

Małgorzata KOWALSKA<sup>1</sup>

## WYZNACZANIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH REAKCJI ULTRAFILTRACYJNEJ BIODEGRADACJI KWASU MONOCHLOROOCETOWEGO

### THE STUDY OF KINETICS OF ULTRAFILTRATION BIODEGRADATION OF MONOCHLOROACETIC ACID

**Abstrakt:** W pracy podjęto próbę graficznego opisu kinetyki reakcji ultrafiltracyjnej biodegradacji kwasu monochloroocetowego oraz określenia wpływu temperatury na szybkość tej reakcji. Proces prowadzono z wykorzystaniem poliakrylonitrylowej membrany enzymatycznej, otrzymanej przez kowalencyjne związanie z jej powierzchnią enzymów rozkładających  $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$  (MCAA). Uzyskane wyniki przedstawiono za pomocą trzech równań: Lineweavera-Burka, Hanesa-Woolfa i Woolfa-Augustinsson-Hofstee, z których wyznaczono parametry kinetyczne badanej reakcji.

**Słowa kluczowe:** kwasy halogenoocetowe, enzymy, immobilizacja, ultrafiltracja, biodegradacja, kinetyka reakcji enzymatycznej

Gwałtowny rozwój technik współczesnej biotechnologii, wydzielanie indywidualnych enzymów komórkowych, identyfikacja nowych biokatalizatorów o nieznanym dotąd właściwościach spowodowały, że stały się one podstawą kształtowania procesów technologicznych. Coraz częściej tradycyjne procesy chemiczne zastępowane są technologiami wykorzystującymi trwałe preparaty enzymatyczne o ściśle określonych właściwościach. Otrzymuje się je poprzez immobilizację enzymów na lub w stałych nośnikach, np. membranach. Decydujące o właściwościach użytkowych preparatów są cechy zarówno nośnika, jak i enzymu, które wzajemnie się kształtują w efekcie zastosowanego procesu immobilizacji. Bardzo ważną zaletą białek unieruchomionych (w stosunku do komórek wolnych) jest to, że nie ulegają one wypłukiwaniu oraz wykazują zwykle podwyższoną odporność na toksyczne działanie ksenobiotyków.

Kataliza enzymatyczna jest jeszcze dość kosztowna, ale ze względu na przedstawione korzyści obecne i potencjalne obszary nowatorskich zastosowań białek immobilizowanych obejmują: medycynę, analitykę, ochronę i inżynierię środowiska, przemysł spożywczy i farmaceutyczny oraz syntezę organiczną, stanowiąc ok. 10% udziału zastosowań katalizatorów na świecie. Opanowanie syntez i stosowanie katalizatorów enzymatycznych ma coraz większe znaczenie dla problemów ekologicznych, żywnościowych i energetycznych świata [1-3].

Kwasy halogenoocetowe (HAA) powstają przede wszystkim podczas chlorowania wody zawierającej ich organiczne prekursorzy. Udział ilościowy HAA w TOX (suma halogenowanych związków organicznych) jest zwykle mniejszy niż trihalometanów, lecz większy niż pozostałych grup ubocznych produktów utleniania chlorem. Stężenia HAA są wprost proporcjonalne do dawki chloru i zawartości w wodzie prekursorów organicznych

<sup>1</sup> Zakład Chemii Środowiska i Procesów Membranowych, Instytut Inżynierii Wody i Ścieków, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18, 44-100 Gliwice, tel. 32 237 15 64, mail: małgorzata.kowalska@polsl.pl

\*Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'13, Jarnołtówek, 23-26.10.2013

[4-6]. Według przepisów Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (US EPA) z 2008 roku, suma stężeń pięciu kwasów halogenooctowych (kwasu monochlorooctowego, dichlorooctowego, trichlorooctowego, monobromooctowego i dibromooctowego) nie może być większa niż  $60 \text{ mg/m}^3$ . W przyszłości przewiduje się jednak obniżenie tej wartości do  $30 \text{ mg/m}^3$  ze względu na zagrożenie zdrowia ludzi i zwierząt substancjami rakotwórczymi, za które uznano HAA. Według wytycznych WHO, dotyczących jakości wody do picia, dopuszczalne stężenie kwasu monochlorooctowego wynosi  $20 \text{ mg/m}^3$ , dichlorooctowego  $50 \text{ mg/m}^3$ , a kwasu trichlorooctowego  $200 \text{ mg/m}^3$ . W polskich wymaganiach stawianych wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi kwasy halogenooctowe nie są uwzględnione, choć jeszcze w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie warunków, jakim powinna odpowiadać woda do picia, ograniczono stężenie kwasu monochlorooctowego do  $30 \text{ mg/m}^3$  [7, 8].

