Rotková, és A. Ševců, „Polyamide 6/chitosan nanofibers as support for the immobilization of *Trametes versicolor* laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals”, *Enzyme and Microbial Technology*, köt. 89, o. 31–38, júl. 2016, doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.03.001.
- [156] M. Catapane és mtsai., „Enzymatic removal of estrogenic activity of nonylphenol and octylphenol aqueous solutions by immobilized laccase from *Trametes versicolor*”, *Journal of Hazardous Materials*, köt. 248–249, o. 337–346, márc. 2013, doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.01.031.
- [157] I. V. Pylypchuk, V. G. Kessler, és G. A. Seisenbaeva, „Simultaneous Removal of Acetaminophen, Diclofenac, and Cd(II) by *Trametes versicolor* Laccase Immobilized on Fe₃O₄/SiO₂-DTPA Hybrid Nanocomposites”, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, köt. 6, sz. 8, o. 9979–9989, aug. 2018, doi: 10.1021/acssuschemeng.8b01207.
- [158] F. Gassara, S. K. Brar, M. Verma, és R. D. Tyagi, „Bisphenol A degradation in water by ligninolytic enzymes”, *Chemosphere*, köt. 92, sz. 10, o. 1356–1360, aug. 2013, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.02.071.
- [159] „Environmental and Safety Issues With Nanoparticles”, in *Nanoparticle Technology Handbook*, Elsevier, 2018, o. 365–395. doi: 10.1016/B978-0-444-64110-6.00007-X.
- [160] A. Merakchi, S. Bettayeb, N. Drouiche, L. Adour, és H. Lounici, „Cross-linking and modification of sodium alginate biopolymer for dye removal in aqueous solution”, *Polymer Bulletin*, köt. 76, sz. 7, o. 3535–3554, 2018, doi: 10.1007/s00289-018-2557-x.
- [161] D. Daassi, S. Rodríguez-Couto, M. Nasri, és T. Mechichi, „Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloropsis gallica* into Ca-alginate beads”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, köt. 90, o. 71–78, 2014, doi: 10.1016/j.ibiod.2014.02.006.
- [162] F. M. Olajuyigbe, O. Y. Adetuyi, és C. O. Fatokun, „Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A”, *International Journal of Biological Macromolecules*, köt. 125, o. 856–864, márc. 2019, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2018.12.106.

- [163] L. Lloret, G. Eibes, M. T. Moreira, G. Feijoo, és J. M. Lema, „Removal of estrogenic compounds from filtered secondary wastewater effluent in a continuous enzymatic membrane reactor. Identification of biotransformation products.”, *Environmental Science & Technology*, köt. 47, sz. 9, o. 4536–4543, ápr. 2013, doi: 10.1021/es304783k.
- [164] L. N. Nguyen és mtsai., „Degradation of a broad spectrum of trace organic contaminants by an enzymatic membrane reactor: Complementary role of membrane retention and enzymatic degradation”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, köt. 99, o. 115–122, ápr. 2015, doi: 10.1016/j.ibiod.2014.12.004.
- [165] M. Taheran, M. Naghdi, S. K. Brar, E. J. Knystautas, M. P. Verma, és R. Y. Surampalli, „Covalent Immobilization of Laccase onto Nanofibrous Membrane for Degradation of Pharmaceutical Residues in Water”, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, köt. 5, sz. 11, o. 10430–10438, okt. 2017, doi: 10.1021/acssuschemeng.7b02465.
- [166] C. Ji, J. Hou, és V. Chen, „Cross-linked carbon nanotubes-based biocatalytic membranes for micro-pollutants degradation: Performance, stability, and regeneration”, *Journal of Membrane Science*, köt. 520, o. 869–880, dec. 2016, doi: 10.1016/j.memsci.2016.08.056.
- [167] W. Guo és mtsai., „Laccase-syringaldehyde-mediated degradation of trace organic contaminants in an enzymatic membrane reactor: removal efficiency and effluent toxicity”, *Bioresource Technology*, köt. 200, o. 477–484, jan. 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.054.
- [168] „Hawach Membrane filters”, *Hawach Scientific*.
<https://www.hawachmembrane.com/>
- [169] R. E. Childs és W. G. Bardsley, „The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen”, *Biochemical Journal*, köt. 145, sz. 1, o. 93–103, jan. 1975, doi: 10.1042/bj1450093.
- [170] S. Tavazzi és mtsai., *Water Framework Directive, watch list method: analysis of diclofenac in water: validation report, according to ISO 17025 requirements*. Luxembourg: Publications Office, 2014.
- [171] M. Meiczinger, „Mikroszennyezők mennyiségi mérésének validálása HPLC-n”, Pannon Egyetem, Veszprém, 2020.
- [172] S. Zhang, Z. Wu, G. Chen, és Z. Wang, „An Improved Method to Encapsulate Laccase from *Trametes versicolor* with Enhanced Stability and Catalytic Activity”, *Catalysts*, köt. 8, sz. 7, o. 286, júl. 2018, doi: 10.3390/catal8070286.
- [173] G. Rancaño, M. Lorenzo, N. Molares, S. Rodríguez Couto, és M. Á. Sanromán, „Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor”, *Process Biochemistry*, köt. 39, sz. 4, o. 467–473, dec. 2003, doi: 10.1016/S0032-9592(03)00083-9.
- [174] V. Hlady, J. Buijs, és H. P. Jennissen, „[26] Methods for studying protein adsorption”, in *Methods in Enzymology*, köt. 309, Elsevier, 1999, o. 402–429. doi: 10.1016/S0076-6879(99)09028-X.
- [175] N. D. Koromilas, C. Anastasopoulos, E. K. Oikonomou, és J. K. Kallitsis, „Preparation of Porous Polymeric Membranes Based on a Pyridine Containing Aromatic Polyether Sulfone”, *Polymers*, köt. 11, sz. 1, o. 59, jan. 2019, doi: 10.3390/polym11010059.
- [176] A. Bódalo, J. L. Gómez, E. Gómez, J. Bastida, J. L. Iborra, és A. Manjón, „Analysis of diffusion effects on immobilized enzymes on porous supports with reversible Michaelis-Menten kinetics”, *Enzyme and Microbial Technology*, köt. 8, sz. 7, o. 433–438, júl. 1986, doi: 10.1016/0141-0229(86)90153-5.

