

Justyna MIŁEK, Sylwia KWIATKOWSKA-MARKS

e-mail: jmilek@utp.edu.pl

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

Wpływ temperatury na kinetykę dezaktywacji katalazy z *Aspergillus niger* przez substrat

Wstęp

Zastosowanie nadtlenu wodoru w przemyśle najczęściej powoduje konieczność rozkładu jego pozostałości. W tym celu stosowana jest najczęściej katalaza m.in.: w przetwórstwie spożywczym usuwa ona nadtlenek wodoru po zimnej sterylizacji [Lee, 2004]. Stosowana jest także w produkcji półprzewodników [Akyilmaz i Kozgus, 2009] oraz w przemyśle włókienniczym [Arabaci i Usluoglu, 2012].

Jednak rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę związany jest także z jednocześnie przebiegającą dezaktywacją katalazy. Wpływ temperatury na rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę z *Aspergillus niger* w szerokim zakresie temperatur, nie był badany przez innych autorów.

W niniejszej pracy przedstawiono wpływ temperatury z zakresu 35÷50°C na rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę z *A. niger*. Badania przeprowadzono przy stężeniu nadtlenu wodoru, niższym niż 0,015 mol/dm³. Otrzymane parametry dezaktywacji katalazy z *A. niger*, mogą być wykorzystywane do modelowania i optymalizacji bioreaktora okresowego [Grubecki i in., 2015].

Badania doświadczalne

Materiały

Katalaza (E.C. 1.11.1.6) z *Aspergillus niger* była dostarczona z Sigma-Aldrich (C3515). Perhydrol został zakupiony w POCh, Polska.

Metodyka

Aktywność katalazy mierzono spektrofotometrycznie [Miłek, 2011; Arabaci i Usluoglu, 2012]. Przygotowano roztwór katalazy w buforze fosforanowym w proporcji 1: 500. Do rozkładu 200 cm³ nadtlenu wodoru o stężeniu początkowym 0,015 mol/dm³ oraz pH 6,9 dodano 2,5 U/ml katalazy. Wszystkie próbki termostatowano w łaźni wodnej w określonych temperaturach: 35, 40, 45, 50°C przez okres 1,5 godziny. Po określonym czasie przechowywania w odpowiedniej temperaturze oznaczano stężenie nadtlenu wodoru spektrofotometrycznie przy długości fali 240 nm.

Model bioreaktora okresowego do rozkładu nadtlenu wodoru z dezaktywującą katalazą

Bilans masy substratu i aktywnej katalazy dla bioreaktora okresowego z idealnym wymieszaniem przy stężeniach substratu mniejszym od 0,015 mol/dm³ opisuje układ dwóch równań różniczkowych zwyczajnych:

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_R C_E C_S \quad (1a)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = -k_D C_E C_S \quad (1b)$$

gdzie:

 k_R – stała szybkości reakcji, [dm³mol⁻¹h⁻¹], C_S – stężenie substratu, [mol·dm⁻³] C_E – stężenie enzymu, [mol·dm⁻³] k_D – stała szybkości dezaktywacji nadtlenu wodoru, [dm³mol⁻¹h⁻¹]

z warunkami początkowymi:

$$C_S(t=0) = C_{S0} \quad \text{oraz} \quad C_E(t=0) = C_{E0}.$$

Po wprowadzeniu aktywności bezwymiarowej $\bar{a} = C_E/C_{E0}$ oraz stopnia przemiany $\alpha = (C_{S0} - C_S)/C_{S0}$ otrzymano układ równań w postaci:

$$\frac{d\alpha}{dt} = -k_R^* \bar{a} (1-\alpha) \quad (2a)$$

$$\frac{d\bar{a}}{dt} = -k_D \bar{a} C_{S0} (1-\alpha) \quad (2b)$$

z warunkami początkowymi: $\alpha(t=0)=0$ oraz $\bar{a}(t=0)=1$ gdzie: $k_R^* = C_{E0} k_R$ [h⁻¹].

