

Justyna MIŁEK, Marek WÓJCIK, Sylwia KWIATKOWSKA-MARKS, Ireneusz GRUBECKI

e-mail: jmilek@utp.edu.pl

Katedra Inżynierii Chemicznej i Bioprocusowej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz

## Wpływ dezaktywacji termicznej oraz dezaktywacji substratem na rozkład nadtlenu wodoru przez komercyjną katalazę

### Wstęp

Zastosowanie nadtlenu wodoru w procesach przemysłowych jako utleniacza związane jest zazwyczaj z koniecznością rozkładu jego pozostałości. Najczęściej do tego celu wykorzystuje się obecnie katalazę (EC 1.11.1.6). W przemyśle włókienniczym do usuwania pozostałości nadtlenu wodoru stosowany jest *Terminox Ultra* – katalaza komercyjna pochodzenia mikrobiologicznego, charakteryzująca się m.in. aktywnym działaniem w wysokiej temperaturze [Kaasgard, 2008]. Rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę związany jest jednak z równoległe przebiegającą dezaktywacją enzymu. Enzym ulega zarówno dezaktywacji termicznej jak i dezaktywacji pod wpływem substratu.

Celem prezentowanej pracy była ocena znaczenia dezaktywacji termicznej na rozkład rozcieńczonych roztworów nadtlenu wodoru przez komercyjną katalazę *Terminox Ultra*.

### Model bioreaktora okresowego do rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę

Przy formułowaniu modelu matematycznego bioreaktora przyjęto następujące założenia:

1. Dla niskich stężeń nadtlenu wodoru szybkość reakcji  $r_s$  opisuje równanie kinetyczne:

$$r_s = k_R C_E C_S \quad (1)$$

gdzie:  $k_R$  – stała szybkości reakcji [ $\text{dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{h})$ ];  $C_S$  – stężenie substratu [ $\text{mol}/\text{dm}^3$ ];  $C_E$  – stężenie enzymu [ $\text{mol}/\text{dm}^3$ ].

Równanie w tej postaci stosowali m.in. DeLuca i in. [1995] oraz Ghadermarzi i Moosavi-Movahedi [1996].

2. Dezaktywacja termiczna katalazy przebiega według jednostopniowego mechanizmu  $E \rightarrow D$  [Oancea i in., 2008; Cantemira i in., 2013] prowadzącego do równania kinetycznego:

$$r_{DT} = k_{DT} C_E \quad (2)$$

gdzie:  $k_{DT}$  – stała szybkości dezaktywacji termicznej [ $1/\text{h}$ ].

3. Kinetykę dezaktywacji katalazy substratem opisuje równanie pierwszego rzędu w odniesieniu do stężenia substratu oraz enzymu [Ghadermarzi i Moosavi-Movahedi, 1996; Costa i in., 2002; Fruhwirth i in., 2002]:

$$r_{DS} = k_{DS} C_E C_S \quad (3)$$

gdzie:  $k_{DS}$  – stała szybkości dezaktywacji nadtlenu wodoru, [ $\text{dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{h})$ ].

Bilans masy substratu i aktywnej katalazy dla bioreaktora okresowego opisuje układ dwóch równań różniczkowych zwyczajnych:

$$\frac{dC_S}{dt} = -k_R C_E C_S \quad (4a)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = -k_{DS} C_E C_S - k_{DT} C_E \quad (4b)$$

z warunkami początkowymi  $C_S(t=0) = C_{S0}$  oraz  $C_E(t=0) = C_{E0}$

Po wprowadzeniu aktywności bezwymiarowej  $a = C_E/C_{E0}$  otrzymuje się układ równań o następującej postaci:

$$\frac{dC_S}{dt} = -k_R^* a C_S \quad (5a)$$

$$\frac{da}{dt} = -k_D a C_S - k_{DT} a \quad (5b)$$

z warunkami początkowymi  $C_S(t=0) = C_{S0}$  oraz  $a(t=0) = 1$ , gdzie:  $k_R^* = C_{E0} k_R$  [ $1/\text{h}$ ].

Model matematyczny opisany równ. (5a) i (5b) można rozwiązać jedynie metodami numerycznymi. Do obliczeń niezbędna jest znajomość stałych kinetycznych.

