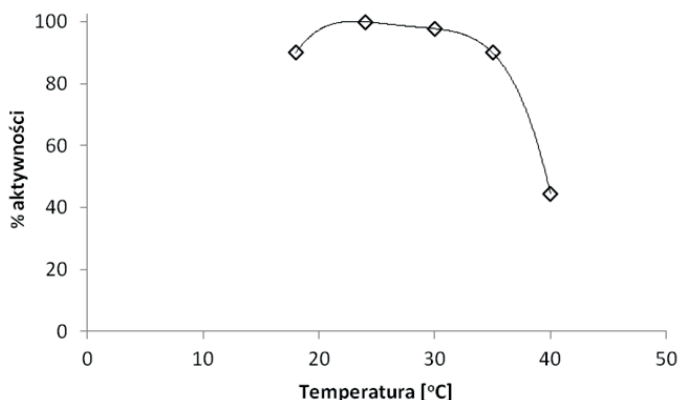


poprzez spadek absorbancji pochodzącej od nadtlenu wodoru przy długości fali 230 nm. Stężenie nadtlenu wodoru odczytywano z krzywej standardowej $A(230) = 1,97c$ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]. Badania prowadzono w termostatowanej reaktorze mieszalnikowym, do którego wprowadzono znaną masę preparatu immobilizowanego enzymu lub enzymu natywnego. Większość badań prowadzona była w pH odpowiadającym pH mleka, czyli w 6,4; wyjątek stanowiły badania nad określeniem wpływu pH na aktywność katalazy, w których pH było zmienne.

Wyznaczenie stałych kinetycznych: Pomimo, że cząsteczka H_2O_2 jest małą cząsteczką o wysokim współczynniku dyfuzji w alginianie ($D = 0,31\cdot 10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) [Van Stroe-Biezen, 1993], niemniej w celu wykluczenia ewentualnego wpływu dyfuzji substratu na wyznaczenie stałych kinetycznych preparatu immobilizowanego, badania prowadzono w warunkach przepływowch. W tym celu usieciowano płaską strukturę alginianową (podobieństwo membrany płaskiej) zawierającą enzym o danym stężeniu, przez którą cyrkulowano roztwór substratu. Postęp reakcji oznaczano poprzez pomiar spadku stężenia substratu w tym roztworze.

Wyniki i ich omówienie

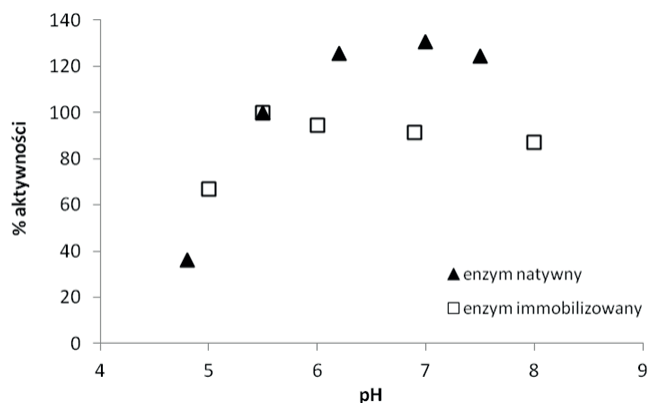
Jak przedstawiono w literaturze [Tuke., 2004; Cetimu., 2003] natywna katalaza wykazuje wysoką aktywność w relatywnie niskich temperaturach, stąd aktywność immobilizowanej katalazy (Rys. 1) mierzono w wąskim zakresie temperatur (18–40°C).



Rys. 1 Wykres zależności aktywności enzymatycznej od temperatury dla katalazy immobilizowanej w kapsułkach alginianowych, pH 6,4. Za 100% przyjęto aktywność w $T = 24^\circ\text{C}$

Immobilizowana katalaza wykazuje maksimum aktywności w 24°C , niemniej w zakresie 18–35°C aktywność pozostaje na wysokim poziomie. Podwyższenie temperatury powyżej 35 powoduje znaczący spadek aktywności immobilizowanego preparatu.