- [177] N. Hilal, R. Nigmatullin, és A. Alpatova, „Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes”, *Journal of Membrane Science*, köt. 238, sz. 1–2, o. 131–141, júl. 2004, doi: 10.1016/j.memsci.2004.04.002.
- [178] „CF042 Cell Assembly, Crossflow, Delrin (CF042D)”, <https://www.sterlitech.com/cf042-crossflow-cell-cf042.html>.
- [179] R. Pype, J. Septavaux, B. Oulad Haj Amar, és F. Debaste, „Polymerization and formation of insoluble byproducts of diclofenac using *Trametes versicolor* laccases – Experimental study and modelling”, *Journal of Water Process Engineering*, köt. 32, o. 100948, dec. 2019, doi: 10.1016/j.jwpe.2019.100948.
- [180] H. Tanaka, M. Matsumura, és I. A. Veliky, „Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads”, *Biotechnol. Bioeng.*, köt. 26, sz. 1, o. 53–58, jan. 1984, doi: 10.1002/bit.260260111.
- [181] J. M. C. Puguán, X. Yu, és H. Kim, „Diffusion characteristics of different molecular weight solutes in Ca–alginate gel beads”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, köt. 469, o. 158–165, márc. 2015, doi: 10.1016/j.colsurfa.2015.01.027.
- [182] J. Margot, J. Maillard, L. Rossi, D. A. Barry, és C. Holliger, „Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase”, *New Biotechnology*, köt. 30, sz. 6, o. 803–813, szept. 2013, doi: 10.1016/j.nbt.2013.06.004.
- [183] E. Marco-Urrea, M. Pérez-Trujillo, C. Cruz-Morató, G. Caminal, és T. Vicent, „Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR”, *Journal of Hazardous Materials*, köt. 176, sz. 1–3, o. 836–842, ápr. 2010, doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.11.112.
- [184] T. Saarinen, H. Orelma, S. Grönqvist, M. Andberg, S. Holappa, és J. Laine, „Adsorption of different laccases on cellulose and lignin surfaces”, *BioResources*, köt. 4, sz. 1, o. 94–110, 2009.
- [185] B. Bertrand, F. Martínez-Morales, R. Tinoco-Valencia, S. Rojas, L. Acosta-Urdapilleta, és M. R. Trejo-Hernández, „Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions”, *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, köt. 122, o. 339–347, 2015.
- [186] W. Norde, „Driving forces for protein adsorption at solid surfaces”, *Macromol. Symp.*, köt. 103, sz. 1, o. 5–18, jan. 1996, doi: 10.1002/masy.19961030104.
- [187] N. Li és mtsai., „Synthesis and Characterization of a High Flux Nanocellulose–Cellulose Acetate Nanocomposite Membrane”, *Membranes*, köt. 9, sz. 6, o. 70, jún. 2019, doi: 10.3390/membranes9060070.
- [188] Peter, W., Atkins, *Fizikai kémia III.*, 6., köt. 3, 3 köt. Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó, 2002.
- [189] S. Velasco-Lozano, F. López-Gallego, J. C. Mateos-Díaz, és E. Favela-Torres, „Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review”, *Biocatalysis*, köt. 1, sz. 1, jan. 2016, doi: 10.1515/boca-2015-0012.
- [190] M. M. Huber, S. Canonica, G.-Y. Park, és U. von Gunten, „Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes”, *Environ. Sci. Technol.*, köt. 37, sz. 5, o. 1016–1024, márc. 2003, doi: 10.1021/es025896h.

