

## Ireneusz GRUBECKI

e-mail: ireneusz.grubecki@utp.edu.pl

Zakład Inżynierii Chemicznej i Bioprosesowej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz

## Rozkład nadtlenu wodoru w reaktorze ze stałym złożem immobilizowanej katalazy Terminox Ultra: Ocena kinetycznych parametrów biotransformacji

## Wstęp

Katalaza (E.C.1.11.1.6) jest enzymem z grupy oksydoreduktaz występującym w komórkach ludzkich, zwierzęcych oraz w grzybach i bakteriach tlenowych. Jest ona szeroko stosowana do usuwania pozostałości nadtlenu wodoru w przemyśle: (1) włókienniczym, po procesie bielenia tkanin, (2) spożywcym, po zimnej pasteryzacji mleka oraz (3) celulozowo-papierniczym, gdzie służy do odbarwienia i bielenia makulatury oraz mas celulozowych [Eren i in., 2009]. Należy do najbardziej efektywnych enzymów i w procesie rozkładu  $H_2O_2$  znacząco obniża sumaryczne koszty jego przebiegu [Eberhardt i in., 2004]. Dodatkowo immobilizacja katalazy poprawia stabilność wytworzonego biokatalizatora, umożliwia zastosowanie w procesach ciągłych oraz łatwiejszą separację produktów reakcji.

Przeprowadzono szereg badań nad immobilizacją katalazy zarówno na nośnikach organicznych jak i nieorganicznych [Alptekin i in., 2009]. Jednak bez względu na sposób immobilizacji oraz rodzaj nośnika zastosowanie immobilizowanych enzymów powoduje występowanie zewnętrznych i/lub wewnętrznych oporów dyfuzyjnych kontrolujących przebieg procesu [Illanes i in., 2014].

Efektywność biokatalizatora można znacząco zwiększyć przez dobór odpowiedniego typu bioreaktora oraz optymalizację warunków w nim panujących. Można to osiągnąć jedynie wtedy, gdy znane są wartości parametrów kinetycznych reakcji i dezaktywacji biokatalizatora.

Celem niniejszej pracy jest wyznaczenie stałych szybkości rozkładu nadtlenu wodoru przebiegającego w reaktorze ze stałym złożem immobilizowanej na nieporowatych kulkach szklanych katalazy Terminox Ultra. W literaturze nie spotkano danych dotyczących podjętego problemu.

## Podstawowe równania modelowe procesu

Rozważono izotermiczny reaktor ze stałym złożem immobilizowanej katalazy Terminox Ultra o masie  $W$  i wysokości  $H$ , przez który tłokowo przepływa z natężeniem  $Q$  roztwór  $H_2O_2$  o stężeniu  $C_{S0} = 0,015 \text{ mol dm}^{-3}$ . Przy takim stężeniu  $H_2O_2$  zarówno równanie szybkości reakcji jak i dezaktywacji przyjmują postać równania pierwszego rzędu [Switala i Loewen, 2002]. Zatem bilans materii w formie bezwymiarowej dla nadtlenu wodoru oraz katalazy opisuje poniższy układ równań

$$\frac{\partial \bar{C}_S}{\partial \tau} + \frac{\partial \bar{C}_S}{\partial h} = -\beta_1 \bar{C}_E \bar{C}_{SP} \quad \bar{C}_S(h=0, \tau) = 1 \quad (1a)$$

$$\frac{\partial \bar{C}_E}{\partial \tau} = -\beta_2 \bar{C}_E \bar{C}_{SP} \quad \bar{C}_E(h, \tau=0) = 1 \quad (1b)$$

gdzie:  $\tau = \frac{tQ\rho_U}{W}$ ,  $h = \frac{z}{H}$ ,  $\beta_1 = \frac{W}{Q} k_R a_m$ ,  $\beta_2 = \frac{W}{Q\rho_U} k_D C_{S0}$

natomiast  $\bar{C}_i = C_i / C_{i0}$  oznacza bezwymiarową aktywność biokatalizatora ( $i = E$ ), bezwymiarowe stężenie  $H_2O_2$  na jego powierzchni ( $i = SP$ ) oraz w rdzeniu płynu ( $i = S$ ). Stałe szybkości reakcji  $k_R$  i dezaktywacji  $k_D$  opisuje równanie Arrheniusa.