Analityczne rozwiązania tego układu równań dają:

$$\bar{a}(\alpha) = 1 - k_D C_{S0} \alpha / k_R^* \quad (3a)$$

$$\alpha = \frac{1 - \exp[-(k_R^* - k_D \cdot C_{S0}) t]}{C_{S0} k_D / k_R^* - \exp[-(k_R^* - k_D \cdot C_{S0}) t]} \quad \text{dla } k_D C_{S0} \neq k_R^* \quad (3b)$$

$$\alpha = 1 - \frac{1}{(k_R^* \cdot t + 1)} \quad \text{dla } k_D C_{S0} = k_R^* \quad (3c)$$

Podczas wstępnej analizy danych doświadczalnych wykazano, że stała szybkości reakcji k_R^* i stała szybkości dezaktywacji k_D w równaniach (3a) i (3b) są silnie skorelowane. Wyznaczono więc, niezależnie stałą szybkości reakcji k_R^* , podczas spektrofotometrycznego pomiaru szybkości rozkładu nadtlenu wodoru w czasie reakcji poniżej 1 minuty, stosując odpowiednio wyższe stężenie katalazy. Stałą szybkości reakcji k_R^* wyznaczono dla początkowych stężeń nadtlenu wodoru 0,015 mol/dm³ w temperaturach z zakresie 20÷ do 50°C zmieniających się odpowiednio co 5°C.

Dla znanych wartości k_R^* , w oparciu o równanie (3b) za pomocą regresji nieliniowej procedury *Levenberga-Marquardta* określono wartości stałej szybkości dezaktywacji k_D wyznaczając minimalną wartość różnicy kwadratów w postaci:

$$SSE(k_D) = \sum_{i=0}^n \frac{1}{\alpha_{di}^2} (\alpha_{di} - \alpha_{obl}(k_D, t_i))^2 \quad (4)$$

gdzie stopień przemiany reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę *A. niger* wyznaczony doświadczalnie oznaczono jako α_{di} natomiast stopień przemiany obliczony na podstawie równaniu (3b) – jako $\alpha_{obl}(k_D, t_i)$. Obliczeń dokonano przy użyciu regresji nieliniowej stosując program *SigmaPlot 12.3*.

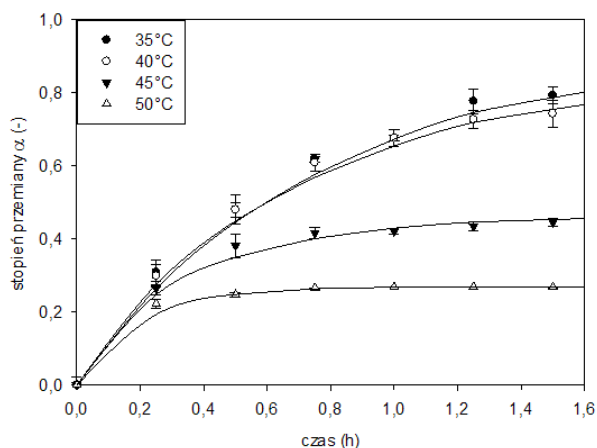
Wyniki i dyskusja

Wyznaczono energię aktywacji równą 12,9 ± 0,7 kJ/mol. Otrzymana wartość jest porównywalna z wartością energii aktywacji rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę *Terminox Ultra* [Miłek i Wójcik, 2011].

Stałe szybkości dezaktywacji katalazy k_D określone w zakresie temperatur nadtlenu wodoru 35÷50°C a wyznaczone przy użyciu procedury optymalizacji *Levenberga-Marquardta* zostały zebrane w tab. 1.