### Wyznaczanie stałych kinetycznych

W prezentowanej pracy wykorzystano wcześniejsze badania [Miłek 2011], które pozwoliły na identyfikację stałych kinetycznych. Stałą szybkości  $k_R^*$  wyznaczono na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych rozkładu nadtlenu wodoru o stężeniu początkowym  $0,015 \text{ mol}/\text{dm}^3$ . Zastosowanie bardzo wysokich stężeń katalazy pozwoliło skrócić czas rozkładu nadtlenu wodoru do jednej minuty. W takiej sytuacji dezaktywację termiczną oraz dezaktywację substratem można pominąć i bezpośrednio z szybkości rozkładu nadtlenu wodoru wyznaczyć stałą  $k_R^*$ . Dla badanego zakresu temperatur stała szybkości reakcji zmieniła się zgodnie z równaniem *Arrheniusa*. Wartość energii aktywacji  $E_R$  wynosi  $11,6 \text{ kJ}/\text{mol}$ . Jej niska wartość świadczy o niewielkim wpływie temperatury na szybkość reakcji rozkładu nadtlenu wodoru.

Stałą szybkości dezaktywacji termicznej  $k_{DT}$  wyznaczono podczas przetrzymywania katalazy przez 30 h w termostatowanej łaźni wodnej w temperaturach z zakresu od  $35^\circ\text{C}$  do  $70^\circ\text{C}$ . W określonych odstępach czasu pobierano próby roztworu katalazy. Aktywność enzymu oznaczano przy użyciu elektrody tlenowej [Díaz i in., 2005; Hakala i in., 2006,]. Zależność stałej szybkości dezaktywacji termicznej katalazy  $k_{DT}$  od temperatury przebiegała zgodnie z równaniem *Arrheniusa*, a energia aktywacji procesu dezaktywacji termicznej  $E_{DT}$  wynosi  $140,93 \text{ kJ}/\text{mol}$ , natomiast stała przedwykładnicza równa się  $1,15 \cdot 10^{21} \text{ h}^{-1}$ .

Stałą szybkości dezaktywacji katalazy substratem  $k_{DS}$  wyznaczono na podstawie badań rozkładu nadtlenu wodoru w izotermicznym reaktorze okresowym. Proces rozkładu nadtlenu wodoru prowadzono przez okres 1,5 h w stałych temperaturach. W określonych odstępach czasu pobierano próbki roztworu reakcyjnego i oznaczano spektrofotometrycznie stężenie nadtlenu wodoru. Na podstawie wykonanych pomiarów zmiany stężenia nadtlenu wodoru wyznaczono stałą szybkości dezaktywacji  $k_{DS}$ . Przy identyfikacji tego parametru metodą najmniejszych kwadratów, wykorzystywano wcześniej wyznaczone niezależnie wartości stałej  $k_R^*$ . Zmiana stałej szybkości dezaktywacji  $k_{DS}$  z temperaturą przebiegała również zgodnie z równaniem *Arrheniusa* a energia dezaktywacji substratem  $E_{DS}$  wynosi  $44,8 \text{ kJ}/\text{mol}$ , natomiast stała przedwykładnicza szybkości dezaktywacji substratem równa się  $8,06 \cdot 10^9 \text{ dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{h})$ .

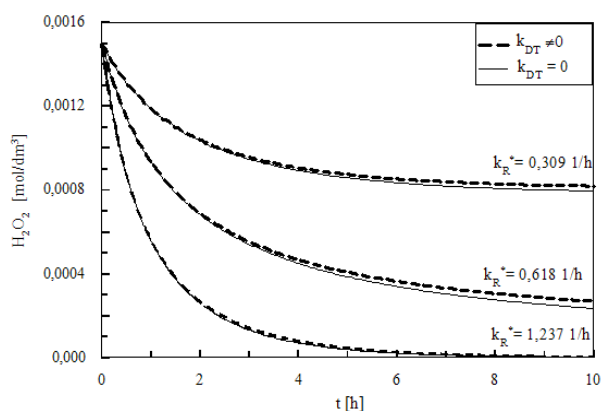
### Analiza pracy bioreaktora okresowego do rozkładu nadtlenu wodoru