## Badania doświadczalne

## Przygotowanie złoża biokatalizatora

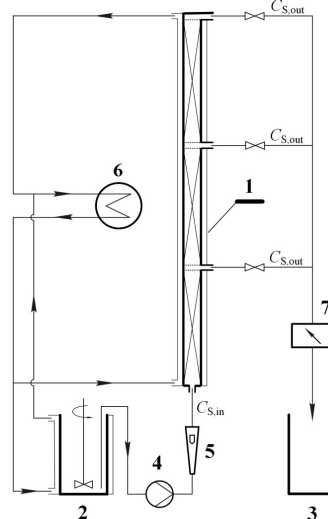
Katalazę Terminox Ultra stosowaną do rozkładu  $H_2O_2$  w przemyśle włókienniczym i produkowaną przez Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) w formie brunatnej cieczy przeznaczonej do rozcieńczenia,

poddano immobilizacji zgodnie z procedurą opisaną przez Vasudevana i Weilandta [1990].

Jako nośnika użyto nieporowatych kulek szklanych o średnicy  $425 \div 600 \mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich, Germany) i porowatości  $\epsilon = 0,3$ . Przewodna wartość średnicy wyznaczona na podstawie analizy sitowej wynosiła  $d_p = 5,05 \cdot 10^{-2} \text{ cm}$ , a odpowiadająca jej wartość powierzchni właściwej wynosiła  $a_m = 45,7 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ .

## Analiza bioreaktora ze złożem stałym

Schemat aparatury doświadczalnej przedstawiono na rys. 1.



czalnej: 1 - bioreaktor, 2 - zbiornik z  $H_2O_2$ , 3 - zbiornik poreakcyjny, 4 - pompa, 5 - rotometr, 6 - termostat, 7 - spektrofotometr

Podstawowym jej elementem był układ trzech pionowych rur szklanych o średnicy 0,8 cm, z których każda wypełniona została biokatalizatorem o masie 11 g przygotowanym w sposób opisany powyżej. Gęstość usypowa wypełnienia równa  $\rho_U = 1,83 \text{ g cm}^{-3}$  zapewniła wysokość warstwy wypełnienia w każdej części równą około 12 cm. Przepływ roztworu  $H_2O_2$  przez reaktor odbywał się za pomocą pompy perystaltycznej i dodatkowo kontrolowany był rotametrem. Stałą temperaturę w reaktorze zapewniał płaszcz grzejny zasilany wodą z termostatu. Na obu końcach każdej części reaktora zainstalowano siatkę ze stali nierdzewnej. Na dolnej siatce ułożona była warstwa biokatalizatora, górną zaś zapobiegała jego porywaniu przez przepływający strumień  $H_2O_2$ .

Aby wyznaczyć stałe szybkości reakcji i dezaktywacji katalazy należy zapewnić warunki, w których układ reakcyjny będzie wolny od oporów dyfuzji zewnętrznej. Warunki takie ustalono dokonując pomiarów stopnia przemiany przy różnych objętościowych natężeniach przepływu ( $Q$ ) roztworu  $H_2O_2$ , zachowując przy tym stałość zastępczego czasu przebywania ( $W/Q$ ). Po ich ustaleniu, co odpowiadało wartości  $Q = 150 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ , dokonano pomiaru stężenia  $H_2O_2$  w strumieniu wylotowym z reaktora [Altomare i in., 1974].

Należy zaznaczyć, że taki układ trzech reaktorów można rozważyć jako pojedynczy reaktor dający możliwość pomiaru stopnia przemiany  $H_2O_2$  jako funkcję czasu  $\tau$  i wysokości złoża  $h = 1/3, 2/3$  i 1. Na podstawie dokonanych pomiarów określono funkcję dyskretną

$$\alpha(h_i, \tau_j) = 1 - C_{S,out}(h_i, \tau_j) / C_{S,in} \quad (i = 1 \dots M, j = 1 \dots N) \quad (2)$$

w której  $\alpha(h_i, \tau_j)$  oznacza stopień przemiany  $H_2O_2$  w reaktorze, natomiast  $M$  i  $N$  są odpowiednio wymiarami wektorów wysokości reaktora i czasu.