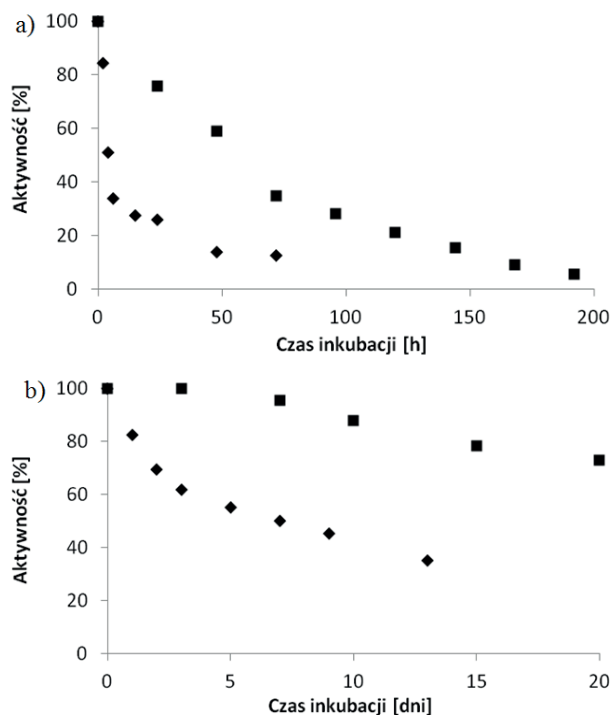
Wpływ pH na aktywność natywnej i immobilizowanej katalazy wyznaczono stosując dwa bufony: octanowy (dla niższych wartości pH) i HEPES-NaOH dla $pH > 6$. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2 Wykres zależności aktywności od pH dla katalazy natywnej oraz immobilizowanej w kapsułkach alginianowych ($T = 24^\circ\text{C}$). Za 100% przyjęto aktywność danej formy enzymu przy pH 5,5

Natywna katalaza wykazuje maksimum aktywności przy pH 7,0 natomiast dla enzymu immobilizowanego optimum jest przesunięte w kierunku niższych wartości pH , aczkolwiek aktywność immobilizowanej katalazy w całym zakresie pH jest wysoka (powyżej 90% aktywności maksymalnej) z wyjątkiem pH 5,0 gdzie enzym wykazuje tylko 65% swojej aktywności maksymalnej.

Stabilność natywnej i immobilizowanej katalazy została wyznaczona w pH 6,4 w optymalnej temperaturze prowadzenia reakcji (24°C) oraz temperaturze przechowywania (4°C). Uzyskane wyniki przedstawiono odpowiednio na rys. 3a i 3b.



Rys. 3 Stopień zachowania aktywności w czasie katalazy natywnej (♦) oraz immobilizowanej w kapsułkach alginianowych (■); przy pH 6,4; w temperaturze $T = 24^\circ\text{C}$ (a) oraz $T = 4^\circ\text{C}$ (b)

Przy założeniu kinetyki pierwszego rzędu, stała szybkości inaktywacji, w temperaturze 24°C została wyznaczona na $0,170 \text{ h}^{-1}$ dla natywnej katalazy i $0,0139 \text{ h}^{-1}$ dla katalazy immobilizowanej w kapsułkach alginianowych. Stąd, zgodnie z opisanymi zależnościami [Trusek-Hocownia, 2003], czas połowicznego zaniku aktywności został wyliczony odpowiednio na 4 h i 53 h.

W warunkach przechowywania, natywna katalaza straciła 50% swojej początkowej aktywności po 7 dniach, podczas gdy preparat immobilizowany po tym czasie wykazywał więcej niż 90% swojej aktywności początkowej. Po przechowywaniu preparatu przez 20 dni, wykazał on 73% zachowania aktywności.