Új tudományos eredmények, 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. (4.1.1.1 – 4.1.1.4 fejezetek)

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. (4.1.1.8 fejezet) Az alginát gyöngyökben immobilizált lakkázzal végzett diklofenák kezelés esetén, az eltávolítás meghatározó mechanizmusa az alginát mátrixban történő adszorpció. (4.1.2 fejezet)

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 adszorpció 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. (4.2.2.3 fejezet)

- **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. (4.2.2.4 fejezet)
- **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. (4.2.3.1 fejezet).
- 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 térfogatárama a nyomástól függően, átlagosan 21%-kal csökkent. (4.2.3.2. fejezet)

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 azonban a térfogatáram-konverziót leíró függvény minimumot vesz fel, a vizsgált 0,02 – 0,07 liter/óra közötti tartományon. (4.2.3.4. fejezet)

Kapcsolódó publikációk: 3, 13

5. Mérési adatok segítségével megerősítettem, hogy a szabad enzimmel és **membránon immobilizált enzimmel 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 enzimmel 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 kiválnak az oldatból. Az enzimátikus membránnal végzett átalakítás során egyszeri átszűrés esetén ezen reakciótermékek nem kerülnek eltávolításra, azonban a permeátum visszaforgatásával ezek egy része eltávolítható. (4.2.4. fejezet)

Kapcsolódó publikációk: 1, 3, 5, 6, 8

Theses

I. Immobilisation of laccase in alginate matrix

1. Laccase can be immobilised in a calcium-alginate matrix with high immobilisation efficiency; **however, the specific activity of the catalyst produced is low** due to the inhibitory effect of diffusion. The immobilisation efficiency of the entrapment in alginate beads is 98.2%, while the laccase corresponds only to a small portion of total mass (0.1% of wet mass and 3% of dry mass). The specific activity of the free laccase used for immobilisation is 457 U/mg, while the trapped enzyme has only 0.00026 U/mg apparent activity. (See chapters 4.1.1.2 - 4.1.1.4)

Related publications: 4

2. During the utilisation of laccase immobilised in an alginate matrix, the **adsorption process has a great effect on the removal of diclofenac**. In the case of conversion of ABTS substrate, the products are accumulating in the alginate beads, which results in colouration of the beads and lower measurable activity (See Chapter 4.1.1.8). In the case of the transformation of the diclofenac, the main removal mechanism is the adsorption of the compound in the alginate matrix instead of the enzymatic transformation. (See Chapter 4.1.2)

Related publications: 4, 7

II. Immobilisation of laccase in microfiltration membrane pores

3. I successfully immobilised laccase in cellulose acetate membrane with a two-step method. First, the laccase was adsorbed on the membrane, and then it was stabilized by making cross-linked enzyme-aggregated in/on the membrane.
 - I concluded that during the adsorption of laccase on the membrane, **an increase in temperature could improve the immobilisation efficiency, but denaturation by high temperature must be considered**. By fine-tuning the parameters of the adsorption process, the highest immobilisation efficiency was

achieved by the following conditions: pH=4, laccase concentration: 3 mg/ml, adsorption time: 9 hours, and temperature: 29°C. (See Chapter 4.2.2.3)

- I concluded that the effect of **the glutaraldehyde concentration during cross-linking is only significant in lower temperatures**, and the activity of the membrane could be improved by cooling to 4°C. The maximum membrane activity was achieved by cross-linking at 4°C with 100 mM glutaraldehyde concentration for 2 hours. (See Chapter 4.2.2.4)
- **During the immobilisation with the developed method, intermolecular chemical bonds have been formed between enzyme molecules, which produce aggregates.** Scanning Electron Microscopy has been used to confirm that process. As a result, I concluded that the average diameter of aggregates on the membrane is 0.39 µm. (See Chapter 4.2.3.1).
- I concluded that **the pore size and the membrane's permeability had been changed during the immobilisation process.** The pore size has been increased from 0.19 µm to 0.24 µm. The flow rate change depended on the pressure applied, but the average was a 21% decrease. (See Chapter 4.2.3.2.)