### Cel i metodyka badań

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy, są kontynuacją wcześniejszych prac nad efektywnością usuwania kwasów halogenooctowych z wody w bioreaktorze z ultrafiltracyjną membraną enzymatyczną. Ich celem było wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej zachodzącej podczas procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji kwasu monochlorooctowego. Proces ten, oparty na membranach z unieruchomionymi białkami aktywnymi, przebiega w temperaturze otoczenia, charakteryzuje się niską energochłonnością i niewielkimi kosztami eksploatacyjnymi. Równocześnie pozwala na obniżenie stężenia substancji toksycznych w miejscu ich powstawania do wartości dopuszczalnych oraz umożliwia doczyszczanie uzdatnianej wody w procesie ultrafiltracji [9-11].

Badania prowadzone były przy użyciu termostатовanego reaktora typu S-76-400 firmy Nuclepore, pojemności  $400 \text{ cm}^3$ , zaopatrzonego w mieszadło magnetyczne, pozwalającego na pracę z membraną płaską o powierzchni  $38,5 \text{ cm}^2$ .

Enzymy były izolowane metodą Hagemana ze szczepów bakterii wyodrębnionych z mieszanej populacji osadu czynnego, adaptowanego do rozkładu HAA. Dominującymi w populacji rodzajami bakterii były: *Acinetobacter*, *Arthobacter*, *Pseudomonas* oraz *Bacillus*.

Membranę enzymatyczną otrzymano poprzez kowalencyjne, trwałe związanie enzymów z powierzchnią membrany poliakrylonitrylowej (PAN-17; 17% polimeru w roztworze błonotwórczym), wcześniej zmodyfikowanej wodzianem hydrazyny i aldehydem glutarowym. Wyboru membrany dokonano w oparciu o uzyskaną przez enzymy immobilizowane aktywność oraz stabilność. Badania prowadzono w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  oraz przy  $\text{pH} = 6,5$  (w warunkach tych aktywność membrany enzymatycznej była najwyższa, tab. 1) [12].

Aktywność membrany katalitycznej wyznaczano, przepuszczając przez nią wodę modelową zawierającą kwas monochlorooctowy o stężeniu  $0,1 \text{ mg/dm}^3$  w czasie 10 minut przy ciśnieniu  $0,1 \text{ MPa}$  i obrotach mieszadła  $50 \text{ obr/min}$ . Następnie oznaczono stężenie kwasu w nadawie, permeacie i retencie i na tej podstawie określono stopień biodegradacji ksenobiotyku ( $B_d$ ), zgodnie z równaniem:

$$B_d = [1 - (C_p \cdot V_p + C_r \cdot V_r) / C_n \cdot V_n] \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie:  $B_d$  - stopień biodegradacji ksenobiotyku [%],  $C_p$  - stężenie ksenobiotyku w permeacie [mol/dm<sup>3</sup>],  $C_n$  - stężenie ksenobiotyku w nadawie [mol/dm<sup>3</sup>],  $C_r$  - stężenie ksenobiotyku w retentacie [mol/dm<sup>3</sup>],  $V_p$  - objętość permeatu [dm<sup>3</sup>],  $V_n$  - objętość nadawy [dm<sup>3</sup>],  $V_r$  - objętość retentatu [dm<sup>3</sup>].