Tab. 1. Stałe szybkości dezaktywacji k_D katalazy *Aspergillus niger*

Temperatura	35°C	40°C	45°C	50°C
k_D , [dm ³ mol ⁻¹ ·h ⁻¹]	30,47±2,98	58,60±5,71	235,9±6,23	469,5±4,99
<i>SEE</i>	0,0661	0,0222	0,0178	0,0060
<i>r</i>	0,9967	0,9967	0,9939	0,9981



Rys. 1. Wpływ temperatury na stopień przemiany reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę z *A. niger*

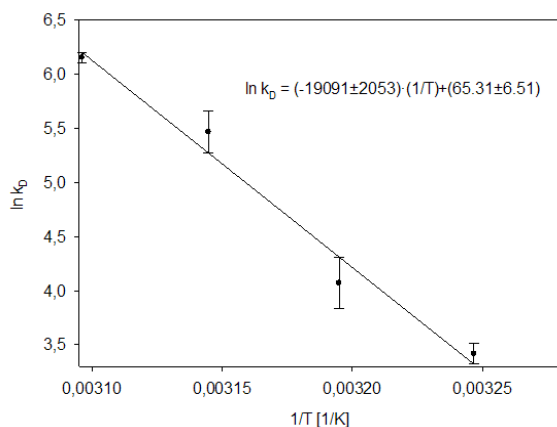
Minimalna różnica kwadratów SSE była niższa niż 0,06. Współczynnik korelacji *Pearsona r* dla otrzymanych parametrów był większy niż 0,993.

Na rys. 1 przedstawiono porównanie eksperymentalnych wartości stopnia przemiany z wartościami stopnia przemiany obliczonymi z równ. (3b) przy użyciu stałych k_D zamieszczonych w tab. 1.

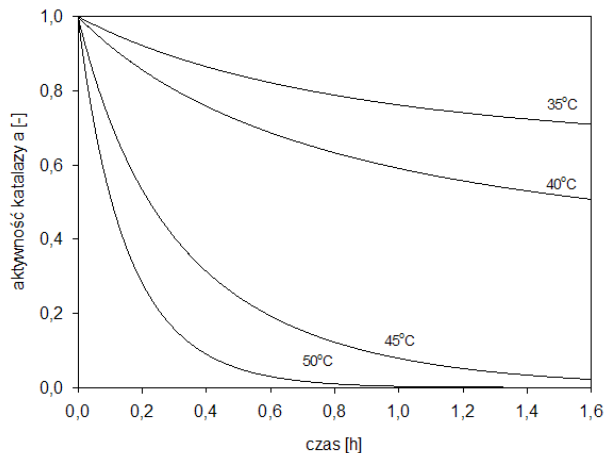
Określono wartość energii aktywacji dla reakcji dezaktywacji katalazy *A. niger* jako wynoszącą $158,74 \pm 1,71 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Rys. 2). Wartość energii aktywacji dla dezaktywacji katalazy *Aspergillus niger* była 3,4 razy wyższa niż wartość energii aktywacji dla dezaktywacji katalazy *Terminox Ultra* [Miłek i Wójcik, 2011].

Wartości stałej szybkości dla reakcji k_r^* i stałe szybkości dezaktywacji k_D , na podstawie równ. (3a) pozwalają na określenie zmiany aktywności katalazy w czasie rozkładu nadtlenu wodoru. Na rys. 3 przedstawiono zmiany w aktywności enzymu w temperaturach 35÷50°C przy użyciu 2,5 U/ml katalazy. Aktywność katalazy po czasie 0,6 h rozkładu nadtlenu wodoru w temperaturze 45°C, osiąga 20% aktywności początkowej. Natomiast w po czasie 0,26 h rozkładu nadtlenu wodoru w temperaturze 50°C aktywność katalazy osiąga 20% aktywności początkowej.