Related publications: 3, 8, 13

4. I concluded that **the conversion of the substrate with the enzymatic membrane produced depends on the volumetric flow rate.** In the case of the ABTS reaction, the conversion of the substrate and the volumetric flow is inversely proportional in the range of 0.4 - 1.9 l/hour. In the case of lower flow rates (0.02 - 0.07 l/h), what I used for diclofenac conversion, a minimum flow rate value can be determined for the maximal efficiency. (See Chapter 4.2.3.4)

Related publications: 3, 13

5. Some of **the low-solubility reaction products of diclofenac transformation, catalysed by free or immobilised laccase, could be removed by microfiltration.**
 - I concluded that in the chemical reaction catalysed by oxidoreductase enzymes, based on the analysis of literature information, I found that **the toxicity of the**

resulting reaction products can vary depending on the given component, therefore it is advisable to develop immobilization methods that are also suitable for removing these substances. The resulting reaction products in the reaction catalysed by laccase are usually coupled molecules, which can be separated by adsorption or membrane separation processes.

- Some reaction products of the laccase catalysed transformation result in a yellow discolouration, with light absorbance around 450 nm. Precipitates are formed from these since the water solubility of these products is considerably lower than the initial compound. These compounds cannot be eliminated during the catalysis with one-time dead-end filtration but recirculating the solution can be removed. (See Chapter. 4.2.4.)

Related publications: 1, 3, 5, 6, 8

Publikációk lista

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, Impact Factor = 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, Impact Factor = 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, Impact Factor = 4,501)

Haza 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 (legalább 4 oldal) 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

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Somogyi Violának, a belém vetett bizalmát, szakmai segítségét, és iránymutatását, amivel terelgette a doktori kutatásom előrehaladását és az értekezés elkészítését.

Köszönettel tartozom Dr. Meiczinger Mónikának, tanácsaiért, szakmai támogatásaiért, aki gondolatébresztő beszélgetéseinkkel sokat segített a kutatás minőségének javításában.

Külön köszönettel tartozom Kulcsár Gvendolinnak, aki a néha hosszúra nyúlt kísérletek során is kitartott, és precizitásával jelentősen hozzájárult a kísérleti eredmények szórásának csökkentéséhez.

Hálás köszönettel tartozom a Környezetmérnöki Intézet és a Fenntarthatósági Megoldások Kutatólaboratórium munkatársainak.

Köszönöm Kiss Dórának, családomnak, barátaimnak, akik az évek során bíztattak és motiváltak a doktori kutatás sikeres elvégzésre.

Ezen kívül köszönöm azon hallgatóknak, akik az évek alatt újdonsült lendületet adtak a kutatási terület kidolgozásában. Külön kiemelném Syed Muhammad Hassaan Alit, Lana Wolmaranst és Mariana Menoncint, akik a kutatás kezdeti fázisában bizalmat szavaztak az enzimkatalitikus szennyvíztisztításnak.

A kutatás pénzügyi háttérét a GINOP2.3.2-15-2016-00016, a TÉT_15_IN-1-2016-0094 és a TKP2020-IKA-07 azonosítójú programok biztosították.

Mellékletek

1. számú melléklet

Optimalizálás során kapott lineáris regressziós tábla

Paraméter	Paraméter- becslés	Std. hiba	t-próba	p-érték
(Tengelymetszet)	371,23	10,524	35,276	0,00000
A	92,8	9,0903	10,209	0,00001
B	46,1	9,0903	5,0714	0,00096
C	45,5	9,0903	5,0053	0,00105
A:B	25,625	10,163	2,5213	0,03573
A:C	23,875	10,163	2,3492	0,04674
B:C	-16,875	10,163	-1,6604	0,13541
A ²	-51,01	17,39	-2,9333	0,01890
B ²	-9,5103	17,39	-0,54688	0,59938
C ²	-53,51	17,39	-3,077	0,015185
A:B:C	-7,375	10,163	-0,72565	0,48873

Megfigyelések száma: 19, szabadságfokra eső hiba: 8

Négyzetes-hiba: 28,7

Korrelációs együttható (R^2): 0,966,

Korrigált R^2 : 0,923

F-statisztika vs. konstans modell összehasonlítása: 22,7,

p-érték = 8,47E-05