Ilość unieruchomionego białka oraz aktywność membrany enzymatycznej

Tabela 1

The amount of enzyme and membranes activity

Table 1

Ilość unieruchomionego białka [mg]	Aktywność [mmol CH <sub>2</sub> CICOOH / 10 min / 1 cm <sup>2</sup> pow. membrany] · 10 <sup>4</sup>	
16,4	$T = 18^{\circ}\text{C}$	2,304
	$T = 20^{\circ}\text{C}$	2,310
	$T = 23^{\circ}\text{C}$	2,316
	$T = 25^{\circ}\text{C}$	2,322
	$T = 28^{\circ}\text{C}$	2,317
	$T = 30^{\circ}\text{C}$	2,312

Membrana enzymatyczna całkowicie zatrzymywała kwas monochlorooctowy - w permeacie nie stwierdzono obecności MCAA. W nadawie i permeacie nie stwierdzono również obecności enzymu, co świadczyło o trwałym związaniu białka z powierzchnią membrany. Stężenie białka (tab. 1) oznaczono kolorymetryczną metodą Bradforda, polegającą na barwnej reakcji białka z odczynnikiem Bio-Rad-Protein-Assay.

W celu wyznaczenia parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej mierzono stężenie ksenobiotyku w nadawie i retentacie (było ono takie samo), podczas filtracji przez membranę aktywną wody modelowej zawierającej 2 mg/dm<sup>3</sup> MCAA, przy ciśnieniu 0,01 MPa oraz przy intensywności mieszania wynoszącej 50 obr/min. Optymalne parametry procesu (ciśnienie transmembranowe, intensywność mieszania) wyznaczono podczas wcześniejszych badań [10-12]. Na podstawie danych wyliczono zależność szybkości reakcji od stężenia substratu, korzystając z przybliżenia liniowego:

$$r \left( \frac{c_{i+1} + c_i}{2} \right) = \frac{c_i - c_{i+1}}{t_{i+1} - t_i} \quad (2)$$

gdzie:  $r$  - szybkość reakcji enzymatycznej [mol/(min·dm<sup>3</sup>)],  $c_i$  - stężenie substratu [mol/dm<sup>3</sup>],  $t_i$  - czas reakcji enzymatycznej [min];

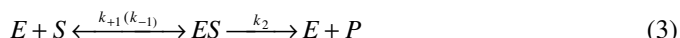
a następnie sporządzono wykresy Lineweavera-Burka, Henesa-Woolfa i Woolfa-Augustinsson-Hofstee, przy pomocy których wyznaczono parametry kinetyki reakcji enzymatycznej.

Stężenie kwasu monochlorooctowego oznaczano za pomocą chromatografu GC-MS (model Saturn 2100 T produkcji firmy Varian). Chromatograf wyposażony był w kolumnę SLB<sup>TM</sup> - 5 ms firmy Supleco. Podczas analizy temperaturę pieca chromatograficznego programowano w zakresie od 40 do 210°C. Pozostałe parametry temperaturowe były następujące: dozownik typu Split/Splitless - 210°C, pułapka jonowa i źródło jonów - 200°C. Analizę ilościową prowadzono w oparciu o metodę FS (full scan) w zakresie mas od 50 do 250 a.m.u. Procedura przygotowania próbek wodnych była adaptacją metody US EPA 552.2. Metoda ta obejmowała dwa zasadnicze etapy: ekstrakcję kwasu z użyciem eteru tert-butylometylowego (MTBE) oraz jego upochadnianie do estru metyloвого [13].

## Wyniki oraz ich omówienie

W tabeli 1 przedstawiono ilość unieruchomionego na membranie białka aktywnego oraz aktywność enzymatyczną otrzymanej membrany katalitycznej (w zależności od temperatury).

Modelem kinetycznym opisującym reakcję enzymu z substratem jest model Michaelisa-Menten. Opiera się on na założeniu odwracalnego powstawania aktywnego kompleksu enzym-substrat (ES), będącego wynikiem odwracalnej reakcji cząstek enzymu (E) z cząsteczkami substratu (S) oraz na następczej, nieodwracalnej reakcji rozpadu kompleksu aktywnego na produkt (P) i uwolnieniu cząstek enzymu:



Równanie Michaelisa-Menten, opisujące ten proces, przyjmuje postać:

$$r_s = r_m [S]/(K_M + [S]) \quad (4)$$

gdzie:  $r_m = k_2[E]$ ,  $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_{+1}$ .