Aby osiągnąć cel niniejszej pracy warto zauważyć, że dla warunków hydrodynamicznych panujących w reaktorze zachodzi  $\bar{C}_{SP} = \bar{C}_S$ . Wówczas rozkład stopnia przemiany i aktywności immobilizowanej katalazy przedstawiają równ. (3) i (4) [Altomare i in., 1974].

$$\alpha(h_i, \tau_j) = 1 - \frac{\exp[\beta_2(\tau_j - h_i)]}{\exp(\beta_1 h_i) + \exp[\beta_2(\tau_j - h_i)] - 1} \quad (3)$$

$$\bar{C}_E(h_i, \tau_j) = \frac{\exp(\beta_1 h_i)}{\exp(\beta_1 h_i) + \exp[\beta_2(\tau_j - h_i)] - 1} \quad (4)$$

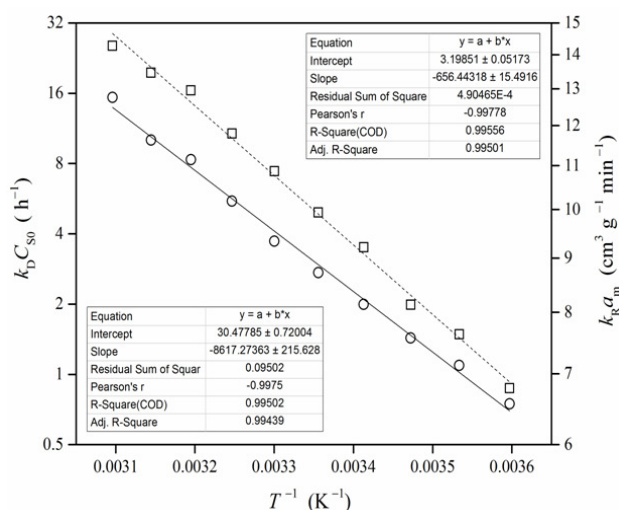
Stosując metodę regresji nieliniowej z procedurą optymalizacyjną *Levenberga* i *Marquardta* równ. (3) dopasowano do danych eksperymentalnych opisanych funkcją dyskretną (2). W efekcie jej zastosowania uzyskuje się wartości współczynników  $\beta_1$  i  $\beta_2$ , które minimalizują sumę kwadratów odchyłek wartości eksperymentalnych  $\alpha_{\text{exp}}(h_i, \tau_j)$  – równ. (2) od obliczonych  $\alpha_{\text{obl}}(h_i, \tau_j)$  na podstawie równ. (3). Pomiary przeprowadzono dla temperatur w zakresie 5÷50°C.

### Pomiar stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w strumieniu wylotowym

Stężenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w strumieniu wylotowym z reaktora monitorowano stosując spektrofotometr *UV-Vis Jasco V-530 (Artisan T.G., Champaign IL, USA)* wyposażony w kwektę kwarcową *Q11020* o drodze optycznej 20 mm. Pomiary przeprowadzono przy długości fali 240 nm ( $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## Wyniki i dyskusja

W rezultacie przeprowadzonych obliczeń uzyskano wartości  $k_R a_m = \beta_1 Q/W$  i  $k_D C_{S0} = \beta_2 Q \rho_U/W$  dla każdej z analizowanych temperatur. Wartości te pokazano na wykresie *Arrheniusa* (Rys. 2).

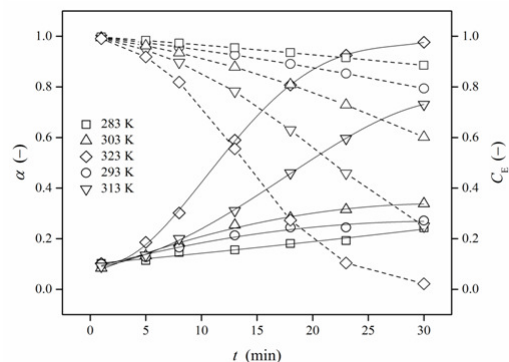


Rys. 2. Stałe szybkości reakcji  $k_R a_m$  (□) i dezaktywacji  $k_D C_{S0}$  (○) jako funkcje odwrotności temperatury ( $T^{-1}$ ) w procesie rozkładu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez immobilizowaną katalazę

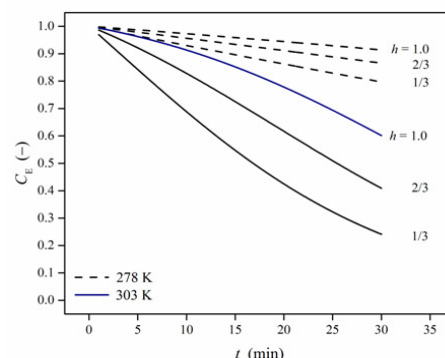
Obliczone energie aktywacji reakcji  $E_R$  i dezaktywacji  $E_D$  oraz współczynniki częstości  $k_{R0}$  i  $k_{D0}$  wynoszą  $E_R = (12,6 \pm 0,3) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $k_{R0} a_m = (1,552 \pm 0,202) \cdot 10^3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$  oraz  $E_D = (49,7 \pm 1,2) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $k_{D0} C_{S0} = (1,495 \pm 0,587) \cdot 10^9 \text{ h}^{-1}$ . Raport statystyczny dla  $k_D$  (poniżej) oraz  $k_R$  (powyżej) dołączono do wykresu.