Wpływ temperatury na dezaktywację katalazy z *Aspergillus niger* nadtlaniem wodoru nie był do tej pory przedmiotem systematycznych badań. Określano stałą dezaktywacji dla katalazy pochodzenia zwierzęcego lub mikrobiologicznego [Tse i Gough, 1987; DeLuca i wsp., 1995; Miłek i Wójcik, 2011]. Wpływ temperatury na proces rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę z *A. niger* badali m.in. DeLuca i in. [1995] oraz Lardinois i in. [1996] jednak w temperaturze 25°C. Natomiast Tse i Gough [1987] prowadzili badania w temperaturze 37°C, a otrzymana wartość stałej szybkości k_D wynosiła $54,00 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{h}^{-1}$.



Rys. 2. Zależność stałej szybkości k_D od temperatury dla rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę z *A. niger*



Rys. 3. Wpływ temperatury na zmiany aktywności katalazy z *Aspergillus niger*

Na podstawie wyznaczonych doświadczalnie parametrów dla reakcji dezaktywacji katalazy *A. niger* istnieje możliwość obliczenia wartości stałej szybkości dezaktywacji k_D w dowolnej temperaturze.

Wartość k_D równa $42,67 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{h}^{-1}$, obliczona z zależności *Arrheniusa* dla temperatury 37°C, jest niższa o 21% niż określona przez Tse i Gough [1987]. Różnica ta jest uzasadniona, gdy względni się iż katalaza była dostarczona z różnych źródeł.

Podsumowanie

Zaprezentowano wyniki badania dezaktywacji katalazy z *Aspergillus niger* pod wpływem nadtlenu wodoru w zależności od temperatury z zakresu 35÷50°C.

Szybkość dezaktywacji opisano równaniem kinetycznym pierwszego rzędu w odniesieniu do stężenia enzymu oraz stężenia substratu. Zmiana wartości stałych szybkości reakcji dezaktywacji k_D w zależności od temperatury następowała zgodnie z równaniem *Arrheniusa*.

Wyznaczono wartość energii aktywacji dla reakcji dezaktywacji katalazy z *A. niger* wynoszącą $158,74 \pm 1,71 \text{ kJ/mol}$.

LITERATURA

- Akyilmaz E., Kozgus O., (2009). Determination of calcium in milk and water samples by using catalase enzyme electrode. *Food Chemistry*. 115, 347–351. DOI: 10.1016/j.food-chem.2008.11.075.
- Arabaci G., Usluoglu A., (2013). Catalytic properties and immobilization studies of catalase from *Malva sylvestris* L. *J. Chem.*, 2013, 1-6. DOI: 10.1155/2013/686185
- DeLuca D., Dennis R., Smith W.G., (1995). Inactivation of an animal and a fungal catalase by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 129-134. DOI: 10.1006/abbi.1995.1350.
- Grubecki L., Miłek J., Trawczyńska I., Wójcik M. (2015) Optymalne sterowanie temperatura w procesie rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę *Aspergillus niger* z uwzględnieniem termicznej dezaktywacji enzymu. *Inż. Ap. Chem.*, 54(3), 90-92
- Lardinois O.M., Mestdagh M.M., Rouxhet P.G. (1996) Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1295, 222-238. DOI: 10.1016/0167-4838(96)00043-X
- Lee C.H., (2004). The role of biotechnology in modern food production. *J. Food Sci.* 69(3), CRH 92-95. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb13347.x
- Miłek J., (2011). *Badanie i modelowanie dezaktywacji katalazy*. Praca doktorska. ZUT, Szczecin
- Miłek J., Wójcik M., (2011). Effect of temperature on the decomposition of hydrogen peroxide by catalase *Terminox Ultra*. *Przem. Chem.* 90(6), 1260-1263
- Tse P.H.S., Gough D., (1987). Time-dependent inactivation of immobilized glucose oxidase and catalase. *Biotechnol. Bioeng.* 29(6), 705-713. DOI: 10.1002/bit.260290607.

Autorki serdecznie dziękują prof. dr. hab. Markowi Wójcikowi za pomoc i wsparcie w pracach naukowych.