Stała  $K_M$  nosi nazwę stałej Michaelisa-Menten i ma wymiar stężenia. Po wstawieniu do równania (4) wartości  $K_M$  w miejsce  $[S]$  otrzymuje się zależność:

$$[S] = K_M \Rightarrow r_s = 1/2 r_m \quad (5)$$

Wynika z niej, że stała Michaelisa-Menten jest stężeniem substratu, przy którym szybkość reakcji osiąga połowę wartości jej szybkości maksymalnej. Stałą  $K_M$  można wyznaczyć z wykreślonej zależności szybkości reakcji enzymatycznej w funkcji stężenia substratu, czyli z graficznego przedstawienia równania Michaelisa-Menten. Najprostszym sposobem dokładniejszego wyznaczenia wartości  $r_m$  i  $K_M$  jest przekształcenie równania hiperboli, jakim jest równanie Michaelisa-Menten, w równanie prostej. Umożliwiają to równania: Lineweavera-Burka, Hanesa-Woolfa oraz Hofstee [14, 15].

W tabeli 2 zamieszczono uzyskane wyniki zmiany stężenia substratu (MCAA) w czasie prowadzenia procesu, na podstawie których wykreślono krzywe Lineweavera-Burka, Woolfa oraz Hofstee (rys. 2-4). W tabeli 3 przedstawiono równania prostych.

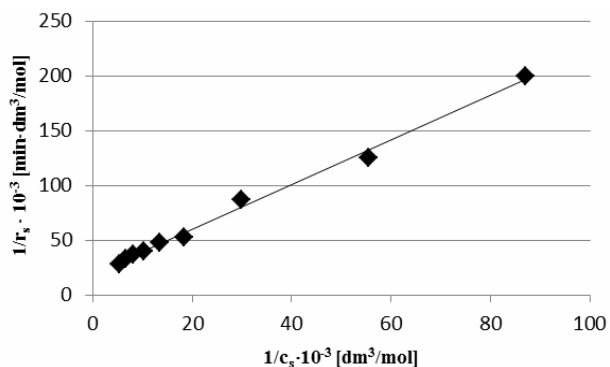
Tabela 2

Zmiana stężenia kwasu monochlorooctowego w czasie prowadzenia procesu jego usuwania z wykorzystaniem membrany katalitycznej

Table 2

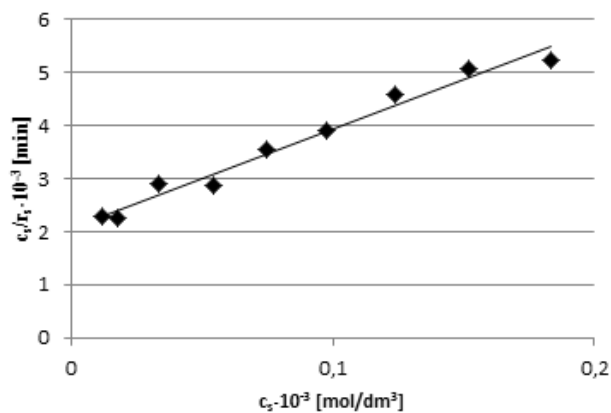
The change of monochloroacetic acid concentration in time during its removal process with the use of catalytic membrane

Czas [min]	$C_s$ [mol/dm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>3</sup>	Czas [min]	$C_s$ [mol/dm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>3</sup>
0	21,16	7	2,22
1	17,46	8	1,27
2	14,49	9	0,85
3	11,5	10	0,65
4	9,1	11	0,34
5	6,88	12	0,13
6	4,67	13	0,08



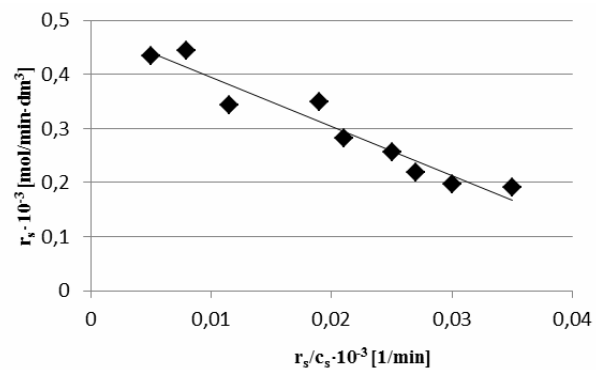
Rys. 1. Wykres Lineweavera-Burka otrzymany dla reakcji ultrafiltracyjnej biodegradacji MCAA