Na rys. 3 i 4 przedstawiono zmiany aktywności biokatalizatora  $\bar{C}_E$  w czasie  $t$  u wylotu z reaktora (Rys. 3), linia przerywana) oraz wzdłuż wysokości złoża (Rys. 4), obliczone na podstawie równ. (4). Wynika stąd, że im bliżej wlotu do reaktora tym niższą aktywność wykazuje biokatalizator i odwrotnie, im bliżej wylotu z reaktora tym aktywność katalazy jest wyższa. Taki rozkład aktywności biokatalizatora jest konsekwencją szybszej dezaktywacji katalazy spowodowanej wyższym stężeniem roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na wlocie do reaktora i zmniejszającej się w miarę przepływu strumienia przez reaktor.

Dodatkowo wzrost temperatury przyspiesza dezaktywację (Rys.4), co świadczy o spadku stabilności biokatalizatora wraz ze wzrostem temperatury.



Rys. 3. Wpływ czasu i temperatury na aktywność biokatalizatora (linia przerywana) oraz stopień przemiany H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w strumieniu wylotowym z reaktora (linia ciągła)



Rys. 4. Wpływ temperatury na profile aktywności biokatalizatora  $\bar{C}_E(t)$  na różnych wysokościach złoża  $h$

## Wnioski

Wyznaczone wartości energii aktywacji reakcji  $E_R = 12,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  i dezaktywacji  $E_D = 49,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  są zbliżone do tych wyznaczonych przez innych autorów [Miłek i Wójcik, 2011]. Ponadto wartość energii aktywacji dezaktywacji wyznaczona w niniejszej pracy jest nieco wyższa od tej wyznaczonej dla natywnej katalazy *Terminox Ultra* ( $E_D = 44,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), co wynika z podwyższonej stabilności katalazy immobilizowanej. Wyznaczone parametry kinetyczne mogą być wykorzystane do modelowania i optymalizacji bioreaktora ze złożem stałym, w którym przebiega rozkład nadtlenu wodoru w obecności katalazy *Terminox Ultra*.

## LITERATURA

- Alptekin Ö., Tükel S.S., Yildirim D., Alagöz D., (2009). Characterization and properties of catalase immobilized pore glass and its application in batch and plug-flow type reactors. *J Mol. Catal. B-Enzym*, 58, 124-131. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2011.09.002
- Altomare R.E., Kohler J., Greenfiels P.F., Kittrell F.R., (1974). Deactivation of immobilized beef liver catalase by hydrogen peroxide. *Biotechnol. Bioeng.* 16, 1659-1673. DOI: 10.1002/bit.260161208
- Eberhardt A.M., Pedroni V., Volpe M., Ferreira M.L., (2004). Immobilization of catalase from *Aspergillus niger* on inorganic and biopolymeric supports for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition. *Appl. Catal. B-Environ.*, 47, 153-163. DOI: 10.1016/j.apcatb.2003.08.007
- Eren H.K., Anis P., Davulcu A., (2009). Enzymatic one-bath desizing-bleaching-dyeing process for cotton fabrics. *Text. Res. J.*, 79(12) 1091-1098. DOI: 10.1177/0040517508099388
- Illanes A., Wilson L., Vera C., (2014). *Problem solving in enzyme biocatalysis*. John Wiley & Sons, Ltd., UK.
- Miłek J., Wójcik M., (2011). Wpływ temperatury na rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę *Terminox Ultra*. *Przem. Chem.*, 90(6), 1260-1263
- Switala J., Loewen P. C., (2002). Diversity of properties among catalases, *Arch. Biochem. Biophys.*, 401(1), 145-154. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00049-8
- Vasudevan P.T., Weiland R.H., (1990). Deactivation of catalase by hydrogen peroxide. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 783-789. DOI: 10.1002/bit.260360805