Kinetykę reakcji hydrolizy wyznaczono dla dwóch stężeń enzymu, z zakresu liniowej zależności $r = f(c_E)$, w zakresie stężeń substratu odpowiadających stężeniom podawanym przy zimnej pasteryzacji mleka. Proces prowadzono w 50 mM buforze HEPES-NaOH przy pH odpowiadającym mleku tj. pH 6,4, w temperaturze optymalnej do katalazy tj. w 24°C .

Uzyskane dla enzymu natywnego wyniki przedstawiono na rys. 4.

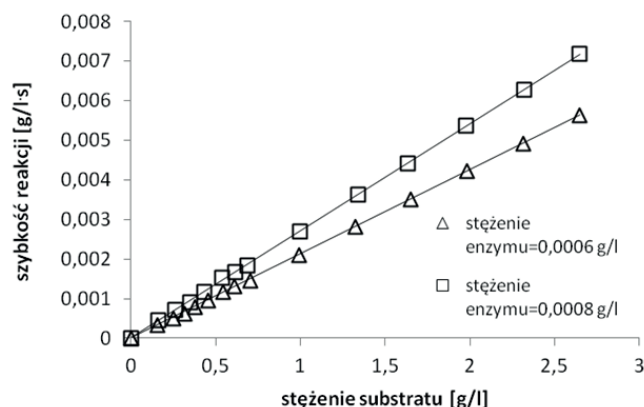
Pokazano, że w całym badanym zakresie stężeń funkcja $r = f(c_S)$ jest zależnością liniową. W oparciu o przeprowadzone eksperymenty stała szybkości reakcji przyjęła następujące wartości:

$$k_{1,nat} = 2,13 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ dla } c_E = 6,0 \cdot 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$k_{1,nat} = 2,71 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ dla } c_E = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$$

Przyjmując liniową zależność szybkości reakcji od stężenia enzymu równanie kinetyczne można zapisać w postaci:

$$r_{nat} = k_{1,nat}c_S = k_{3,nat}c_Ec_S \quad (1)$$



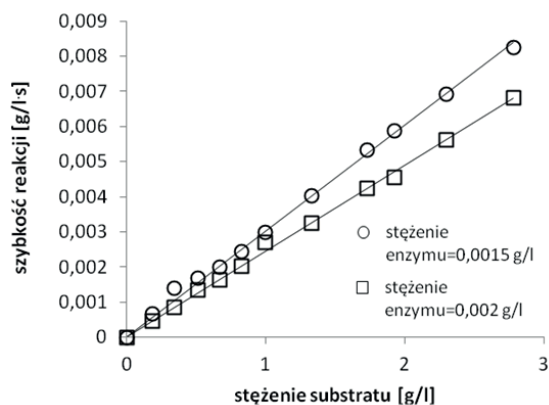
Rys. 4. Wykres zależności początkowej szybkości reakcji od stężenia substratu dla katalazy natywnej ($pH\ 6,4$, $T = 24^{\circ}C$)

gdzie:

- r – szybkość reakcji, $[g \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}]$,
- c_E – stężenie enzymu, $[g \cdot l^{-1}]$,
- c_S – stężenie substratu, $[g \cdot l^{-1}]$,
- k_1 – stała szybkości, $[s^{-1}]$,
- k_3 – stała kinetyczna $[l \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}]$.

Wyznaczona na tej podstawie stała kinetyczna $k_{3,nat}$ przyjmuje wartość $3,47\ l \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}$.