Dysponując stałymi kinetycznymi ( $k_R^*$ ,  $k_{DT}$  i  $k_{DS}$ ) oceniono wpływ dezaktywacji termicznej na rozkład nadtlenu wodoru. W tym celu wyznaczono rozwiązania układu równań (5a) i (5b) metodą *Rungego-Kutty* stosując program *Mathcad 15*. Obliczenia wykonano dla dwóch przypadków:

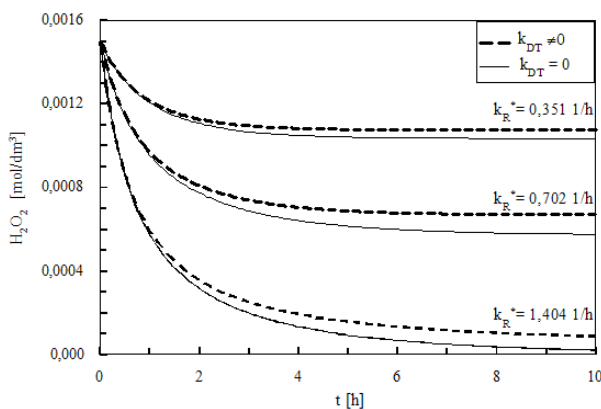
- 1) brak wpływu dezaktywacji termicznej na aktywność katalazy tj.  $k_{DT}=0$
- 2) dezaktywacja termiczna wpływa na aktywność katalazy tj.  $k_{DT}\neq 0$ .

Obliczenia wykonano dla temperatury 50°C, 60°C oraz 70°C i zakresu stężeń początkowych od 0,0015 do 0,015 mol/dm<sup>3</sup>. Rozpatrzono zastosowanie trzech stężeń katalazy, które prowadzą do trzech wartości stałych szybkości  $k_R^*$  różniących się między sobą o 100%.

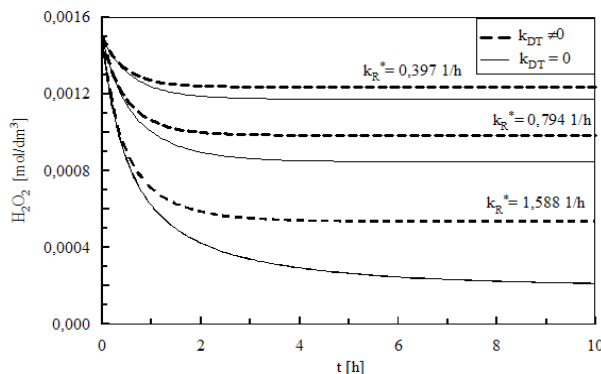
Przeprowadzone obliczenia zmiany stężenia nadtlenu wodoru pod wpływem działania katalazy wykazały, iż dezaktywacja termiczna praktycznie nie wpływa na przebieg zmian stężenia nadtlenu wodoru dla stężeń wyższych od 0,0015 mol/dm<sup>3</sup>. Dominuje wówczas dezaktywacja substratem.



Rys. 1. Zmiana stężenia nadtlenu wodoru 0,0015 mol/dm<sup>3</sup> pod wpływem katalazy w temperaturze 50°C



Rys. 2. Zmiana stężenia nadtlenu wodoru 0,0015 mol/dm<sup>3</sup> pod wpływem katalazy w temperaturze 60°C



Rys. 3. Zmiana stężenia nadtlenu wodoru 0,0015 mol/dm<sup>3</sup> pod wpływem katalazy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w temperaturze 70°C

Dla stężeń nadtlenu wodoru niższych od 0,0015 mol/dm<sup>3</sup> uwidacznia się pewien wpływ dezaktywacji termicznej na uzyskiwany rozkład nadtlenu wodoru. Zależy on w znacznym stopniu od temperatury prowadzenia procesu.