Fig. 1. Lineweaver-Burk diagram obtained for ultrafiltration biodegradation of MCAA



Rys. 2. Wykres Woolfa otrzymany dla reakcji ultrafiltracyjnej biodegradacji MCAA

Fig. 2. Woolf diagram obtained for ultrafiltration biodegradation of MCAA



Rys. 3. Wykres Hofstee otrzymany dla reakcji ultrafiltracyjnej biodegradacji MCAA

Fig. 3. Hofstee diagram obtained for ultrafiltration biodegradation of MCAA

Równania otrzymanych krzywych opisujących parametry kinetyczne reakcji zachodzącej podczas ultrafiltracyjnej biodegradacji MCAA

Tabela 3

Equations of curves describing kinetic parameters of the reaction which occurred during ultrafiltration biodegradation of MCAA

Table 3

Metoda	Równanie funkcji
Lineweavera-Burka	$\frac{1}{r_s} = 0,3638 \cdot \frac{1}{[S]} + 2,5547$
Woolfa	$\frac{[S]}{r_s} = 0,8365 \cdot [S] + 2,2142$
Hofstee	$r_s = -0,0299 \frac{r_s}{[S]} + 0,5652$

W tabeli 4 zestawiono wyniki obliczeń parametrów kinetyki badanej reakcji enzymatycznej wyznaczone w temperaturze 25°C za pomocą omówionych trzech metod graficznych przy zachowaniu stałego ciśnienia transmembranowego (0,01 MPa) oraz stałego stężenia wyjściowego usuwanego kwasu (2 mg/dm<sup>3</sup>).

Tabela 4

Wyniki obliczeń parametrów kinetycznych reakcji zachodzącej podczas ultrafiltracyjnej biodegradacji MCAA wyznaczonych metodami: Lineweavera-Burka, Woolfa i Hofstee

Table 4

Results of calculation of kinetic parameters which occurred during MCAA ultrafiltration biodegradation determined by Lineweaver-Burk, Woolfa and Hofstee methods

Metoda	$r_m$ [mol/min·dm <sup>3</sup> ]	Błąd obl. $r_m$	$K_M$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	Błąd obl. $K_M$
Lineweavera-Burka	$0,482 \cdot 10^{-3}$	3,2%	$0,243 \cdot 10^{-3}$	6,1%
Woolfa	$0,513 \cdot 10^{-3}$	1,9%	$0,274 \cdot 10^{-3}$	3,4%
Hofstee	$0,5701 \cdot 10^{-3}$	1,2%	$0,301 \cdot 10^{-3}$	2%

## Podsumowanie i wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika, że możliwe jest wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji ultrafiltracyjnej biodegradacji kwasu monochlorooctowego metodami graficznymi Lineweavera-Burka, Woolfa oraz Hofstee. Z punktu widzenia obliczeń numerycznych najmniej efektywną metodą jest metoda Lineweavera-Burka. Decydujące znaczenie mają w niej wartości zmierzone dla najmniejszych stężeń substratu i odpowiadających im najmniejszych szybkości reakcji, a w tym zakresie błędy oznaczeń są największe. Najmniejszym błędem charakteryzowała się metoda Hofstee.

## Podziękowania

Praca naukowa została sfinansowana ze środków przeznaczonych na naukę w latach 2009-2011 jako projekt badawczy nr N N523 4523 36 pt. „Biodegradacja kwasów halogenooctowych w reaktorze z enzymatycznymi membranami ultrafiltracyjnymi”.