Kinetyka dla enzymu immobilizowanego w sieci alginianu została wyznaczona w dwóch seriach, dla stężenia enzymu w warstwie alginianowej $1,5 \cdot 10^{-3}$ i $2 \cdot 10^{-3}\ g \cdot l^{-1}$. Roztwór substratu o objętości (V_{res}) wynoszącej w eksperymentach 25 ml cyrkulowano przez warstwę alginianową z enzymem (V_{alg}) stanowiącą strefę reakcji, która wynosiła w poszczególnych eksperymentach $2,1$ – $2,6$ ml. Proces prowadzono w $T = 24^{\circ}C$, przy $pH\ 6,4$. Całkowita objętość układu, w której monitorowano ubytek



Rys. 5. Wykres zależności początkowej szybkości reakcji od stężenia substratu dla katalazy natywnej ($pH\ 6,4$, $T = 24^{\circ}C$)

substratu wynosiła $V_{res} + V_{alg}$. Do opisu szybkości reakcji pierwszego rzędu względem substratu w takim układzie zastosowano równanie (2) opisane w literaturze [Trusek-Holownia, 2005]:

$$r_{imm} = -\frac{dc_S}{dt} \frac{V_{res} + V_{alg}}{V_{alg}} = k_{1,imm} c_S = k_{3,imm} c_E c_S \quad (2)$$

Stężenie enzymu ($c_{E,imm}$) odnosi się do objętości warstwy alginianowej, gdzie zachodzi reakcja. Wyniki przedstawiono na rys. 5.

W oparciu o przeprowadzone eksperymenty wyznaczono stałe szybkości reakcji, które przyjmują następujące wartości:

$$k_{1,imm} = 2,45 \cdot 10^{-3}\ s^{-1} \text{ dla } c_E = 1,5 \cdot 10^{-3}\ g \cdot l^{-1}$$

$$k_{1,imm} = 3,02 \cdot 10^{-3}\ s^{-1} \text{ dla } c_E = 2,0 \cdot 10^{-3}\ g \cdot l^{-1}$$

stąd stała kinetyczna $k_{3,imm}$ wynosi $1,57\ l \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}$.

Wnioski

Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na otrzymanie preparatu immobilizowanej katalazy, który z uwagi na swoją heterogeniczność w łatwy sposób może być separowany ze strumienia mleka.

W warunkach reakcji ($pH\ 6,4$; $24^{\circ}C$) enzym immobilizowany wykazuje mniejszą o połowę aktywność, o czym świadczą uzyskane wartości stałej kinetycznej k_3 , niemniej jednak jego stabilność w warunkach procesowych jest kilkanaście razy wyższa niżeli preparatu natywnego. Dotyczy to również stabilności w warunkach przechowywania.

LITERATURA

- Akertek E., Tarhan L., 1995. Characterization of immobilized catalases and their application in pasteurization of milk with H_2O_2 *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **50**, 291–303. DOI: 10.1007/BF02788099
- Çetinus S.A., Öztop H.N., 2003. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads *Enzyme Microb. Technol.*, **32**, 889–894. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00065-6
- Tarhan L., 1995. Use of immobilized catalase to remove H_2O_2 used in sterilization of milk *Process. Biochem.*, **30**, nr 7, 623–628. DOI: 10.1016/0032-9592(94)00066-2
- Trusek-Holownia A., 2005. A catalytic membrane for hydrolysis reaction carried out in the two-liquid phase system – membrane preparation and characterization, mathematical model of the process *J. Membrane Sci.*, **259**, 74–84. DOI: 10.1016/j.memsci.2005.03.047
- Trusek-Holownia A., 2003. A membrane phase contactor for enzymatic synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide *J. Biotechnol.*, **102**, 153–163. DOI: 10.1016/S0168-1656(03)00024-5
- Tukel S.S., Alptekin O., 2004. Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate *Process Biochem.*, **39**, nr 12, 2149–2155. DOI: 10.1016/j.procbio.2003.11.010
- Van Stroey-Biezen S.A.M., Everaerts F.M., Janssen L.J.J., Tacken R.A., 1993. Diffusion coefficients of oxygen, hydrogen peroxide and glucose in a hydrogel *Anal. Chim. Acta* **273**, 553–560. DOI: 10.1016/0003-2670(93)80202-V

Praca była finansowana ze środków statutowych (nr 331 380 W3) przeznaczonych dla Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej na rok 2010/2011.