Na rys. 1-3 przedstawiono zmianę stężenia nadtlenu wodoru o stężeniu początkowym 0,0015 mol/dm<sup>3</sup> w temperaturach 50°C, 60°C, 70°C. Na rys. 1 można zaobserwować jedynie niewielką zmianę stężenia nadtlenu wodoru po uwzględnieniu dezaktywacji termicznej. Z przebiegu krzywych na rys. 2 zauważa się, że już po 2 h rozkładu występuje widoczna różnica dla rozwiązań z uwzględnieniem dezaktywacji termicznej i bez jej uwzględniania. Różnica ta stopniowo wzrasta wraz z wydłużaniem czasu reakcji.

Dla rozkładu nadtlenu wodoru w temperaturze 70°C występują jeszcze większe różnice w końcowych stężeniach nadtlenu wodoru (Rys. 3).

## Wnioski

Przeprowadzona analiza pracy bioreaktora do rozkładu nadtlenu wodoru przez komercyjną katalazę Terminox Ultra, która ulegała dezaktywacji termicznej oraz dezaktywacji pod wpływem substratu pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Dezaktywacja katalazy substratem dominuje w reakcji rozkładu nadtlenu wodoru o stężeniach początkowych wyższych od 0,0015 mol/dm<sup>3</sup> a dezaktywacja termiczna może być pominięta.
- Dezaktywacja termiczna katalazy dominuje w rozkładzie nadtlenu wodoru o stężeniu początkowym niższym od 0,0015 mol/dm<sup>3</sup>. i jej wpływ jest tym większy im wyższa jest temperatura w której przebiega reakcja.

## LITERATURA

- Cantemira A.R., Raducanu A., Puiu M., Oancea, D., 2013. Kinetics of thermal inactivation of catalase in the presence of additives. *Proc. Biochem.* **48**, 471-477. DOI: 10.1016/j.procbio.2013.02.013
- Costa S.A., Tzanov T., Carneiro A.F., Gübitz G.M., Cavaco-Paula A., 2002. Recycling of textile bleaching effluents for dyeing using immobilized catalase. *Biotechnol. Lett.* **24**, 173-176. DOI: 10.1023/A:1014136703369
- DeLuca D.C., Dennis R., Smith W.G., 1995. Inactivation of an animal a fungal catalase by hydrogen peroxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **320**, 129-134
- Díaz A., Muñoz-Clares R.A., Rangel P., Valdés V.J., Hansberg W., 2005. Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. *Biochimie* **87**, 205–214. DOI:10.1016/j.biochi.2004.10.014
- Fruhwirth G.O., Paar A., Gudelj M., Cavaco-Paulo A., Robra K.-H., Gübitz G.M., 2002. An immobilised catalase peroxidase from the alkalothermophilic *Bacillus SF* for the treatment of textile-bleaching effluents, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 313-319. DOI 10.1007/s00253-002-1127-0
- Ghadermarzi M., Moosavi-Movahedi A.A., 1996. Determination of the kinetic parameters for the "suicide substrate" inactivation of bovine liver catalase by hydrogen peroxide. *J. Enz. Inhib.*, **10**, 167-175
- Hakala M., Rantamaki S., Puputti E.M., Tyystjarvi T., Tyystjarvi E., 2006. Photoinhibition of manganese enzymes: insights into the mechanism of photosystem II photoinhibition, *J. Exp. Bot.* **57**, 1809–1816. DOI: 10.1093/jxb/erj189
- Kaasgard S., 2008. *Enzyme stabilization in liquid detergents*. EP 1 718 724 B1
- Milek J., 2011. Badanie i modelowanie procesau dezaktywacji katalazy. Praca doktorska, ZUT Szczecin
- Milek J., Wójcik M., 2011. Effect of temperature on the decomposition of hydrogen peroxide by catalase Terminox Ultra. *Przem. Chem.* **90**, nr 6, 1260-1263
- Milek J., Wójcik M., Verschelde W., 2014. Thermal stability for effective use of commercial catalase. *Pol. J. Chem. Technol.* **16**, nr 4, 75-79. DOI:10.2478/pjct-2014-0073
- Oancea D., Stuparu A., Nita M., Puiu M., Raducan A., 2008. Estimation of the overall kinetic parameters of enzyme inactivation using an isoconversional method. *Biophys. Chem.* **138**, 50–54. DOI: 10.1016/j.bpc.2008.09.003