## Literatura

- [1] Lin Ch, Gan L, Zuliang Ch, Mallavarapu M, Ravendra N. Biodegradation of naphthalene using a functional biomaterial based on immobilized *Bacillus fusiformis* (BFN). *Biochem Eng J.* 2014;90:1-7. DOI: 10.1016/j.bej.2014.05.003.
- [2] Jiwu L, Weijian C, Ling Z. The characteristics and enzyme activities of 4-chlorophenol biodegradation by *Fusarium sp.* *Bioresour Technol.* 2010;102:2985-2989. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.006.
- [3] Godjevargova T, Ivanova D, Aleksieva Z, Burdelova G. Biodegradation of phenol by immobilized *Trichosporon cutaneum* R57 on modified polymer membranes. *Process Biochem.* 2006;41:2342-2346. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.05.012.
- [4] Rodriguez MJ, Serodes J, Roy D. Formation and fate of haloacetic acids (HAAs) within the water treatment plant. *Water Res.* 2007;41(18):4222-44232. DOI: 10.1016/j.watres.2007.05.048.
- [5] Kucharski M, Koprowicz D. Chloroacetic acids in drinking water as ozonation and disinfection chlorine by-products. *Pol J Environ Stud.* 2007;16(2A):150-157.
- [6] Ghani A, Dalvi I, Al-Rasheed R, Javeed MA. Haloacetic acids (HAAs) formation in desalination processes from disinfectants. *Desalination.* 2000;129(3):261-271. DOI: 10.1016/S0011-9164(00)0066-7.
- [7] Peters RIB, Erkelens C, Leer EWB, Glan L. The analysis of halogenated acetic acids in dutch drinking water. *Water Res.* 2008;25(4):473-477. DOI: 10.1016/j.watres.2008.07.048.
- [8] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 20 kwietnia 2010 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *DzU 2010, Nr 72, poz. 466.*
- [9] Kowalska M, Dudziak M, Bohdziewicz J. Usuwanie kwasów halogenooctowych w zintegrowanym procesie biodegradacja - ultrafiltracja z zastosowaniem enzymatycznych membran kapilarnych. *Ochr Środ.* 2011;33(4):49-51.
- [10] Kowalska M, Dudziak M, Bohdziewicz J. Usuwanie kwasów halogenooctowych z wody w bioreaktorze z enzymatyczną membraną ultrafiltracyjną. *Nauka Przyr Technol.* 2011;5(4): #37.
- [11] Kowalska M, Dudziak M. GC-MS determination of halogen derivatives of acetic acid. *ACEE.* 2011;4(3):117-120.
- [12] USEPA, Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection. *Method 552.2, Rev. 1.0, 1995.*
- [13] Roig MG, Pedraz MA, Sanchez JM. Sorption isotherms and kinetics in the primary biodegradation of anionic surfactants by immobilized bacteria: I. *Pseudomonas C12B.* *J Mol Catal B-Enzym.* 1998;4:253-270. DOI: 10.1016/S1381-1177(98)00005-8.
- [14] Thao TP, Hsiang-Chien K, Rucy-Shin J, Chi-Wei JL. Kinetic characteristics of biodegradation of methyl orange by *Pseudomonas putida* mt2 in suspended and immobilized cell systems. *J Taiwan Inst Chem E.* 2013;44(5):780-785. DOI: 10.1016/j.jtice.2013.01.015.
- [15] Mohidem NA, Hanapi BM. The catalytic activity enhancement and biodegradation potential of free laccase and novel sol-gel laccase in non-conventional solvents. *Bioresour Technol.* 2012;114:472-477. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.138.

## THE STUDY OF THE KINETICS OF ULTRAFILTRATION BIODEGRADATION OF MONOCHLOROACETIC ACID

Division of Sanitary Chemistry and Membrane Processes, Institute of Water and Wastewater Engineering  
Faculty of Energy and Environmental Engineering, Silesian University of Technology, Gliwice

**Abstract:** The study of the kinetics of ultrafiltration biodegradation of monochloroacetic acid and the impact of the temperature on the reaction rate are discussed in the paper. The graphical interpretation of the reaction kinetics was made. The process was carried out with the use of polyacrylonitrile enzymatic membrane obtained by the covalent bonding of the membrane polymer with enzymes able to decompose  $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$  (MCAA). The obtained results were represented using three equations: Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf and Woolf-Augustinsson-Hofstee, which enabled the determination of kinetics parameters of the investigated reaction.

**Keywords:** monochloroacetic acid, immobilization, biodegradation, ultrafiltration enzymatic membranes, kinetics of ultrafiltration biodegradation

